

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Fisiología Humana**



**DISFUNCIÓN ENDOTELIAL E INFLAMACIÓN EN  
LA HIPERTENSIÓN EXPERIMENTAL: PAPEL DE  
LA ANGIOTENSINA II**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

David Sanz Rosa

Bajo la dirección de los doctores

Victoria Cachafeiro Ramos  
Vicente Lahera Juliá

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**DISFUNCIÓN ENDOTELIAL  
E INFLAMACIÓN EN LA  
HIPERTENSIÓN EXPERIMENTAL:  
PAPEL DE LA ANGIOTENSINA II.**

TESIS DOCTORAL

David Sanz Rosa

Madrid, 2005



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**DISFUNCIÓN ENDOTELIAL  
E INFLAMACIÓN EN LA  
HIPERTENSIÓN EXPERIMENTAL:  
PAPEL DE LA ANGIOTENSINA II.**

Memoria presentada por

**David Sanz Rosa**

para la obtención del grado de Doctor

VºBº Directores:

Victoria Cachafeiro Ramos

Vicente Lahera Juliá



**Dña. VICTORIA CACHOFEIRO RAMOS**, Profesora Titular del Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y

**D. VICENTE LAHERA JULIÁ**, Profesor Titular del Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que D. David Sanz Rosa ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral titulada: “Disfunción Endotelial e Inflamación en la Hipertensión Experimental: Papel de la Angiotensina II”, que ha terminado con el mayor aprovechamiento y se encuentra en condiciones para ser defendida ante un Tribunal. Para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid, a 4 de Julio de 2005.

Fdo. Victoria Cachofeiro Ramos

Fdo. Vicente Lahera Juliá



# **AGRADECIMIENTOS**



Deseo expresar mi agradecimiento:

A los directores de esta Tesis Doctoral, Victoria Cachofeiro y Vicente Lahera por el apoyo que me han ofrecido en la realización de este trabajo, su dedicación, su amistad, así como su entusiasmo científico que han sabido transmitirme durante todos estos años. Gracias por haber confiado en mí desde el primer día que entre a formar parte del grupo de investigación, proponiéndome unos retos nada fáciles de conseguir y que finalmente han dado sus frutos.

Al Profesor Javier Fernández Ruiz, por haber aceptado ser el tutor de esta Tesis y por su voluntariedad para resolver los problemas científicos y burocráticos.

A Natalia, Eva, Carmita y María, amigas y compañeras del grupo de Fisiología Vasculard, con las que he compartido cientos de horas de trabajo, de buenos y malos momentos (los minoritarios), tanto dentro como fuera del laboratorio; por su ayuda inestimable y por el ánimo generado para la realización de esta Tesis. En definitiva, unos años de convivencia que no han hecho otra cosa que enriquecernos personal y profesionalmente y asentar una amistad difícil de olvidar.

A Jesús Tresguerres por transmitir el espíritu de familia en el Departamento y por ayudarme en mi carrera científica. A Carmen Ariznavarreta, por ser tan amable conmigo y por darme ánimos y consejos siempre que los necesitaba. A Asunción López Calderón, M<sup>a</sup> Ángeles Villanúa, Lola Vaticón y Orlando Mora por la colaboración desinteresada y por el ánimo que me han prestado durante la realización de la Tesis.

A Tere “jatepower”, por su amistad, por las horas de la comida tan alegres y ser tan voluntariosa. A Pepa, por su ayuda y sus consejos tanto personales como profesionales durante todos estos años. A Vero, por las conversaciones sobre bandas sonoras y por la ayuda ofrecida durante la escritura de la Tesis. A Christian, por su amistad y por sus lecciones en software informático. A Mar, Sandra, Almudena, Miriam, Anabel, Blanca, Emilio, Bea, M<sup>a</sup> Ángeles, Joaquín, Arturo, Roberto, Ana P, Haiko, Mariana, Ana Paula y Juanjo, así como al resto de integrantes que han pasado por el Departamento y con los que he compartido muchas experiencias, muchos aperitivos, festejos, amigos invisibles, fiestas de disfraces, cenas de departamento y tantos acontecimientos que hacen a uno enorgullecerse del lugar donde trabaja.

A Antonio Carmona, ese “roquero carabanchelero”, por haber sido mi maestro en técnicas de laboratorio, en las “ñapas” realizadas en el departamento, en Rock&Roll y por ser un gran amigo dentro y fuera del laboratorio.

A Frank, por su amistad, por haber sido mi verdadero maestro en la Biología Molecular, por haberme transmitido la rigurosidad del método, y por ese primer año de

aprendizaje inolvidable junto con Carlos, Álvaro, M<sup>a</sup> Ángeles y Arancha en el laboratorio de Nefrología e Hipertensión de la Fundación Jiménez Díaz.

A Pilar Oubiña, Dra. Técnica del Laboratorio Clínica Ntra. Sra. De Loreto por su asesoramiento y realización de los estudios de estrés oxidativo e inflamación.

A Paloma Aragoncillo, Profesora Adjunto Facultativo de Área del Servicio de Anatomía Patológica, Unidad II, Hospital Universitario San Carlos, por su ayuda en la realización de los estudios histológicos.

A Luis Miguel Ruilope por su confianza, amistad y ayuda prestada tanto profesional como personalmente.

Al Mago, Hopper, Rubi y Conce. Gracias por darme vuestra amistad, tiempo, apoyo, consejos, cobijo, juegos de magia que hacen volver a la infancia, soporte informático y una encuadernación propia de un maestro. A mis amigos Mar, San, Patri, Javi, Joy, Gordo, Nuno, Vicen, Antonio, Negro, Koen, María, Gloria y Tere por haber compartido conmigo tantos momentos buenos fuera del laboratorio, y por todo el ánimo que me habéis transmitido durante el periodo pre-doctoral.

A mis padres Alberto y Mariví, por la educación que me han dado, por las oportunidades y facilidades que me han proporcionado, por quererme, por preocuparse por mi futuro y por haber confiado en mí durante estos años de formación académica-científica que solo acaban de empezar. A mis hermanos y políticos, Mariví, Alberto, Carina y Anthony, por su apoyo, interés y aliento, antes y durante mis estudios de postgrado.

A los Picatoste Ruilope y asociados, Antonio, Toti, Fer, Richi, Alvaro e Isa, por hacerme sentir como si estuviera en mi propia casa, por ser mi segunda familia, por apoyarme, ayudarme e interesarse por mi carrera personal y científica. A Luisa, por tratarme como un nieto más. A M<sup>a</sup> Blanca, Luis y Carmen, por su amistad, su apoyo incondicional y su confianza depositada en mí durante estos años, y al resto de la familia Ruilope por sus ánimos durante la realización de esta Tesis.

A la familia Palomino Echegoyen y en especial a Isabel por adoptarme y quererme como el octavo hijo.

A María Picatoste Ruilope, por ser mi amor, mi confidente, mi mejor amiga, mi motor, por escucharme y alentarme en los momentos fáciles y difíciles, por sus consejos y porque me hace reír. Sin su gran ayuda, el trabajo de estos años plasmado en este libro, hubiera sido muchísimo más difícil de realizar. En resumen, se lo agradezco a la mujer de mi vida.

### Relación de artículos relacionados con la Tesis:

- Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediél E, de Las Heras N, Aragoncillo P, Balfagon G, Cachofeiro V, Lahera V.  
Eplerenone reduces oxidative stress and enhances eNOS in SHR: vascular functional and structural consequences.  
Antioxidant & Redox Signaling. 2005 Sep-Oct;7(9-10):1294-301.
- Sanz-Rosa D, Cediél E, las Heras N, Miana M, Balfagon G, Lahera V, Cachofeiro V.  
Participation of aldosterone in the vascular inflammatory response of spontaneously hypertensive rats: role of the NFkappaB/IkappaB system.  
J Hypertens. 2005 Jun;23(6):1167-72.
- Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediél E, de Las Heras N, Vegazo O, Jimenez J, Lahera V, Cachofeiro V.  
Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-(Tummala et al., 1999d)B/I(Tummala et al., 1999c)B system.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Jan;288(1):H111-H115.Epub 2004 Aug.
- Cachofeiro V, Sanz-Rosa D, las Heras N, Cediél E, Miana M, Lahera V.  
Inflamación, disfunción endotelial e hipertensión arterial.  
Hipertensión. 2004 Oct;21(7):347-354.
- Cediél E, Sanz-Rosa D, Oubiña MP, De Las Heras N, González Pacheco FR, Vegazo O, Jiménez J, Cachofeiro V, Lahera V.  
Effect of AT<sub>1</sub> receptor blockade on hepatic redox status in SHR: possible relevance for endothelial function?  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.2003 Sep;285(3):R674-81.
- V. Lahera, E. Cediél, N. de las Heras, S. Vázquez-Pérez, D. Sanz-Rosa, B. Vázquez-Cruz, V. Cachofeiro.  
Disfunción endotelial en hipertensión.  
Nefrología;23 Suppl 4:3-12. Review, 2003.

**Los resultados de esta Tesis han sido difundidos en las siguientes reuniones científicas:**

**Internacionales:**

- 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Prague, (Czech Republic). June 23-27, 2002.
- 12th European Meeting on Hypertension. Prague, (Czech Republic). June 23-27, 2002.
- 6th Young Investigators Meeting. Prague, (Czech Republic). June 24-25, 2002.
- 13th European Meeting on Hypertension. Milan, (Italy). June 13-17, 2003.
- 20th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Sao Paulo (Brasil), February 15-19, 2004.
- 7th Young Investigators Meeting. European Society of Hypertension. Milan, Italy. June 14-16, 2003.
- 8th Young Investigators Meeting. European Society of Hypertension. Paris, France. June 13-17, 2004.

**Nacionales:**

- XXXII Congreso de la Sociedad Española de Nefrología. Bilbao, Octubre 12-16, 2002.
- 7ª Reunión Nacional. Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. Madrid, 12-15 de Marzo de 2002.
- XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Marbella (Málaga), Mayo 14-17, 2003.
- XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Murcia, Junio 2-5, 2004
- XXXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Tenerife 2-5 de Octubre, 2004.
- 10ª Reunión nacional, Sociedad Española de Hipertensión Liga Española para la lucha contra la Hipertensión Arterial. Barcelona, 15-18 de Marzo, 2005.

# **ABREVIATURAS**



---

<b>A (1-7)</b>	Angiotensina 1-7
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AC</b>	Adenilato ciclase
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa
<b>ADH</b>	Hormona antidiurética
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Copia del ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AGPI</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>AI</b>	Angiotensina I
<b>AII</b>	Angiotensina II
<b>AIII</b>	Angiotensina III
<b>AIV</b>	Angiotensina IV
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>AP-1</b>	Factor nuclear de la proteína-1
<b>APA</b>	Aminopeptidasa A
<b>APB</b>	Aminopeptidasa B
<b>APN</b>	Aminopeptidasa neutra
<b>ARAI</b>	Antagonistas de los receptores AT1 de angiotensina II
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ASA</b>	Amiloide sérico tipo A
<b>AT<sub>1</sub></b>	Receptor de angiotensina tipo 1
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>β-AR</b>	Receptores beta adrenérgicos
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetrahidrobiopterina
<b>BK</b>	Bradiquinina
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>C</b>	Candesartán
<b>CAGE</b>	Enzima generadora de angiotensina “sensible a quimostatina”
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>ClO<sup>-</sup></b>	Anión hipoclorito
<b>CMLV</b>	Células de músculo liso vascular
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
<b>CSF</b>	Factor estimulador de colonias
<b>CTGF</b>	Factor de crecimiento conectivo tisular
<b>DAG</b>	Diacil glicerol
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>ECA</b>	Enzima de conversión de angiotensina

<b>ECE</b>	Enzima de conversión de endotelina
<b>EDCF</b>	Factores vasoconstrictores derivados del endotelio
<b>EDHF</b>	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
<b>EDPAE</b>	Enzima activadora de prorenina derivada de endotelio
<b>EDRF</b>	Factor relajante derivado del endotelio
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamintetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epitelial
<b>ELAM</b>	Molécula de adhesión endotelial de leucocitos
<b>EP</b>	Endopeptidasa
<b>ERK</b>	Proteín-kinasa reguladora de la señal extracelular
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ET</b>	Endotelina
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FAD</b>	Flavín-adenín dinucleótido
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FMN</b>	Flavín mononucleótido
<b>FSR</b>	Flujo sanguíneo renal
<b>FvW</b>	Factor von Willebrand
<b>G6PDH</b>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<b>GABA</b>	Ácido gamma aminobutírico
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
<b>GCs</b>	Guanilato ciclasa soluble
<b>GMPc</b>	Guanosín 3',5' monofosfato cíclico
<b>GPx</b>	Glutation peroxidasa
<b>GRed</b>	Glutation Reductasa
<b>GSH</b>	Glutation reducido
<b>GSSG</b>	Glutation Oxidado
<b>GTP</b>	Guanosín 5'trifosfato
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HTA</b>	Hipertensión Arterial
<b>IAM</b>	Infarto agudo de miocardio
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>IECA</b>	Inhibidor de la enzima de conversión de angiotensina
<b>IκB</b>	Inhibidor del factor de transcripción nuclear kappa-B
<b>IKK</b>	Kinasa del IκB
<b>IL-1β</b>	Interleuquina-1 beta
<b>INF-γ</b>	Interferón gamma
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>JAK</b>	Janus kinasa
<b>JNK</b>	Kinasa del N-terminal de Jun

---

<b>L-ADMA</b>	L-arginina dimetil asimétrica
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LNAME</b>	NG-nitro-L-arginina
<b>LNMM</b>	N-monometil-L-arginina
<b>Lp (a)</b>	Lipoproteína (a)
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MAP</b>	Proteína mitogénica activada
<b>MAPK</b>	Proteínas tirosín-kinasa de MAP
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos
<b>MCSF</b>	Factor estimulador de colonias de monocitos
<b>MDA</b>	Malonil dialdehído
<b>MEK</b>	Proteín-kinasa mitógena activada
<b>MHC I/II</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 o 2
<b>MLCK</b>	Kinasa de la cadena ligera de miosina
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas
<b>MPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa múltiple
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NADH</b>	Nicotín adenín dinucleótido reducido
<b>NADPH</b>	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
<b>NEP</b>	Endopeptidasa neutra
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor de transcripción nuclear kappa-B
<b>NO</b>	Oxido nítrico
<b>NOS</b>	NO sintasa
<b>NOS<sub>e</sub></b>	NO sintasa endotelial
<b>NOS<sub>i</sub></b>	NO sintasa inducible
<b>NOS<sub>n</sub></b>	NO sintasa neuronal
<b>NPS</b>	Nitroprusiato sódico
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singlete
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>·OH</b>	Radical hidroxilo
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>ONOOH</b>	Ácido peroxinitroso
<b>OPN</b>	Osteopontina
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PBS</b>	Tampón salino de fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva

<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PEP</b>	Endopeptidasa propilica
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Prostaglandina H2
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PKAc</b>	Proteín kinasa A citosólica
<b>PKC</b>	Proteín kinasa C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A2
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLD</b>	Fosfolipasa D
<b>PNA</b>	Péptido natriurético auricular
<b>PP2A</b>	Fosfolipasa 2 A
<b>PPAR</b>	Receptores activados del proliferador de peroxisoma
<b>PTP</b>	Fosfatasa de fosfotirosina
<b>SHR</b>	Rata espontáneamente hipertensa
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SRA</b>	Sistema renina-angiotensina
<b>STAT</b>	Señal activadora y transductora de la transcripción
<b>TFG</b>	Tasa de filtración glomerular
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TIMP-1</b>	Inhibidor de la metaloproteínasa tisular 1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>t-PA</b>	Activador de plasminógeno tisular
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A2
<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión vascular
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad
<b>VP</b>	Vasopresina
<b>WKY</b>	Rata Wistar Kyoto
<b>XO</b>	Xantina Oxidasa

# ÍNDICE



## INTRODUCCIÓN

<b>1. Hipertensión Arterial</b> .....	3
1.1. Descripción.....	3
1.2. Consecuencias de la hipertensión arterial: la enfermedad vascular hipertensiva.....	5
1.3. La rata espontáneamente hipertensa: el modelo experimental.....	6
<b>2. Endotelio Vascular</b> .....	7
2.1. Funciones.....	9
2.2. Factores vasodilatadores y vasoconstrictores.....	10
2.3. Radicales libres y estrés oxidativo.....	20
2.3.1. Definición de radical libre.....	20
2.3.2. Tipos de radicales libres y especies reactivas de oxígeno.....	21
2.3.3. Fuentes de radicales libres y especies reactivas.....	25
2.3.4. Mecanismos de defensa frente a las ERO.....	27
2.3.5. Acciones de las EROs.....	31
2.3.6. Hipertensión y estrés oxidativo.....	33
2.4. Factores de crecimiento.....	34
2.5. Agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis.....	37
2.6. Disfunción endotelial.....	38
2.6.1. Mecanismos implicados y consecuencias de la disfunción endotelial.....	39
2.6.2. Evaluación clínica y experimental de la disfunción endotelial.....	41
<b>3. Remodelado vascular y crecimiento</b> .....	43
3.1. Morfología de la pared arterial normal.....	43
3.2. Morfología del remodelado arterial.....	44
<b>4. Inflamación</b> .....	46
4.1. El factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB).....	48
<b>5. Angiotensina II</b> .....	53
5.1. Sistema Renina-Angiotensina.....	53
5.2. Receptores de Angiotensina II.....	55
5.3. Regulación de la síntesis de Angiotensina II.....	58
5.4. Acciones de la Angiotensina II.....	62
<b>6. Antagonistas no peptídicos de los receptores AT<sub>1</sub> de Angiotensina II</b> .....	72
6.1. Mecanismo de acción de los ARAII.....	73
6.2. Efectos farmacológicos de los ARAII.....	75
<b>OBJETIVOS</b> .....	79
<b>MÉTODOS</b>	
<b>1. Animales, dieta y tratamiento</b> .....	83
<b>2. Medida de la presión arterial</b> .....	83
<b>3. Función vascular</b> .....	84
3.1. Respuesta vasoconstrictora.....	85
3.2. Respuesta vasodilatadora.....	85
3.3. Reactivos químicos utilizados.....	86
<b>4. Medidas de marcadores inflamatorios plasmáticos</b> .....	86
4.1. IL-1β, IL-6, TNF-α, IFN-γ y PCR.....	87

<b>5. Expresión génica</b> .....	88
5.1. Extracción de ARN.....	88
5.2. Síntesis de sonda de NOSe.....	90
5.3. Transferencia Northern.....	91
5.4. Síntesis de ADNc.....	92
5.5. PCR multiplex.....	92
5.5.1. Expresión génica de citoquinas vasculares IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B e I $\kappa$ B.....	93
5.5.2. Expresión génica de p22phox.....	94
5.5.3. Expresión génica de CTGF.....	95
<b>6. Estado redox</b> .....	96
6.1. Parámetros oxidativos hepáticos.....	96
6.1.1. Medida de Glutation Peroxidasa.....	97
6.1.2. Medida de Glutation Reductasa.....	97
6.1.3. Medida de GSH/GSSG.....	98
6.1.4. Medida de MDA.....	99
6.2. Parámetros oxidativos plasmáticos.....	99
6.2.1. Medida de 8-isoprostanos.....	99
<b>7. Análisis morfométrico</b> .....	100
7.1. Tinción hematoxilina-eosina.....	100
7.2. Tinción tricrómico de Masson.....	101
7.3. Inmunohistoquímica.....	102
7.4. Reactivos utilizados en el análisis morfométrico.....	103
<b>8. Análisis Estadístico</b> .....	104

## RESULTADOS

<b>1. Efecto del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> sobre la presión arterial</b> .....	107
<b>2. Efecto de la hipertensión sobre la función vascular: consecuencias del bloqueo los receptores AT<sub>1</sub></b> .....	107
2.1. Efecto de la hipertensión sobre la función vascular.....	107
2.1.1. Respuesta vasoconstrictora.....	107
2.1.2. Respuesta vasodilatadora.....	110
2.1.3. Expresión génica de la enzima Óxido Nítrico Sintasa Endotelial en aorta.....	112
2.2. Consecuencias del bloqueo los receptores AT <sub>1</sub> sobre la función vascular.....	112
2.2.1. Respuesta vasoconstrictora.....	112
2.2.2. Respuesta vasodilatadora.....	115
2.2.3. Expresión génica de la enzima Óxido Nítrico Sintasa Endotelial en aorta.....	117
<b>3. Efecto de la hipertensión sobre el estrés oxidativo: Consecuencias bloqueo los receptores AT<sub>1</sub></b> .....	118
3.1. Efecto de la hipertensión sobre el estrés oxidativo.....	118
3.1.1. Estrés Oxidativo Vascular: Expresión génica de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa en aorta.....	118
3.1.2. Estrés Oxidativo Hepático: Niveles de GSH/GSSG, GPx, GRed y MDA.....	118
3.1.3. Marcadores Sistémicos: niveles plasmáticos de 8-iso-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> .....	121
3.2. Consecuencias del bloqueo los receptores AT <sub>1</sub> sobre el estrés oxidativo.....	121
3.2.1. Estrés Oxidativo Vascular: Expresión génica de la subunidad p22phox	

de la enzima NADPH oxidasa en aorta.....	121
3.2.2. Estrés Oxidativo Hepático: Niveles de GSH/GSSG, GPx, GRed y MDA.....	122
3.2.3. Marcadores Sistémicos: niveles plasmáticos de 8-iso-PGF <sub>2α</sub> .....	124
<b>4. Efecto de la hipertensión sobre la inflamación: Consecuencias del bloqueo los receptores AT<sub>1</sub>.....</b>	<b>125</b>
4.1. Efecto de la hipertensión sobre la inflamación.....	125
4.1.1 Concentraciones Plasmáticas: IL-1β, IL-6, TNF-α y PCR.....	125
4.1.2 Expresión génica de IL-1β, IL-6 y TNF-α en aorta.....	127
4.1.3 Sistema NFκB/IκB.....	129
4.2. Consecuencias del bloqueo los receptores AT <sub>1</sub> sobre la inflamación.....	130
4.2.1 Concentraciones Plasmáticas: IL-1β, IL-6, TNF-α y PCR.....	130
4.2.2 Expresión génica de IL-1β, IL-6 y TNF-α en aorta.....	132
4.2.3 Sistema NFκB/IκB.....	134
<b>5. Efecto de la hipertensión sobre la estructura de la pared de la aorta:</b>	
<b>Consecuencias del bloqueo los receptores AT<sub>1</sub>.....</b>	<b>135</b>
5.1 Efecto de la hipertensión sobre la estructura de la pared de la aorta.....	135
5.1.1. Estructura vascular.....	135
5.1.2. Contenido de colágeno en aorta.....	136
5.1.3. Expresión génica de CTGF en aorta.....	137
5.1.3. Inmunohistoquímica de CTGF en aorta.....	137
5.2. Consecuencias del bloqueo los receptores AT <sub>1</sub> sobre la estructura de la pared de la aorta.....	138
5.2.1. Estructura vascular.....	138
5.2.2. Contenido de colágeno en aorta.....	139
5.2.3. Expresión génica de CTGF en aorta.....	140
5.2.3. Inmunohistoquímica de CTGF en aorta.....	140
<b>DISCUSIÓN</b>	
<b>1. Efecto de la hipertensión sobre la estructura y función vascular: consecuencias del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub>.....</b>	<b>143</b>
1.1. Efecto de la hipertensión sobre la estructura y función vascular.....	143
1.2. Consecuencias del bloqueo de los receptores AT <sub>1</sub> sobre la estructura y función vascular.....	150
<b>2. Efecto de la hipertensión sobre el estrés oxidativo: consecuencias del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub>.....</b>	<b>157</b>
2.1. Efecto de la hipertensión sobre el estrés oxidativo.....	157
2.2. Consecuencias del bloqueo de los receptores AT <sub>1</sub> sobre el estrés oxidativo.....	160
<b>3. Efecto de la hipertensión sobre la inflamación: consecuencias del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub>.....</b>	<b>164</b>
3.1. Efecto de la hipertensión sobre la inflamación.....	164
3.2. Consecuencias del bloqueo de los receptores AT <sub>1</sub> sobre la inflamación.....	168
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>173</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>177</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>181</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>185</b>



# INTRODUCCIÓN



## 1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

### 1.1. DESCRIPCIÓN

La hipertensión arterial se ha establecido como el principal factor de riesgo para el desarrollo de patologías cardiovasculares como el accidente cerebrovascular, la enfermedad coronaria y el fallo renal y cardiaco en los países occidentales. Pero la hipertensión no se presenta de manera aislada, sino que en la mayoría de los casos va asociada a otros factores de riesgo como la diabetes Mellitus, la hipercolesterolemia, la hipertrigliceridemia o la obesidad, lo que aumenta la incidencia accidentes cardiovasculares (Mulrow, 1999,Whelton, 1994). En cuanto a la prevalencia de la hipertensión, en muchas sociedades más del 50% de los individuos mayores de 60 años padecen hipertensión arterial. Cerca del 30% de las muertes en el mundo, se deben a enfermedades cardiovasculares. En particular, la hipertensión es responsable de un 25% de las muertes en España, y cerca de la mitad se deben a causa cardiovascular (Luque, 2004).

Actualmente, existen dos guías para el manejo de la hipertensión. El séptimo informe del Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (The JNC 7 Report) (Chobanian et al., 2003), hace una clasificación de las categorías de los individuos hipertensos (Tabla 1) más simplificada que la presentada por las Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología presentaron en la 1ª Guía Europea de manejo de la Hipertensión Arterial (Tabla 2) (, 2003). El JNC 7º, incorpora por vez primera el concepto de prehipertensión, equivalente a cifras de presión arterial en el rango normal (120-139/80-89 mm de Hg). Además desaparece la estratificación de los factores de riesgo, que tienen una gran importancia en el pronóstico evolutivo y en las indicaciones del tratamiento.

<b>Clasificación de la PA</b>	<b>PAS (mm de Hg)</b>	<b>PAD (mm de Hg)</b>
<b>Normal</b>	< 120	y < 80
<b>Prehipertensión</b>	120 - 139	ó 80 - 89
<b>HTA: Estadío 1</b>	140 - 159	ó 90 - 99
<b>HTA: Estadío 2</b>	> 160	ó > 100

Tabla 1. Clasificación de la presión arterial según el 7º informe del Joint National Comitte americano.

En la guía europea estas cifras se definen como normal alta, siendo un concepto más real, ya que en ningún caso equivalen o predicen una hipertensión en los próximos años. Asimismo la guía europea, igual que sus antecesoras (WHO/ISH 1993 y 1999), valora el riesgo cardiovascular y su relación con las distintas categorías de la hipertensión.

<b>Categoría</b>	<b>Sistólica (mm de Hg)</b>	<b>Diastólica (mm de Hg)</b>
<b>Óptima</b>	< 120	< 80
<b>Normal</b>	120 - 129	80 - 84
<b>Normal alta</b>	130 - 139	85 - 89
<b>Hipertensión</b>		
<b>Grado 1 (ligera)</b>	140 - 159	90 - 99
<b>Grado 2 (moderada)</b>	160 - 179	100 - 109
<b>Grado 3 (severa)</b>	> 180	> 110
<b>Sistólica aislada</b>	> 140	< 90

Tabla 2. Definición y clasificación de la hipertensión arterial según la 1ª Guía Europea de manejo de la Hipertensión Arterial.

El 95 % de los casos de hipertensión consiste en una alteración multifactorial condicionada por factores genéticos como ambientales. Este tipo de hipertensión se denomina hipertensión esencial o primaria. Cuando los niveles de presión arterial están asociados a otras situaciones patológicas como la coartación de la aorta, la enfermedad renovascular, la enfermedad parenquimatosa del riñón, los tumores productores de renina o las enfermedades endocrinas como el aldosteronismo y el feocromocitoma se denomina hipertensión secundaria. Por otro lado la hipertensión puede verse condicionada por factores ambientales como la ingesta elevada de alcohol ó de sal, la vida sedentaria, el estrés, la ingesta baja de potasio ó de calcio, ó por otros factores como la obesidad, la resistencia a la insulina, la raza negra o el sexo masculino entre otras (Sever y Poulter, 1989).

## 1.2. CONSECUENCIAS DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL: LA ENFERMEDAD VASCULAR HIPERTENSIVA

La elevación de las cifras de presión arterial está asociada a alteraciones funcionales y estructurales de la pared arterial (Figura 1). Entre las alteraciones funcionales destacan la disfunción endotelial, las alteraciones en la respuesta a sustancias vasoactivas de las células de músculo liso vascular (CMLV) y diferenciación de las CMLV hacia un fenotipo secretor. De todas ellas, la disfunción endotelial se considera la alteración funcional más importante en hipertensión favoreciendo el desarrollo de arteriosclerosis (Gibbons, 1997, Luscher y Vanhoutte, 1986, Panza et al., 1995). La disfunción endotelial hipertensiva se caracteriza principalmente por una reducción en la relajación dependiente de endotelio y un aumento de la contracción dependiente de endotelio (Luscher and Vanhoutte, 1986, Miyamoto et al., 1998, Vazquez-Perez et al., 2001).

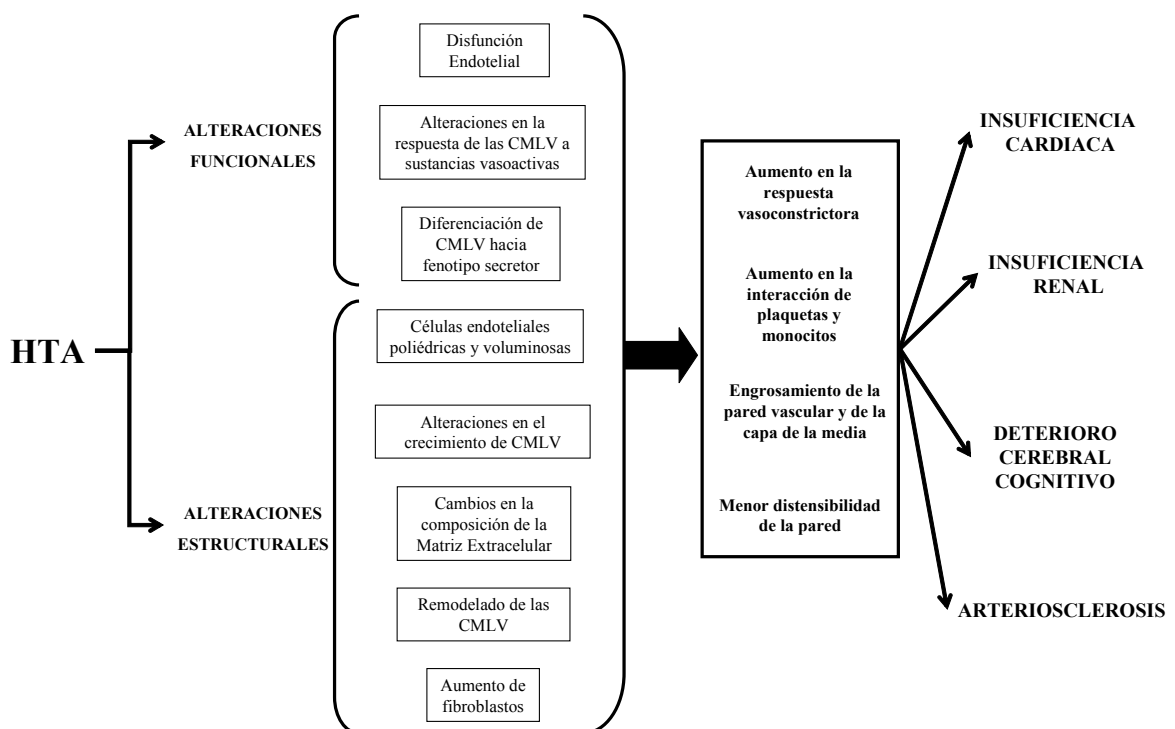


Figura 1. Alteraciones estructurales y funcionales asociadas a la enfermedad vascular hipertensiva y su afectación en órganos diana.

Las alteraciones estructurales asociadas a hipertensión son el cambio morfológico de las células endoteliales aumentando su volumen, las alteraciones en el

crecimiento de las CMLV, cambios en la composición de la matriz extracelular, remodelado de las CMLV y un aumento de los fibroblastos. El conjunto de alteraciones funcionales y estructurales provoca un aumento de la respuesta vasoconstrictora, un engrosamiento de la pared vascular así como de la capa media y una menor distensibilidad de la pared. Esta situación genera un daño orgánico asociado a manifestaciones clínicas como la insuficiencia cardíaca, infarto agudo de miocardio, angina de pecho, aneurisma disecante de la aorta, insuficiencia renal, deterioro cerebral cognitivo o arteriosclerosis. Las alteraciones estructurales y funcionales asociadas a la enfermedad vascular hipertensiva y la posterior afectación de los órganos diana son los componentes del llamado Continuo Vascular, que describe la transición de las manifestaciones clínicas asintomáticas (alteraciones estructurales y funcionales) generadas por los factores de riesgo cardiovascular (HTA, obesidad, diabetes), hacia daño orgánico y las manifestaciones clínicas sintomáticas finalizando en la muerte cardiovascular (Dzau and Braunwald, 1991, Luque, 2004).

### **1.3. LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA: EL MODELO EXPERIMENTAL**

La rata espontáneamente hipertensa (SHR, spontaneously hypertensive rat) es un modelo experimental muy utilizado que fue desarrollado en 1959 por Okamoto y Aoki (Okamoto y Aoki, 1963). La SHR empieza a tener niveles elevados de presión arterial a partir de la quinta semana de vida, y en la semana 12ª cuando alcanza la madurez, las cifras de presión arterial sistólica están alrededor de los 200 mm Hg. En este modelo experimental, la elevación mantenida de presión arterial desarrolla alteraciones en los órganos diana, corazón, riñón y cerebro, al igual que ocurre en la hipertensión arterial esencial en humanos. La rata SHR se considera el modelo animal idóneo de hipertensión esencial debido a su desarrollo con la edad y a la intervención de factores genéticos, humorales y nerviosos en el aumento de las resistencias vasculares (Yamori, 1976).

## **2. ENDOTELIO VASCULAR Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

El endotelio vascular está situado en una posición anatómica estratégica entre la sangre y la pared vascular, lo que le permite actuar como receptor y transmisor de señales. Las células endoteliales son capaces de liberar numerosos factores vasoactivos en respuesta a cambios hemodinámicos de la sangre como la presión, las fuerzas de cizalladura, los cambios en sus interacciones con las plaquetas o los leucocitos, las modificaciones de los mensajeros químicos circulantes o los procedentes de células vecinas. Actualmente el endotelio se considera como el principal “órgano” de regulación vascular con acción paracrina, autocrina y endocrina que está implicado en diversos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunitarios. Las células endoteliales pueden activar y desactivar hormonas circulantes, ya que en ellas se produce la internalización y degradación de la noradrenalina y serotonina circulantes por la monoamino-oxidasa, la conversión de angiotensina I (AI) en angiotensina II (AII) y la degradación de la bradiquinina (BK) por acción de la enzima de conversión de angiotensina (ECA) o la kininasa II. Además el endotelio es capaz de sintetizar y liberar sustancias vasoactivas como la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), la endotelina (ET), diversas prostaglandinas, el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), los heparinoides sulfato, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el activador del plasminógeno tisular (t-PA), el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), especies reactivas de oxígeno, interleuquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión de monocitos (ICAM-1, VCAM-1, ELAM, E-selectina) y otros (Tabla 3).

Todos estos factores modulan el tono y el crecimiento del músculo liso vascular, así como la coagulación, la fibrinólisis y la adhesión de células sanguíneas a la pared vascular. Ello hace del endotelio un verdadero sistema receptor y emisor de señales, que explica la razón por la que una hormona o los cambios en la hemodinámica sanguínea pueden modificar la función vascular sin tener acceso directo a todos los componentes de la pared vascular.

<b>FACTORES VASOACTIVOS</b>
<b>VASODILATADORES</b>
Óxido Nítrico (NO)
Prostaciclina (PGI <sub>2</sub> )
Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio (FHDE)
<b>VASOCONSTRICTORES</b>
Endotelina-1 (ET-1)
Tromboxano A <sub>2</sub> (TXA <sub>2</sub> )
Prostaglandina (PGH <sub>2</sub> )
<b>MODULADORES DEL CRECIMIENTO</b>
<b>PROMOTORES DEL CRECIMIENTO</b>
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)
Factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF)
Factor-1 de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1)
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)
Endotelina-1 (ET-1)
<b>INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO</b>
Heparinoides (HPS)
Factor de crecimiento transformante (TGF)
Óxido nítrico (NO)
Prostaciclina (PGI <sub>2</sub> )
<b>MODULADORES DE LA INFLAMACIÓN</b>
<b>MOLECULAS DE ADHESIÓN</b>
Molécula de adhesión endotelial de leucocitos (ELAM)
Molécula de adhesión intracelular (ICAM, PECAM)
Molécula de adhesión vascular (VCAM)
<b>FACTORES HEMOSTÁTICOS Y FIBRINOLÍTICOS</b>
Activador del plasminógeno tisular (t-PA)
Inhibidor del activador del plasminógeno tisular (PAI-1)
Trombomodulina
Factor von Willebrand (fvW)
Factor tisular (TF)

Tabla 3.- Factores y funciones endoteliales.

## 2.1. FUNCIONES DEL ENDOTELIO

Las principales funciones ejercidas por el endotelio son las siguientes:

**Barrera selectiva.** El endotelio constituye la frontera de los compartimentos intra y extravascular y actúa como una barrera con permeabilidad selectiva al tamaño y a la carga eléctrica que regula el flujo de macromoléculas y partículas lipídicas entre la sangre y el espacio extravascular a través de las uniones intercelulares. La permeabilidad del endotelio puede ser modificada en respuesta a diferentes estímulos que provocan la apertura de las uniones intercelulares y cambios en la forma de las células endoteliales (Mombouli y Vanhoutte, 1999, Wagner y Chen, 1991).

**Regulación del tono vascular.** El endotelio es capaz de modular el tono vascular manteniendo un equilibrio entre los factores vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y el factor hiperpolarizante dependiente de endotelio (EDHF), y los factores constrictores como la endotelina 1 (ET-1), y el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y derivados prostanoides (PGH<sub>2</sub>) (Furchgott y Vanhoutte, 1989). De los tres factores relajantes producidos por el endotelio, el NO se considera el más importante debido a la capacidad de ejercer un efecto tónico vasodilatador sobre la pared vascular, equilibrar las acciones de factores vasoconstrictores de acción local y de agentes con acción sistémica como la Angiotensina II (AII), las catecolaminas y la Vasopresina (VP) (Jaffe, 1996). Las acciones del NO serán ampliamente descrito más adelante.

**Regulación de la proliferación, crecimiento y migración de las células musculares lisas.** El endotelio regula la capacidad de proliferación del músculo liso vascular mediante la liberación de numerosos factores estimuladores e inhibidores del crecimiento que actúan localmente, bien aisladamente o en combinación, sobre las células del músculo liso modulando su capacidad proliferativa y migratoria (Scottburden y Vanhoutte, 1993).

**Regulación de la coagulación y fibrinólisis.** El endotelio participa en la regulación de la coagulación y fibrinólisis para mantener la fluidez sanguínea normal y detener las hemorragias en los lugares de lesión. En condiciones normales, el endotelio tiene carácter no trombogénico, aunque en determinadas situaciones fisiológicas y

fisiopatológicas, el endotelio es capaz de liberar sustancias que promueven la adhesión y la agregación de plaquetas y la coagulación (Wu y Thiagarajan, 1996).

**Regulación de la respuesta inflamatoria.** Las células endoteliales tienen un papel triple en la interacción leucocitaria. En primer lugar, las células endoteliales se activan por la acción de citoquinas proinflamatorias y comienzan a expresar moléculas de adhesión así como moléculas presentadoras de antígeno (MHC I y II). Estas moléculas de adhesión van a facilitar el reclutamiento de leucocitos hacia un foco inflamatorio. En segundo lugar, el endotelio modula la activación leucocitaria liberando sustancias quimiotácticas que permite la migración de monocitos al espacio extravascular y participar en las alteraciones inflamatorias. En algunas alteraciones patológicas como la vasculitis o la arteriosclerosis, el espacio subendotelial se convierte en un foco de inflamación. Finalmente, las células endoteliales que expresan ciertas moléculas de adhesión, citoquinas y antígenos se convierten en el objetivo de las moléculas derivadas de leucocitos que van a provocar la activación del endotelio, su disfuncionalidad y posteriormente la generación de señales que conducen a la apoptosis o muerte celular programada (Biedermann, 2001).

## **2.2. FACTORES VASODILATADORES Y VASOCONSTRICTORES**

### **VASODILATADORES**

Como ya se ha mencionado antes, los tres factores vasodilatadores producidos por el endotelio son el óxido nítrico, la prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio, siendo el principal el NO, ya que es el único que ejerce un efecto tónico vasodilatador sobre la pared vascular.

#### **Oxido Nítrico (NO)**

En 1980 Furchgott y Zawadzki descubrieron que la presencia de endotelio era necesaria para que se produjese la relajación de un anillo de aorta de conejo inducida por la acetilcolina (Ach). Dado que el experimento se realizaba en presencia de inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), se concluyó que la relajación endotelio-

dependiente producida por la Ach resultaba de la liberación de una sustancia difusible liberada por el endotelio que se llamó "endothelium derived relaxing factor" (EDRF), factor relajante derivado del endotelio (Furchgott y Zawadzki, 1980). En 1987 Palmer y cols. identificaron el EDRF como NO. Este se produce por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que cataliza la reacción de L-arginina, nicotín-adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y oxígeno para dar lugar a NO, citrulina y NADP. Esta enzima posee un grupo hemo y utiliza una serie de cofactores como la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), flavín-adenín dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN) (Alderton et al., 2001). Dicha síntesis se inhibe competitivamente por derivados estructurales como el N-monometil-L-arginina (L-NMMA), NG-nitro-L-arginina metilester (L-NAME) y otros (Palmer et al., 1988)

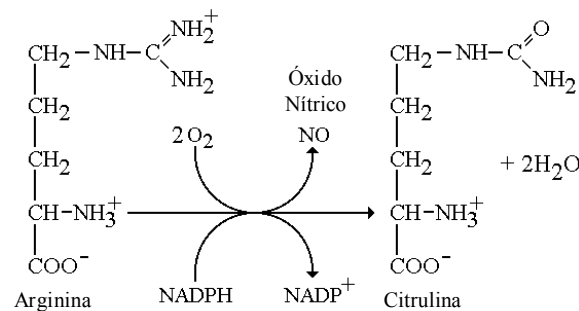


Figura 2. Biosíntesis de NO

Existen 3 isoformas de NOS, codificadas por 3 genes distintos con diferente localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores. La NOS<sub>n</sub> (Tipo I, NOS-1) es la isoforma constitutiva predominante en el tejido neuronal y renal; la NOS<sub>i</sub> (Tipo II, NOS-2) es inducible, y puede expresarse en gran variedad de células y tejidos, especialmente en los macrófagos estimulados por citoquinas, lipopolisacárido (LPS), y otros agentes pro-inflamatorios, aunque también está presente en células mesangiales, endoteliales y musculares lisas vasculares; la NOS<sub>e</sub> (Tipo III, NOS-3) fue descubierta inicialmente en las células endoteliales vasculares y se expresa de manera constitutiva. Las dos isoformas constitutivas están reguladas por la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> (Katusic y Cosentino, 1994).

La NOS<sub>e</sub> es la responsable de la producción de NO endotelial que desempeña una función fisiológica en el sistema vascular. Esta enzima está regulada por el flujo de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Lopez-Jaramillo et al., 1990). Diversos estímulos, como el estrés de fricción producido por el flujo de la sangre y la acción de agonistas como Ach y

bradikinina, inducen un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la unión con calmodulina, que regula la actividad de la enzima (Fleming, 1987, Nishida et al., 1992). Dicha actividad también está modulada por fosforilación de varios de sus residuos aminoacídicos (Fleming y Busse, 2003). Con independencia de su expresión constitutiva, la expresión de la NOSe puede verse incrementada en respuesta a diversos estímulos, como el flujo sanguíneo, factores de crecimiento, hormonas, etc. (Li et al., 2002). La NOSe también está regulada por interacción con la Caveola/Caveolina-1. Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática presentes en muchos tipos celulares. Estas estructuras tienen toda la maquinaria necesaria para la formación de vesículas, la fisión, el anclaje y la fusión con la membrana. Además, en muchos tipos celulares y en especial en el endotelio, hay una expresión importante de una proteína denominada caveolina-1 que está presente en la regulación de muchas rutas de señalización. En las células endoteliales, la NOSe se dirige a las caveolas y al aparato de Golgi donde se inhibe al unirse con la caveolina-1. La actividad de la NOSe se recupera cuando la interacción con la caveolina se interrumpe al unirse la NOSe a la calmodulina dependiente de calcio (Frank et al., 2003).

La NOSn se encuentra en tejidos como el SNC, especialmente en el cerebelo (Bredt, 1996), la médula espinal (Sheng et al., 1993), la hipófisis (Wolff y Datto, 1992), el pene (Ferrini et al., 2003), el músculo esquelético (Hussain et al., 1997) y el riñón (Wang et al., 1998) pero también está implicada en la regulación de la función de estos órganos (Bredt, 1999). La presencia de la actividad de NOSn en el cerebro y en el músculo esquelético determina que esta isoforma sea la mayor mediadora de la producción corporal de NO en los seres humanos. La NOSn es un enzima que, al igual que la NOSe, se expresa constitutivamente y está regulada principalmente por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Drew y Leeuwenburgh, 2002).

La NOSi es una enzima capaz de producir cantidades elevadas de NO de manera muy rápida. Se ha identificado su presencia en varias líneas celulares, como macrófagos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, células de Kupfer, hepatocitos, macrófagos alveolares e histiocitos (Bandaletova et al., 1993). La expresión de la NOSi se induce por estimulación con LPS o con citoquinas proinflamatorias, como IL-1, TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ . La NOSi es menos dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y su regulación tiene lugar principalmente a nivel transcripcional debido a que el promotor del gen contiene una serie de regiones de unión para factores de transcripción. Dentro de estas regiones, se

han identificado dos de gran importancia; la primera contiene regiones de unión para elementos de respuesta relacionados con el LPS, como IL-6 y el NF- $\kappa$ B. La segunda región más importante media la activación inducida por el IFN- $\gamma$  y por LPS (Lowenstein et al., 1993).

También existe una NOS en la mitocondria (NOSmt) que produce NO, el cual podría actuar como señal de comunicación intracelular, y por tanto jugaría un importante papel en la respiración mitocondrial. Además, la estimulación de la NOSmt induce liberación de citocromo c y aumento de la peroxidación lipídica (Drew y Leeuwenburgh, 2002). La isoforma NOSmt no está bien caracterizada, y mientras unos autores defienden que se trata de una isoforma constitutiva, otros consideran que es una variante de la NOSi (Moncada y Erusalimsky, 2002).

En cuanto al mecanismo de acción, el NO actúa mediante la activación del enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), incrementando los niveles intracelulares de guanosín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). El NO sintetizado en una célula difunde hacia la célula diana, donde se libera y fija al grupo hemo de la GCs, induciendo un cambio conformacional y la activación de dicho enzima, que transforma la guanosín 5'-trifosfato (GTP) en GMPc. El incremento posterior de los niveles intracelulares de GMPc modifica la actividad de diversas proteínas diana, como proteínas kinasa dependientes de GMPc, fosfodiesterasas reguladas por GMPc y canales iónicos regulados por GMPc (Drew y Leeuwenburgh, 2002). Además, el óxido nítrico se puede unir a otros enzimas que contiene un grupo hemo en su estructura, como la citocromo c oxidasa, así como a otros elementos de la cadena mitocondrial, regulando así la respiración celular (Gow y Ischiropoulos, 2001).

El NO es un factor de acción paracrina cuyas acciones principales son: la relajación del músculo liso vascular, la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición del crecimiento y la proliferación de las células del músculo liso y la inhibición de la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio. Como consecuencia, el NO desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la función, estructura e integridad vascular (Cohen et al., 1983, Dubey y Overbeck, 1994, Romero et al., 1992).

El NO se libera de las células endoteliales en respuesta a numerosos factores tanto físicos (Rubanyi y Vanhoutte, 1986), como de tipo humoral (Furchgott y Vanhoutte, 1989), siendo el principal factor físico las llamadas fuerzas de cizallamiento ejercidas por la sangre sobre el endotelio vascular y también factores humorales como la

Ach, BK, catecolaminas, AII, ET-1, vasopresina (VP), trombina, adenosín trifosfato y difosfato (ATP y ADP), sustancia P, ácido araquidónico, histamina, ionóforo de calcio (A23187), etc. El NO actúa como mediador local de los llamados vasodilatadores dependiente de endotelio, como la Ach y la BK, o como mediador de la acción vasodilatadora producida en procesos inflamatorios en respuesta a la histamina o BK. La liberación del NO en respuesta a ciertas hormonas como la AII, la VP y las catecolaminas sería responsable de la vasodilatación inducida por estas hormonas sobre territorios vasculares específicos, y modularía la acción constrictora de éstas producida por su interacción con receptores  $AT_1$ ,  $V_1$  o  $\alpha_1$  situados en las células musculares lisas.

### **Prostaciclina ( $PGI_2$ )**

Los prostanoides se producen por la acción de la ciclooxigenasa (COX) que convierte el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos (prostaglandina  $G_2$  y prostaglandin  $H_2$ ), los cuales sirven de sustrato a otras enzimas para producir la prostaglandina  $D_2$ , la prostaglandina  $E_2$ , la prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , la prostaglandina  $I_2$  (prostaciclina,  $PGI_2$ ), o el tromboxano  $A_2$ . Se han descrito receptores específicos para cada uno de estos metabolitos, así la  $PGD_2$ , el  $TXA_2$ , la  $PGI_2$ , la  $PGE_2$  y la  $PGF_{2\alpha}$  interaccionarán con los receptores DP (del inglés, D prostaglandin), TP, IP, EP y FP, respectivamente. La enzima que cataliza la síntesis de  $PGI_2$  es la prostaciclina sintasa (PGIS) localizada en el retículo endoplasmático de las células endoteliales y la membrana plasmática y nuclear de las CMLV. La prostaciclina que se produce cerca de la membrana plasmática puede difundir rápidamente o actuar localmente de manera paracrina o autocrina a través de los receptores de siete dominios transmembrana específicos para la prostaciclina. Por el contrario, la  $PGI_2$  producida cerca del núcleo actúa como un efector intracrino, ya que tiene rápido acceso al citoplasma y a los receptores activados del proliferador de peroxisoma (PPARs) y por tanto puede alterar el comportamiento celular al interaccionar con este factor de transcripción (Wise, 2003).

La  $PGI_2$  tiene un efecto vasodilatador a bajas concentraciones mientras que a elevadas concentraciones el efecto es vasoconstrictor (Williams et al., 1994). Sus acciones principales son inhibición de la agregación plaquetaria y relajación de las células musculares lisas. Los antiinflamatorios no esteroideos, que inhiben la producción de  $PGI_2$ , no tienen efecto sobre la presión arterial, lo que sugiere que la  $PGI_2$

no parece estar contribuyendo de forma relevante a la regulación del tono vascular en condiciones normales. Su función sobre el tono del músculo liso parece limitarse sólo a modular la acción de otros sistemas vasoactivos. Su mecanismo de acción celular depende de la activación de la adenilato ciclasa que produce un aumento del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en las células diana (Best et al., 1977). La PGI<sub>2</sub> tiene una vida media corta ya que como las demás PGs no se almacena en la célula, sino que se sintetiza y se libera por éstas en respuesta a diversos estímulos. A diferencia de las otras PGs que en su mayoría son degradadas principalmente por enzimas al pasar por la circulación pulmonar, la PGI<sub>2</sub> se inactiva mediante una degradación no enzimática al metabolito estable 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>, que puede aparecer en la circulación general. Este hecho ha servido de base para suponer que la PGI<sub>2</sub> sería la única PGs que tendría algunos efectos vasculares con cierta relevancia sistémica (Waldman et al., 1978). La PGI<sub>2</sub> es además un potente inhibidor de la liberación de mitógenos por las plaquetas, las células endoteliales y los macrófagos, por lo que tiene la capacidad de inhibir la proliferación de las células del músculo liso vascular.

Los principales factores capaces de estimular la síntesis y la liberación de la PGI<sub>2</sub> son la AII, la Ach o la BK y productos liberados de las plaquetas como la serotonina, la interleuquina-1 (IL-1) y el PDGF, así como los nucleótidos de adenina (Mitchell et al., 1992). La capacidad para sintetizar PGI<sub>2</sub> disminuye con la edad, la arteriosclerosis y la diabetes mellitus, lo que sugiere la existencia de un nexo entre la síntesis de PGI<sub>2</sub> en el endotelio y su vulnerabilidad en episodios de trombosis y aterosclerosis.

### **Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio (EDHF).**

El endotelio libera otro factor vasodilatador llamado EDHF (del inglés Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor), y produce la relajación del músculo liso vascular al inducir hiperpolarización de su membrana celular (Rubanyi and Vanhoutte, 1986). En los vasos sanguíneos de varias especies animales esta hiperpolarización es resistente a los inhibidores de la NOS y de la COX, por lo que la relajación endotelio dependiente no solo sería atribuible al NO o a la PGI<sub>2</sub> (Corriu et al., 1996, Murphy y Brayden, 1995) sugiriendo la existencia de otro factor responsable de dicha relajación. La naturaleza del EDHF no se conoce exactamente y durante un tiempo se consideró la posibilidad de que el EDHF fuera un metabolito del ácido araquidónico formado por la

acción del citocromo P450 (Cohen y Vanhoutte, 1995). Sin embargo, en los vasos sanguíneos de algunas especies los inhibidores del citocromo P450 no afectan a la hiperpolarización dependiente de endotelio.

La hiperpolarización y la relajación inducida por el EDHF parece ser debida a un incremento en la conductancia al  $K^+$  en la membrana del músculo liso vascular, a través de los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  e independientes de ATP, ya que no se inhibe en presencia de glibenclamida. Entre los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  implicados en la vasorelajación del EDHF, los que son capaces de producir una hiperpolarización en la membrana son los de conductancia intermedia y baja ( $IK_{Ca}$  y  $SK_{Ca}$ ) (Gluais et al., 2005).

No se conoce muy bien el papel fisiológico del EDHF en la regulación del tono vascular, aunque se sabe que se libera in vitro por acción de concentraciones elevadas de Ach o de BK (Fujii et al., 1992, Mombouli et al., 1992), sugiriendo la posible mediación parcial de la acción vasodilatadora de estos agentes. La contribución del EDHF a la relajación dependiente de endotelio varía en función de la arteria que se trate y del calibre de la misma. Este factor actúa fundamentalmente sobre la microvasculatura y los vasos de resistencia de pequeño calibre, por lo que parece jugar un papel importante en la regulación local de las resistencias periféricas vasculares. Diversos estudios sugieren además que el EDHF participa de manera especialmente importante en la circulación coronaria y en el lecho vascular mesentérico, ya que aproximadamente el 60% y el 70% respectivamente, de la respuesta vasodilatadora a agentes vasodilatadores dependientes de endotelio está mediada por el EDHF (Maeso et al., 1998, Vazquez-Perez et al., 2001).

## **VASOCONSTRICTORES**

### **Endotelina (ET)**

La ET fue descubierta a finales de la década de los 80. Es una proteína de 21 aminoácidos y es el metabolito final de un zimógeno o forma inactiva de la enzima. El gen de la endotelina codifica para la preproendotelina de 203 aminoácidos que bajo la acción de una endopeptidasa la transforma en big endotelina de 39 aminoácidos. Esta última es una pro hormona que se secreta y libera a la circulación; finalmente, la enzima

convertidora de endotelina (ECE) la transforma en Endotelina-1. Actualmente se conocen tres isoformas diferentes denominadas ET-1, ET-2 y ET-3, que sólo se diferencian en algún aminoácido de su secuencia. Las tres tienen actividad biológica, tan sólo se diferencian en su potencia farmacológica, siendo la ET-2 la de mayor acción vasoconstrictora y la ET-3 la de menor (Anggard et al., 1990, Coloccini, 2003, Yanagisawa y Masaki, 1989).

La ET-1 actúa a través de receptores específicos de los que se han descrito dos tipos, los ET<sub>A</sub> y los ET<sub>B</sub>. Los receptores ET<sub>A</sub> se localizan principalmente en las CMLV y en los cardiomiocitos. La estimulación de los receptores ET<sub>A</sub> activa la fosfolipasa C favoreciendo la señalización mediada por IP<sub>3</sub> y DAG que van a aumentar la concentración intracelular de calcio y la actividad de la PKC. Como consecuencia se produce vasoconstricción y proliferación celular. Los receptores ET<sub>B</sub> se encuentran predominantemente en las células endoteliales y en mucha menor medida en las CMLV y tienen similar afinidad tanto para la ET-1 como para la ET-3. La estimulación de los ET<sub>B</sub> produce tanto vasoconstricción como vasodilatación, esta última mediada por el incremento de la producción de NO y PGI<sub>2</sub>. La ET-1 tiene la capacidad de regular mecanismos a corto plazo como la contracción y la secreción de otros factores vasoactivos como la AII. A largo plazo, la ET estimula la proliferación de diversos tipos de células, lo que sugiere un posible papel en los procesos de crecimiento cardiovascular y renal como el remodelado vascular, la hipertrofia ventricular y alteraciones glomerulares proliferativas (Coloccini, 2003, Levin, 1995).

La ET-1 se sintetiza tanto en condiciones basales como en respuesta a estimulación mecánica, química y humoral. Los factores capaces de regular positivamente la expresión del gen de la endotelina son la AII, las catecolaminas, los factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ , la hipoxia, la insulina, las LDL oxidadas, el estrés mecánico y la trombina entre otros. Por otro lado hay factores capaces de regular negativamente la expresión genica y por tanto, reducir la liberación de ET. Estos son el NO, la PGI<sub>2</sub>, la ET-3, la PGE<sub>2</sub> o el péptido natriurético auricular. (Kon y Badr, 1991, Levin, 1995).

La endotelina podría participar en la patogénesis de la hipertensión o en su mantenimiento debido al efecto vasoconstrictor y acciones antinatriuréticas y proliferativas. En este sentido los antagonistas de receptores de endotelina han tenido una buena respuesta en modelos animales con renina baja y con sensibilidad a la sal e HTA severa (ratas DOCA, las ratas Dahl sensibles a la sal, las SHR-propensas al ictus,

la rata hipertensa con infusión de AII o la rata hipertensa alimentada con fructosa), reduciendo la presión arterial, mejorando la función endotelial y el remodelado vascular. Sin embargo, en las SHR o SHR tratadas L-NAME, no se observó ninguna mejoría con antagonistas de los receptores  $ET_{A/B}$  (Schiffrin, 1999).

### **TROMBOXANO $A_2$ (TXA<sub>2</sub>)**

El tromboxano es el resultado de la transformación del derivado del ácido araquidónico, la  $PGH_2$ , por la enzima tromboxano sintasa (TXS). El  $TXA_2$  fue descubierto a mediados de los 80, en experimentos realizados en anillos de aorta incubados con inhibidores de la COX, donde la vasoconstricción dependiente de endotelio que era inducida por aumentos de la presión transmural se bloqueaba, sugiriendo la presencia de un metabolito del ácido araquidónico (Luscher y Vanhoutte, 1986). La contracción dependiente de endotelio en anillos aórticos producida por la Ach en presencia de inhibidores de la NOS como el LNAME, también se bloquea con inhibidores de la COX así como con antagonistas de los receptores de  $TXA_2/PGH_2$  (Kung y Luscher, 1995). Por tanto, el  $TXA_2$  (Altiere et al., 1986) y la  $PGH_2$  (Kato et al., 1990) parecen ser los candidatos que lideran la vasoconstricción dependiente de endotelio.

El  $TXA_2$ , como los otros prostanoideos, ejerce sus acciones a través de su receptor específico denominado TP. El receptor TP es un receptor acoplado proteína G con 7 dominios transmembrana. Actualmente se conocen dos isoformas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de  $TXA_2$  que varían únicamente en el extremo carboxi-terminal localizado en el interior de la célula. El hecho de que existan estas isoformas explica las múltiples vías de transducción de señales activadas por este receptor a través de distintas isoformas de proteínas G pequeñas. Así, aunque ambos receptores activan la PLC, el  $TP\alpha$  activa la AC y por tanto aumenta los niveles de AMPc mientras que el  $TP\beta$  ejerce un efecto contrario, lo que va a generar respuestas divergentes a la acción del  $TXA_2$ , como la activación de la agregación plaquetaria o el cambio morfológico de las plaquetas (Narumiya et al., 1999).

La liberación del  $TXA_2$  y otras prostaglandinas vasoconstrictoras puede ser estimulada por distintos agentes vasoconstrictores como la propia ET, la serotonina, la NA y la AII (Manabe et al., 1989, Taddei y Vanhoutte, 1993), así como por agentes vasodilatadores (Ach), sustancias como la nicotina y el ionóforo A23187 y por acciones

mecánicas sobre el mismo endotelio. En consecuencia, el TXA<sub>2</sub> podría mediar las acciones vasculares de estos factores.

### **Isoprostanos (8-iso-PGF<sub>2α</sub>)**

En la década de los noventa, se descubrieron unos compuestos denominados isoprostanos, cuya estructura química era parecida a la de las prostaglandinas y que son el producto de la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico catalizada por radicales libres. Lo más relevante es que esta modificación del ácido araquidónico es independiente de la ciclooxigenasa (Morrow et al., 1992). La mayor fuente de los isoprostanos reside en la peroxidación de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de membrana. Además, la oxidación del ácido araquidónico esterificado es mucho más rápida que en la forma sencilla. De todos los isoprostanos existentes, el de mayor importancia es el 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, ya que produce importantes respuestas biológicas en distintos tipos celulares como endotelio, plaquetas, CMLV, epitelio y células inflamatorias entre otras. En el endotelio, el 8-iso-PGF<sub>2α</sub> induce la síntesis de ADN y la proliferación celular, la expresión del ARNm y de la proteína de la ET-1, la síntesis de TXA<sub>2</sub>, la formación de IP<sub>3</sub> y el aumento de calcio intracelular. En las CMLV los isoprostanos producen vasoconstricción siendo el 8-iso-PGF<sub>2α</sub> el de mayor efecto contráctil. Los isoprostanos, y en particular el 8-iso-PGF<sub>2α</sub> se generan de manera moderada en personas fumadores, alérgicas, asmáticas y en general en aquellos que desarrollan algún tipo de alteración respiratoria. Así mismo, se ha demostrado que en numerosas patologías cardiovasculares (renales, cerebrales, miocárdicas, la enfermedad coronaria, el ictus isquémico agudo, la hipercolesterolemia, la aterosclerosis y la preeclampsia) existen niveles elevados de isoprostanos. Los niveles de isoprostanos también están elevados en la hipertensión pulmonar y durante la exposición a agentes como la AII, los mediadores inflamatorios y factores de crecimiento. Finalmente, el 8-iso-PGF<sub>2α</sub> se utiliza como marcador de daño oxidativo y peroxidación lipídica en distintas patologías como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus y alteraciones hepáticas (Janssen, 2001, Reilly et al., 1998).

## 2.3. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

### 2.3.1. DEFINICIÓN DE RADICAL LIBRE

Los átomos están formados por un núcleo y electrones ( $e^-$ ). El núcleo está compuesto por neutrones y protones, mientras que los electrones se localizan en orbitales atómicos. Generalmente, cuando una molécula se genera a partir de la unión de los átomos, los orbitales moleculares se organizan y cada uno de ellos se ocupa por una pareja de electrones con diferente spin empezando siempre por los que tienen un menor nivel energético molecular. Si uno a más electrones se encuentran desapareados en los orbitales moleculares más externos, la molécula se denomina *radical*. Normalmente los radicales son especies químicamente muy reactivas, debido a que su electrón *libre* tiende a aparearse con otro electrón para estabilizarse, alterando la estructura y función de la molécula. Sin embargo, los radicales libres presentan una vida media extremadamente corta, entre  $10^{-6}$  y  $10^{-9}$  segundos. La presencia de electrones desapareados hace a estas moléculas altamente reactivas, ya que tienden a interactuar con otras moléculas próximas para aparear dichos electrones y estabilizarse (Matsuo y Kaneko, 2000). A pesar su reducida vida media, estas reacciones se producen frecuentemente en cadena, lo que supone una amplificación del daño.

Los radicales libres están implicados en la fisiopatología de diversas enfermedades y procesos patológicos, como la aterosclerosis, la hipertensión (Li y Shah, 2004, Taniyama y Griendling, 2003, Valgimigli et al., 2003) o las enfermedades neurodegenerativas (Reiter, 1998). Los radicales libres tienen otras funciones fisiológicas además de su papel como agentes dañinos, siendo efectores de la respuesta inflamatoria (acción bactericida, neutrófilos, macrófagos y linfocitos) o mensajeros químicos.

### 2.3.2. TIPOS DE RADICALES LIBRES Y ERO

Los radicales libres provienen en su gran mayoría del oxígeno, tomando la denominación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). El oxígeno es una molécula paramagnética, es decir, que tiene dos electrones ( $e^-$ ) desapareados en los orbitales moleculares más externos. Sin embargo, en lugar de formar enlaces  $\sigma-\pi$ , la molécula se reorienta para formar enlaces  $z-y$  consiguiendo la configuración de menor energía. De esta manera, se consigue la formación de dos enlaces de tres  $e^-$  cada uno, dos  $e^-$  de un átomo y un solo  $e^-$  del otro átomo de oxígeno según describió Linus Pauling para explicar su configuración electrónica. La molécula de Oxígeno, por tanto puede ser considerado como un birradical. Sin embargo, es bastante estable químicamente pero puede ser reducido por 4 transferencias sucesivas de un  $e^-$  denominándose a este proceso reducción univalente del oxígeno (Figura 3) (Cascales, 1999).

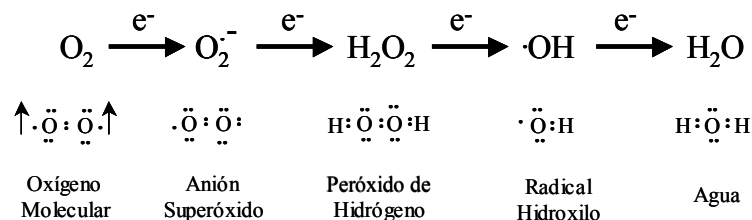


Figura 3. Reducción Univalente del Oxígeno. Formación de las principales ERO.

Esta reacción se da en la mitocondria mientras que en otros orgánulos subcelulares como el retículo endoplasmático, los peroxisomas y enzimas citosólicas se produce la reducción parcial del Oxígeno.

A continuación se describen brevemente las principales especies reactivas de oxígeno que se encuentran en los sistemas biológicos (Tabla 4).

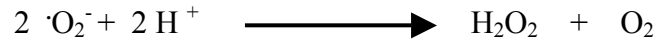
ESPECIES REACTIVAS	FÓRMULA	FORMACIÓN
<b>Radicales libres</b>		
<i>Radical superóxido</i>	$\cdot\text{O}_2^-$	Reducción de un electrón del oxígeno molecular en estado basal
<i>Radical hidroperoxilo</i>	$\text{HOO}\cdot$	Protonación del radical superóxido
<i>Radical hidroxilo</i>	$\cdot\text{OH}$	Reducción de un electrón del peróxido de hidrógeno y reducción de 3 electrones del oxígeno molecular en estado basal
<i>Óxido nítrico o monóxido de nitrógeno</i>	$\text{NO}$	Reducción de un electrón del nitrito
<i>Radical alcoxilo</i>	$\text{RO}\cdot$	Reducción de un electrón del hidroperoxido
<i>Radical peroxilo</i>	$\text{ROO}\cdot$	Oxidación de un electrón del hidroperoxido
<b>Especies no radicales</b>		
<i>Oxígeno singlete</i>	$^1\text{O}_2$	Excitación del oxígeno molecular en estado basal
<i>Peróxido de hidrógeno</i>	$\text{H}_2\text{O}_2$	Reducción de 2 electrones del oxígeno molecular en estado basal, seguida de protonación del ión peróxido
<i>Peroxinitrito</i>	$\text{ONOO}^-$	Reacción del NO con $\cdot\text{O}_2^-$
<i>Hidroperoxido</i>	$\text{ROOH}$	Autooxidación y oxigenación con $^1\text{O}_2$ de compuestos insaturados
<i>Ácido hipocloroso</i>	$\text{HClO}$	Hidrólisis del cloro molecular
<i>Ozono</i>	$\text{O}_3$	Oxidación del oxígeno molecular en estado basal con oxígeno atómico formado por fotólisis del oxígeno molecular en estado basal

Tabla 4. Principales Especies Reactivas de Oxígeno en los sistemas biológicos.

**Anión Superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ).** El anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) se genera cuando el oxígeno molecular acepta un  $e^-$ . Las cadenas de transporte de electrones de la mitocondria y del retículo endoplasmático son su principal fuente. También se produce durante la actividad fagocítica y bactericida de neutrófilos, macrófagos y linfocitos, generado por la actividad del complejo NAD(P)H oxidasa. Otros enzimas que generan  $\cdot\text{O}_2^-$  son la xantina oxidasa, aldehído oxidasa, indolamina dioxigenasa, citocromo p450, lipooxigenasa y prostaglandina sintetasa (Matsuo y Kaneko, 2000, Reiter, 1998).

Si se compara con otras ERO, el  $\cdot\text{O}_2^-$  tiene una reactividad muy baja en disolución acuosa. Sin embargo, en los sistemas biológicos es extremadamente dañino

porque se convierte fácilmente en auténticas especies reactivas de oxígeno. El radical  $\cdot\text{O}_2^-$  se convierte en peróxido de hidrógeno y oxígeno a través de una reacción de dismutación, que puede estar o no catalizada enzimáticamente por el enzima superóxido dismutasa (SOD):



La generación de ERO en el endotelio juega un papel importante en la fisiología y patogénesis de muchas enfermedades cardiovasculares. En particular, el  $\cdot\text{O}_2^-$  es capaz de inactivar rápidamente al óxido nítrico (NO) que es el factor relajante derivado de endotelio más importante, lo que genera disfunción endotelial que será descrita de manera más amplia en el siguiente apartado. Por otro lado, además del daño oxidativo, el  $\cdot\text{O}_2^-$  participa de manera activa en la alteración de la transcripción génica y proteica así como las actividades enzimáticas (Li y Shah, 2004). Recientemente se ha descrito la capacidad del  $\cdot\text{O}_2^-$  para inducir daño tisular a través de sus acciones proinflamatorias, como daño endotelial y aumento de la permeabilidad capilar, estimulación de la producción de agentes quimiotácticos, reclutamiento de neutrófilos, destrucción autocatalítica de neurotransmisores y hormonas, etc. (Salvemini et al., 2003). Con todos estos antecedentes no es de extrañar que se proponga el aumento en la producción vascular de radicales libres de oxígeno, en especial los aniones superóxido, como otro mecanismo principal que contribuye a la disfunción endotelial hipertensiva provocada por la inactivación del NO (Munzel et al., 1997, Nakazono et al., 1991).

**Peróxido de Hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).** El  $\text{H}_2\text{O}_2$  no se considera un radical puesto que no presenta  $e^-$  desapareados. Es relativamente estable, poco reactivo y puede actuar como un oxidante o reductor débil. Tiene una vida media mayor que otras ERO y puede atravesar membranas biológicas fácilmente, lo cual le permite desplazarse y producir daño a gran distancia de donde se genera, y lo que es más importante, su interacción con cationes metálicos, como  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , genera el radical más destructor, el radical hidroxilo. Por otro lado, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede inactivar algunas enzimas, por oxidación de grupos tiólicos esenciales, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Así, la exposición de las células a grandes cantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden producir depleción de ATP por inhibición de la glicolisis (Matsuo y Kaneko, 2000, Reiter, 1998).

La fuente principal de producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los sistemas biológicos es la dismutación del radical el  $\cdot\text{O}_2^-$ . Esta reacción está catalizada por la Superóxido

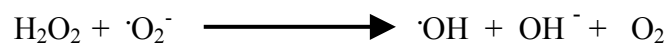
Dismutasa y se suele dar en microsomas, mitocondrias y células fagocíticas. También hay enzimas que producen  $H_2O_2$  directamente, como la monoamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo P450, etc.

**Radical Hidroxilo ( $\cdot OH$ ).** El radical hidroxilo tiene un potencial de oxidación muy alto lo que le confiere una gran reactividad. Es la ERO más reactiva y dañina. Tiene una vida media de  $10^{-9}$  s, por lo que reacciona prácticamente con cualquier biomolécula que se encuentre en su entorno. La reacción del  $\cdot OH$  con otras biomoléculas genera otros radicales con una reactividad menor pero con una gran capacidad para difundir lejos del lugar de su formación y provocar reacciones en cadena, como sucede en la peroxidación lipídica (Matsuo y Kaneko, 2000, Reiter, 1998).

En los sistemas biológicos, el  $\cdot OH$  se genera principalmente en la reacción de Fenton, por la que el  $H_2O_2$  reacciona con iones reducidos de metales de transición, generalmente  $Fe^{+2}$  y  $Cu^+$ , presentes como parte de los grupos prostéticos de múltiples enzimas y proteínas.



El  $\cdot OH$  puede generarse también en la reacción de Haber-Weiss, a partir de  $\cdot O_2^-$  y  $H_2O_2$ . En esta reacción, la participación del  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  actuaría como catalizador, acelerando la reacción.



Otra fuente de radicales  $\cdot OH$  es la lisis del agua o del  $H_2O_2$  por acción de las radiaciones ionizantes.

**Oxígeno Singlete ( $^1O_2$ ).** Se trata de una forma excitada de oxígeno que tiene los dos  $e^-$  apareados en el orbital molecular más externo, lo que le confiere una configuración energética mayor que el oxígeno molecular. Por tanto, no es un radical libre, pero sí que es una ERO, ya que puede reaccionar con la mayor parte de las biomoléculas, especialmente lípidos insaturados. Por lo tanto, está implicado en la peroxidación lipídica. El oxígeno singlete se genera por excitación luminosa del oxígeno pero siempre en compañía de pigmentos que hacen la función de sensibilizadores. También puede ser generado por la reacción del  $H_2O_2$  con el anión hipoclorito ( $ClO^-$ ) generado por la mieloperoxidasa durante la fagocitosis. Por tanto, podría jugar un papel bactericida en la respuesta inflamatoria (Matsuo y Kaneko, 2000, Reiter, 1998).

**Radical Peroxilo (ROO<sup>•</sup>).** Se forma a partir de hidroperóxidos orgánicos (ROOH) por pérdida de hidrógeno. Los hidroperóxidos se forman por acción del <sup>•</sup>OH o del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> sobre compuestos poliinsaturados, como por ejemplo la peroxidación lipídica (Matsuo y Kaneko, 2000, Reiter, 1998).

**Óxido Nítrico (NO) y Anión Peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>).** El NO es una molécula con múltiples funciones que participa de manera activa en la regulación de la función vascular, en la señalización celular, y en la respuesta inflamatoria (ver página 13). Sin embargo, en cantidades excesivas es un potente tóxico. El NO tiene un e<sup>-</sup> desapareado, y es un radical relativamente estable, por lo que no reacciona rápidamente con la mayoría de las biomoléculas. En cambio, interacciona fácilmente con metales de transición y otros radicales, incluido el oxígeno, radicales peroxilo y el <sup>•</sup>OH. La interacción con éstos dos últimos radicales juega un papel fundamental en el efecto dañino del NO (Matsuo y Kaneko, 2000, Reiter, 1998).

El peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) se forma al interaccionar el NO con el <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> y posteriormente se genera ácido peroxinitroso (ONOOH) que posteriormente se descompone en el radical hidroxilo (<sup>•</sup>OH) y el radical nitrito (<sup>•</sup>NO<sub>2</sub>), respectivamente, radicales altamente reactivos y participan en la peroxidación lipídica y en la nitración de ciertos aminoácidos que forman proteínas (Rubanyi, 1988). El NO puede ser inactivado por el grupo hemo de proteínas como la hemoglobina; ésta actúa como un secuestrador del NO intravascular, siendo ésta su principal ruta catabólica, la cual determina la formación de nitratos y nitritos presentes en la sangre (Murad y Webb, 1999).

### **2.3.3. FUENTES DE RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS**

**Cadena de transporte electrónico mitocondrial.** Es la productora principal de ERO y está constituida por una serie de enzimas cuyas actividades se acoplan para oxidar los sustratos metabólicos generando ATP en un proceso conocido como fosforilación oxidativa. El aceptor final de electrones es el oxígeno, que es reducido a agua durante el proceso. Alrededor de un 2% del oxígeno empleado por la mitocondria no es reducido completamente, y se escapa del sistema en forma de <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Xantina oxidasa (XO).** Es una enzima citosólica que genera  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante la oxidación de hipoxantina a xantina producida durante el metabolismo de la purinas. En condiciones normales, este enzima se presenta como una deshidrogenasa, la xantina deshidrogenasa, pero en situaciones de hipoxia, el enzima sufre una conversión a xantina oxidasa, que emplea oxígeno molecular como aceptor de electrones, con la consiguiente producción de xantina,  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Andrade, 2000).

**NAD(P)H Oxidasa.** Es una enzima descubierta inicialmente en células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos y monolitos/macrófagos) que cataliza la reacción de transferencia de un  $e^-$  desde el cofactor NADPH hasta el oxígeno para generar  $\cdot\text{O}_2^-$  durante el proceso de defensa activa del organismo frente a la infección por bacterias y hongos, proceso denominado explosión respiratorio. Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que esta enzima también está presente en diversos tipos celulares como el endotelio, las plaquetas, las CMLV los fibroblastos, los cardiomiocitos, las células mesangiales y el cuerpo carotídeo (Jones et al., 1996, Meier et al., 1991, Seno et al., 2001), siendo considerada actualmente la principal fuente de  $\text{O}_2^-$  en el sistema cardiovascular.

Las NADPH oxidasas vasculares no están totalmente caracterizadas. Se conoce que pueden tomar como sustrato tanto el NADH como el NADPH, a diferencia de la fagocítica que solo utiliza el cofactor fosforilado (Mohazzab and Wolin, 1994). Se encuentra activada de forma constitutiva, al contrario que la fagocítica que se activa al desencadenarse la explosión respiratoria. La variedad fagocítica al igual que la oxidasa de las células endoteliales generan el  $\cdot\text{O}_2^-$  hacia el exterior mientras que la de las CMLV lo genera intracelularmente. La NADPH oxidasa presente en las células endoteliales (Figura 4) está formada por distintas subunidades como p22phox, gp91phox, p67phox y p47phox (Griendling et al., 2000).

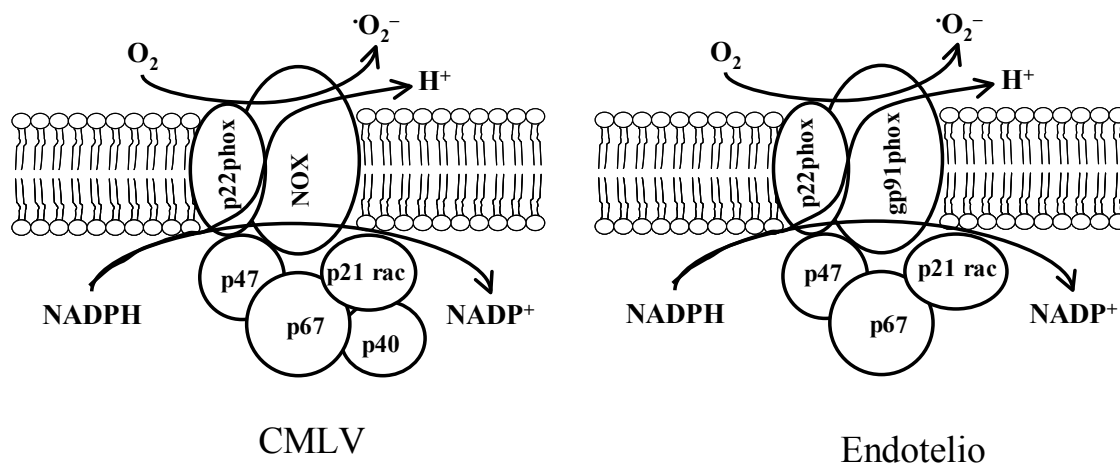


Figura 4. Estructura de la NADPH Oxidasa vascular. Nótese las distintas subunidades dependiendo del tipo celular, ya que en CMLV están presentes la gp91phox y sus homólogos el NOX1, NOX4 y NOX5. En el endotelio están presentes la gp91phox, NOX1 o NOX4.

En CMLV, la estructura es básicamente similar a la de las células endoteliales, a diferencia de las múltiples isoformas funcionales de la glicoproteína gp91phox tales como la NOX1, NOX 3, NOX4 y NOX5. Estas isoformas presentan una homología de secuencia entre el 45-56% respecto de gp91phox o NOX2 (Cheng et al., 2001).

En concreto, la subunidad p22phox es importante ya que sin su participación la actividad de la NADPH oxidasa se ve anulada (Ushio-Fukai et al., 1996). La función principal es el establecimiento de uniones entre la gp91phox y las subunidades citosólicas p47phox y p67phox (Dahan et al., 2002). Esta subunidad se expresa a bajos niveles en vasos normales pero en condiciones fisiopatológicas como la hipertensión o arteriosclerosis, se produce un aumento de expresión inducido por factores tanto hemodinámicos como humorales. Por ejemplo, se ha demostrado que la tensión cíclica es capaz de aumentar la expresión de la p22phox (Fukui et al., 1997, Matsushita et al., 2001). Respecto a los factores humorales hay diversas sustancias vasoactivas implicadas en el aumento de la expresión de esta subunidad como la Angiotensina II (Cediel et al., 2003, Fukui et al., 1997), la Aldosterona (Sanz-Rosa et al., 2005b), algunas citoquinas como el TNF- $\alpha$  y el INF- $\gamma$  (Dusi et al., 2001, Pagano et al., 1998) al igual que otros metabolitos como la glucosa y glutamina (Cosentino et al., 2003, Pithon-Curi et al., 2002). Por otro lado, tanto la dexametasona (Marumo et al., 1998) como los activadores/ligandos de los receptores activados de los proliferadores de los

peroxisomas PPAR-alfa y gamma respectivamente, tienen la capacidad de reducir su expresión (Inoue et al., 2001).

### **2.3.4. MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A LAS ERO**

Las células del organismo están constantemente expuestas a las especies reactivas que inducen una serie de daños en las distintas macromoléculas. El organismo ha desarrollado una batería de mecanismos de defensa, generalmente conocidos como antioxidantes, para protegerse de la acción de dichos radicales. Estos antioxidantes actúan evitando la formación de radicales, neutralizándolos o facilitando la reparación del daño inducido. Estos antioxidantes se dividen clásicamente en dos subgrupos: enzimáticos y no enzimáticos.

#### **ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS**

Aunque dentro de este apartado podríamos incluir otros elementos, como las enzimas de reparación del daño oxidativo a DNA, proteínas y lípidos (nucleasa, proteasa, fosfolipasa, etc.), nos centraremos en aquellos que actúan directamente sobre las especies reactivas generadas (Ji and Hollander, 2000).

**Superóxido Dismutasa (SOD).** Existen tres tipos de SOD, en función del ión metálico acoplado al sitio catalítico. La SOD que contiene cobre y zinc (CuZn-SOD) se encuentra en el citosol de las células eucariotas, mientras que la SOD que contiene manganeso (Mn-SOD) se localiza en la matriz mitocondrial. En mamíferos, la mayor actividad SOD se encuentra en el hígado, seguida de riñón, cerebro, adrenal y corazón. La SOD constituye la primera línea de defensa enzimática frente a la producción de radicales intracelulares (Figura 5).

**Glutathion Peroxidasa (GPx).** La GPx cataliza la reducción del  $H_2O_2$  y los hidroperóxidos orgánicos a  $H_2O$  y alcohol, respectivamente, usando glutathión reducido (GSH) como donante de electrones. La GPx es un homotetrámero presente en el citosol y la matriz mitocondrial de las células. Su actividad es alta en el hígado y los eritrocitos y moderada en cerebro, riñón y corazón. La expresión de su gen está regulada por

factores como la tensión de oxígeno, la tasa metabólica, el crecimiento, y las toxinas y xenobióticos.

La reducción del glutatión oxidado (GSSG) generado en estas reacciones está catalizada por el enzima glutatión reductasa (GRed), que emplea el NADPH como agente reductor. Esta reacción sucede simultáneamente a la catalizada por la GPx, lo que da lugar a un ciclo de oxidación-reducción para la regeneración de GSH a partir de GSSG. El NADPH es generado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y otros enzimas (Figura 5).

**Catalasa (CAT).** Este enzima cataliza la descomposición de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ . Se localiza principalmente en los peroxisomas, y su distribución tisular es similar a la de SOD (Figura 5).

#### **ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS** (Ji y Hollander, 2000).

**Glutatión (GSH).** El GSH es un tripéptido tiólico presente en la mayoría de las células de animales y plantas. Está constituido por tres aminoácidos: glutámico, cisteína y glicina. El grupo tiol de la cisteína le confiere capacidad para intervenir en reacciones redox. Es uno de los antioxidantes más abundante de la célula, reaccionando directamente con los radicales libres, o bien por medio de la GPx (Figura 5). También parece intervenir en la reducción de diversos antioxidantes celulares, como la vitamina E. Con la excepción del cristalino, la mayor concentración se encuentra en el hígado (5-7 nM). El hígado es el órgano más importante que participa en la regulación del metabolismo redox sistémico, debido a una serie de enzimas claves que participan en el aclaración de las especies reactivas de oxígeno y en la producción del agente sistémico antioxidante más importante como es el GSH ya que proporciona aproximadamente el 90% del GSH circulante en condiciones fisiológicas (Halliwell y Gutteridge, 1995, Kaplowitz et al., 1985, Yu, 1994). Las células hepáticas parenquimatosas, a parte de proporcionar GSH para sus necesidades específicas, exporta GSH donde se utiliza como una fuente sistémica de capacidad tiol-reductora (Kidd, 1997). De esta manera parece que la defensa antioxidante hepática contribuye al estado redox sistémico (Carbonell et al., 2000, Suzuki et al., 2000), y por consiguiente podría afectar tanto a la disponibilidad de NO así como a la función endotelial.

Otros órganos que contienen altas concentraciones de GSH son el pulmón, riñón, corazón y glóbulos rojos.

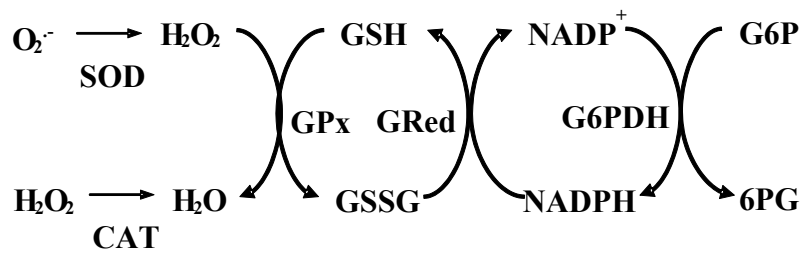


Figura 5. Enzimas antioxidantes y ciclo redox del glutatión.

**Vitamina E.** Se trata de una familia de compuestos fenólicos altamente lipofílicos, por lo que tienden a concentrarse en las membranas biológicas y lipoproteínas plasmáticas, especialmente en la membrana mitocondrial interna, jugando un papel fundamental en la protección frente a peroxidación lipídica de las membranas celulares. Se encuentra en hígado, corazón, pulmón y tejido adiposo, especialmente en el tejido adiposo pardo. El organismo no puede sintetizar esta molécula, así que su presencia en el organismo depende exclusivamente de la ingesta. Las principales fuentes alimentarias de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, soja, algodón) y sus productos derivados, las nueces, el germen de trigo y algunos vegetales de hojas verdes.

**Vitamina C.** A diferencia de la vitamina E, la vitamina C o ácido ascórbico es una molécula hidrosoluble presente en el citoplasma de las células y en el fluido extracelular. Aunque puede interaccionar directamente con los radicales  $\cdot O_2^-$  y  $\cdot OH$ , parece que su principal función es participar en el reciclaje de la vitamina E. En determinadas condiciones, puede actuar como pro-oxidante *in vitro*. Al igual que la vitamina E, no puede ser sintetizada por los humanos, por lo que ha de ser adquirida por la ingesta de alimentos como las frutas (especialmente los cítricos, las cerezas y el melón) y algunos vegetales (tomates, coliflor, col, brócoli).

**Otros antioxidantes.** Los carotenoides son colorantes naturales (tomate, zanahoria, cítricos, espinacas, maíz) capaces de neutralizar al  $^1O_2$  y de inhibir la peroxidación lipídica. Los flavonoides son un grupo de antioxidantes polifenólicos presentes en

frutas, verduras y bebidas (té, vino, cerveza), capaces de reaccionar con radicales peroxilos,  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\cdot\text{OH}$ .

### **2.3.5. ACCIONES DE LAS ERO**

#### **FISIOLÓGICAS**

Los radicales libres parecen ejercer un cierto papel en algunos procesos fisiológicos, como la regulación génica, la replicación celular, la diferenciación y la apoptosis, probablemente actuando como mensajeros secundarios en las vías de transducción de señales (Troen, 2003). Entre las vías de señalización activadas por los radicales y especies reactivas están la vía de las MAPK, el NF- $\kappa$ B, la JNK, etc. Es bien conocido que las especies reactivas son uno de los elementos implicados en la respuesta a patógenos (por parte de los neutrófilos).

#### **ACCIONES PATOLÓGICAS. ESTRÉS OXIDATIVO**

El llamado estrés oxidativo se produce como consecuencia de la alteración del equilibrio entre las especies oxidantes y los antioxidantes. Así, se deberá a un exceso de producción de especies reactivas, a una deficiencia de agentes antioxidantes o a una conjunción de ambas circunstancias. El exceso de especies reactivas inducirá una serie de alteraciones en las distintas macromoléculas que alterarán tanto su estructura como su función, afectando a la fisiología y a la supervivencia de la célula respectivamente.

**Daño al ADN.** Las especies reactivas, y especialmente el radical  $\cdot\text{OH}$ , reaccionan con los dobles enlaces de las bases púricas y pirimidínicas del ADN, generando derivados como formamidopirimidinas, 7-metilguanina, 3-metiladenina, O-6-metilguanina, 8-nitroguanina y 8-OH-deoxiguanosina. Éste último, a pesar de participar en un 5% del total de daño oxidativo al ADN, tiene una alta capacidad mutagénica. Por eso, se utiliza normalmente como marcador de daño oxidativo al ADN (Hamilton et al., 2001b). Tal daño puede abarcar desde la alteración puntual del ADN, eliminada por los sistemas de reparación o carente de repercusiones fisiológicas, hasta la inducción de apoptosis o de un proceso neoplásico.

El daño inducido al ADN mitocondrial (mtADN) es muy importante ya que está expuesto a grandes cantidades de especies reactivas generadas durante la respiración mitocondrial y la mitocondria carece tanto de sistemas eficaces de reparación de ADN como de histonas. Además, las proteínas codificadas por el mtADN son vitales para el mantenimiento de la función celular, ya que están relacionadas, con la cadena respiratoria mitocondrial y con la generación de ATP (Shigenaga et al., 1994).

**Daño oxidativo a lípidos: Peroxidación Lipídica.** Se trata de un proceso por el cual los lípidos, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), son atacados por radicales libres, originando una reacción en cadena que se autopropaga hasta oxidar, teóricamente, todos los ácidos grasos del sistema afectado (membrana celular, membrana mitocondrial, etc.).

Este proceso parece desarrollarse en tres fases: iniciación, propagación y terminación. La peroxidación lipídica se inicia con la captación de átomos de hidrógeno de los AGPI (LH), los más susceptibles a este proceso, por parte de radicales libres ( $R^\bullet$ ), generalmente  $\cdot OH$ , aunque también pueden iniciar este proceso el  $^1O_2$  y el  $ONOO^-$ . Esta captación genera un radical alquílico centrado por un carbono ( $L^\bullet$ ), el cual reacciona con el  $O_2$  y forma un radical peróxido ( $LOO^\bullet$ ). Los iones metálicos pueden actuar como facilitadores de esta fase de iniciación. En la fase de propagación, el radical  $LOO^\bullet$  formado puede arrancar un átomo de hidrógeno de otro AGPI adyacente, generando un lipoperóxido ( $LOOH$  o  $LPO$ ) y otro  $L^\bullet$ , pudiéndose propagar así la reacción hasta que todos los AGPI hayan sido oxidados. En la fase de terminación dos radicales interaccionan, formando una especie no radical, finalizando así el proceso de peroxidación lipídica.

En este proceso se generan diversas moléculas características, como lipoperóxidos, hidroxinonales, malonildialdehído, dienos conjugados y otros subproductos, muchos de los cuales pueden ser cuantificados por diversos métodos y así utilizarse como marcadores de estrés oxidativo.

Los radicales libres reaccionan rápidamente con las membranas biológicas (celular, mitocondrial, sistema microsomal, etc.) ricas en AGPI, generando productos citotóxicos. Estos productos pueden afectar a macromoléculas vecinas y alteran las características físico-químicas de las membranas afectadas, como su estructura y su fluidez, que son fundamentales para el mantenimiento de la movilidad lateral y para la correcta funcionalidad de las proteínas integrales de membrana. Todas estas alteraciones

son especialmente significativas en la mitocondria, cuya fisiología depende de una apropiada función de su membrana y proteínas integrales (Oh-ishi et al., 2000).

**Oxidación de proteínas.** Los residuos de aminoácidos de las proteínas son susceptibles de sufrir modificaciones inducidas por especies reactivas, originando grupos carbonilo, hidroperóxidos y derivados nitrosilados (Drew y Leeuwenburgh, 2002, Radak y Goto, 2000). Estos procesos inducen alteraciones de la estructura y función de las proteínas, lo que afectaría a la fisiología celular. Las proteínas así modificadas son degradadas por proteasas, constituyendo este sistema de oxidación-proteolisis un mecanismo de recambio proteico (Stadtman, 1992). Dentro de las proteínas afectadas por los procesos de oxidación y nitrosilación, destacan las de la cadena respiratoria mitocondrial, que estarían especialmente expuestas debido a la generación de especies reactivas que tiene lugar durante su propia función y por los derivados tóxicos de la peroxidación lipídica.

### **2.3.6. HIPERTENSIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO**

En los últimos años se ha demostrado que el estrés oxidativo participa de manera decisiva en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. Uno de los primeros indicios de esta participación resultó de los trabajos desarrollados en SHR. Nakazano et al. estudiaron el papel del anión superóxido y enzimas relacionadas como la SOD, en la enfermedad vascular hipertensiva y observaron que el  $\cdot\text{O}_2^-$  participaba de manera activa en la patogénesis de la hipertensión en ratas (Nakazono et al., 1991a). Recientemente, y como se ha comentado con anterioridad, la investigación se ha centrado en la fuente de producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  en el tejido vascular así como la capacidad de modular la presión arterial. En este sentido varios grupos de investigación han mostrado que tanto el endotelio como las CMLV contienen oxidasas asociadas a membrana que utilizan como sustrato NADH o NADPH para la transferencia electrónica al oxígeno molecular. La producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  por la NADPH oxidasa de los neutrófilos es masiva cuando éstos están activados, mientras que la oxidasa vascular está en una cantidad de 0.1 respecto de la presente en fagocitos pero su producción es constante. El superóxido generado por las CMLV suele ser intracelular, y solamente una pequeña cantidad se libera al exterior como ocurre en los fagocitos. Tanto la Angiotensina II como algunas citoquinas son capaces de regular la NADPH oxidasa vascular. Así, cultivos de CMLV incubadas con

AII presentan un aumento en la producción de anión superóxido y  $H_2O_2$ . Este aumento en la liberación de  $\cdot O_2^-$  parece ser esencial en la hipertrofia de las CMLV inducida por AII. La producción exagerada de superóxido por el músculo liso vascular provocado por AII se asocia con una reducción en la relajación vascular endotelio dependiente. Estudios en ratas con hipertensión inducida por AII e inyectadas con liposomas que contienen SOD presentan una reducción de unos 60 mm de Hg en la PAS. Estos datos indican que la angiotensina elevada, en algunas condiciones de hipertensión, aumenta la producción de superóxido vascular. En estos estudios, la progresión de la expresión de p22phox, y el establecimiento de la hipertensión, corren en paralelo durante la infusión crónica de AII (Harrison et al., 1999).

Es importante destacar que las ERO y en particular el anión superóxido pueden tener efectos sobre la función vascular independientes del NO. Así, los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  en el músculo liso vascular podrían estar elevados por EROs que interactúan con la recaptación de calcio por parte del retículo sarcoplásmico. Además, y como se ha mencionado anteriormente, las ERO pueden reaccionar con los ácidos grasos de la membrana plasmática y así producir prostanoides que pueden detectarse en la sangre de aquellos individuos que tienen un estrés oxidativo elevado como por ejemplo individuos hipercolesterolémicos, diabéticos y fumadores. Estos prostanoides actuarían sobre los receptores de prostaglandina  $H_2$  / Tromboxano, lo que incrementaría la vasoconstricción.

## **2.4. FACTORES DE CRECIMIENTO**

Los factores de crecimiento son moléculas peptídicas que actúan de manera local, aisladamente o en combinación, para promover la síntesis de proteínas y el crecimiento celular a través de la interacción de receptores específicos de membrana citoplasmática y la consiguiente activación de protooncogenes (Scottburden and Vanhoutte, 1993). Entre los diversos factores de crecimiento cabe mencionar el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGFb), el factor-1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de crecimiento conectivo tisular (CTGF). Todos estos factores pueden inducir la proliferación de células del músculo liso vascular y generalmente no se

expresan en condiciones normales.

**FGF.** Los factores de crecimiento fibroblástico mejor caracterizados, distribuidos en las fibras musculares lisas arteriolares, células endoteliales, fibroblastos y miocardiocitos son el FGFa y el FGFb, que son los únicos que se expresan en tejidos adultos y se liberan en respuesta al daño celular. Estimulan la formación de neointima muscular y previenen la apoptosis en las células musculares lisas. Sin embargo, durante las fases más avanzadas de la aterosclerosis, la placa fibrosa comienza a vascularizarse debido a factores de crecimiento como el FGFb y otras moléculas que promueven la angiogénesis. Este proceso puede tener un papel clave en la estructura de la placa como consecuencia de las diferentes alteraciones que pueda sufrir, tales como la ulceración, fisura o rotura, seguida por hemorragia y por la formación del trombo, el cual origina una estenosis significativa en el vaso.

**TGF- $\beta$ .** Otro de los factores de crecimiento sintetizado por el endotelio es el TGF- $\beta$ , que participa en los procesos de angiogénesis así como en los procesos inflamatorios y de reparación cardiovascular tras lesiones isquémicas. Su origen no es exclusivamente endotelial sino que también es sintetizado por las plaquetas y los cardiomiocitos (Waltenberger, 1997). Normalmente está en forma latente y la presencia de determinadas enzimas como la plasmina o condiciones ácidas estimula su liberación en la forma activa, promoviendo la síntesis de fibronectina, colágeno, glicosaminoglicanos y proteoglicanos.

**CTGF.** Recientemente, se ha descrito un nuevo mediador profibrótico denominado factor de crecimiento conectivo tisular (CTGF), que juega un papel importante en el desarrollo y progresión de la arteriosclerosis. El CTGF, también denominado CCN2, es una proteína rica en cisteínas que posee un péptido señal en el extremo N-terminal lo que indica que es una proteína que se secreta. El CTGF se produce en multitud de órganos como el corazón, cerebro, placenta, hígado, pulmón, músculo, endotelio, riñón y páncreas siendo más abundante en el riñón (Oemar y Luscher, 1997). Las funciones fisiológicas del CTGF son la proliferación y diferenciación celular, la adhesión celular, la angiogénesis y la síntesis de proteínas de matriz extracelular como la fibronectina y diferentes tipos de colágenos. El TGF- $\beta$  es su principal inductor, pero también se ha visto que otros factores como el estrés mecánico, la angiotensina II, la glucosa y el

factor VIIa estimulan la expresión de CTGF en CMLV. Sin embargo el PDGF, el EGF o el FGFb no inducen su expresión. Los factores que inhiben la síntesis de CTGF son el TNF- $\alpha$ , el AMPc y el NO, entre otros. Esto explica el hecho de que exista una sobreexpresión de CTGF en placas de ateroma humanas, en zonas fibróticas de pacientes infartados, en el riñón de pacientes diabéticos así como en la aorta de ratas tratadas con AII. En las lesiones ateroscleróticas, el CTGF podría mediar algunos de los efectos del TGF- $\beta$  como la estimulación de la producción de proteínas de la matriz extracelular. De hecho, las CMLV que expresan CTGF se localizan principalmente en zonas donde se acumula la matriz extracelular y especialmente a lo largo del hombro de la capa fibrosa (Ruperez et al., 2003). El mecanismo a través del cual el TGF- $\beta$  induce la expresión de CTGF consiste en una red compleja de interacciones transcripcionales, donde participan por un lado las proteínas Smad, la proteína quinasa C, y el complejo Rho-Ras / Proteinkinasa mitógena activada (MEK) / quinasa de señalización celular regulada (ERK), y por otro la cascada de señales formada por las proteínas tirosin kinasas denominadas janus kinasa JNK y las MAPK (Leask et al., 2003). Sin embargo, se ha sugerido que el CTGF podría regular alguna acción profibrótica de los glucocorticoides que sería independiente del TGF- $\beta$ , ya que la dexametasona activa la síntesis de CTGF mientras inhibe la de TGF- $\beta$  (Yokoi et al., 2002). La expresión del CTGF en arterias de individuos sanos suele ser baja, sin embargo, se sobreexpresa en arterias con lesión aterosclerótica localizándose en las CMLV de la íntima y en áreas con acumulación de matriz extracelular y fibrosis (Oemar and Luscher, 1997). Recientemente se ha observado que en pacientes con diabetes tipo 1 y nefropatía, los niveles de CTGF plasmáticos estaban aumentados. La diabetes va acompañada de ciertas complicaciones como la enfermedad cardiovascular, la nefropatía, la neuropatía o retinopatía donde los factores de crecimiento como el CTGF tienen un papel importante en su desarrollo (Roestenberg et al., 2004). Asimismo, la hipertensión lleva asociada una serie de cambios estructurales en las arterias, entre los que destacan la hipertrofia de las CMLV, la acumulación de colágeno y fibronectina y la destrucción de las fibras elásticas entre otros. Aunque se conoce poco acerca del impacto que tiene la hipertensión sobre este factor de crecimiento, podría existir una asociación entre los cambios estructurales y las funciones del CTGF. En estudios in vitro se ha observado que la AII aumenta tanto la expresión génica como la producción del CTGF en CMLV. Además esta sobreexpresión inducida por AII es independiente del efecto de la presión

arterial. Se han descrito también otros mecanismos a través de los cuales puede actuar el CTGF. Así, otros autores han descrito que los antioxidantes bloquean la producción de CTGF, lo que sugiere que las especies reactivas de oxígeno aumentarían su expresión (Ruperez et al., 2003). En otro estudio, el tratamiento con estatinas reduce la expresión de CTGF debido a que la inhibición de las proteínas Rho isopreniladas interfiere con la inducción del CTGF por parte del TGF- $\beta$ . Asimismo, las as glitazonas (agonistas de los receptores activados del proliferador de peroxisomas, PPAR gamma) también redujeron la expresión de CTGF pero a través de las proteínas Smad3 (Fu et al., 2001, Heusinger-Ribeiro et al., 2001).

**PDGF y VEGF.** El PDGF es un fuerte mitógeno de las células del músculo liso vascular y fibroblastos, que puede mediar la actividad proliferativa en la aterogénesis y la restenosis. El PDGF participa en la formación de la neointima durante el daño endotelial de los grandes vasos directa o indirectamente, ya que regula el FGFb y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El VEGF promueve la neovascularización y estimula el crecimiento de endotelio tras angioplastia. Los factores de crecimiento similares a la insulina, con acciones parecidas a las de la hormona; además, aumentan la proliferación de las células musculares vecinas. El CTGF compite por el receptor del PDGF en fibroblastos inhibiendo su función proliferativa a través de un mecanismo parecido a la apoptosis.

## **2.5. AGREGACIÓN PLAQUETARIA, COAGULACIÓN Y FIBRINOLISIS**

En condiciones normales las células endoteliales mantienen un estado antiagregante y antitrombótico que permite la fluidez sanguínea al liberar factores anticoagulantes y fibrinolíticos como la antitrombina, la trombomodulina, la proteína S y el t-PA que favorece la acción fibrinolítica de la plasmina (Pearson, 1999). Sin embargo, en situaciones de daño endotelial se produce un aumento de la actividad procoagulante consecuencia fundamentalmente, de la interacción del factor tisular y el factor VIIa que favorece finalmente la producción de trombina (Holvoet and Collen, 1997). Se ha observado que la expresión del factor tisular aumenta en las lesiones ateroscleróticas humanas (Fei et al., 1993). Este aumento de la actividad es mediado por las LDL oxidadas no sólo en las células endoteliales sino también en los macrófagos. Asimismo, las LDL oxidadas aumentan la agregación plaquetaria promoviendo la

liberación de TXA<sub>2</sub> que ejerce su efecto vasoconstrictor sobre el músculo liso y favorece la tendencia a la formación del trombo. Estas lipoproteínas, también aumentan la actividad coagulante del endotelio al reducir el inhibidor del factor tisular (Sato et al., 1998) y al prevenir también la inhibición de la trombina reduciendo la activación de la proteína C (Holvoet and Collen, 1997).

Los eventos vasculares agudos suelen aparecer como consecuencia de un proceso aterosclerótico donde las LDL favorecen un aumento de la coagulación y de alteraciones de la fibrinólisis (Dart and Chin-Dusting, 1999, Holvoet and Collen, 1997). El balance que en condiciones normales se produce entre el t-PA y el PAI-1 es alterado por los lípidos plasmáticos, especialmente por las VLDL que van a aumentar la expresión del ARN mensajero del PAI-1 (Badimón y Martínez-Gonzalez, 2001, Holvoet y Collen, 1997). Asimismo, la hipercolesterolemia va asociada a una disminución de los niveles de t-PA como hemos observado en conejos alimentados con una dieta enriquecida con 1% de colesterol (Oubina et al., 2002).

## **2.6. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

En condiciones normales, las células endoteliales modulan la función vascular regulando el tono vasomotor, controlando el intercambio entre los compartimentos extra e intravascular, inhibiendo la activación y la agregación plaquetaria, la trombogeneidad de la sangre, la adhesión de leucocitos a las células endoteliales y la proliferación y crecimiento de las células del músculo liso (Gibbons, 1997b, Haller et al., 1997, Jaffe, 1996). Para que el endotelio pueda ejercer todas estas funciones es necesario la integridad anatómica y funcional del mismo. Los llamados factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia, la hipertensión, la diabetes y el tabaquismo, modifican las condiciones del entorno de las células endoteliales produciendo aumentos de la presión transmural, la fuerza de fricción de la sangre sobre las células endoteliales, las concentraciones de lípidos y cambios en las concentraciones de diversos mensajeros humorales. En estas condiciones, el papel homeostático que ejerce el endotelio sobre la función vascular se pierde como consecuencia de cambios en el patrón de producción y liberación de factores derivados del endotelio. Esta situación de desequilibrio se denomina disfunción endotelial (Haynes y Webb, 1998, Mombouli y Vanhoutte, 1999) y en un sentido amplio se caracteriza por:

1) una alteración de la regulación del tono vasomotor con predominio del tono vasoconstrictor, debido al desequilibrio entre factores relajantes y constrictores y donde

las especies reactivas de oxígeno juegan un papel determinante.

2) una tendencia al crecimiento de la pared vascular que puede ser debido a un aumento del número y/o tamaño de las células musculares lisas y/o fibroblastos, una disminución de la apoptosis de éstas y/o un aumento de la síntesis de matriz extracelular.

3) un incremento en la permeabilidad del endotelio, con la consiguiente pérdida de la función de barrera selectiva para diversas partículas y macromoléculas.

4) un aumento de la adhesión de leucocitos debido a la sobreexpresión de moléculas quimiotácticas y de adhesión, junto con una respuesta elevada a citoquinas y liberación de mediadores inflamatorios.

5) una mayor tendencia a la agregación plaquetaria y a la adhesión de éstas a las células endoteliales.

6) una mayor tendencia a la coagulación y una fibrinólisis ineficaz, que en conjunto llevan a un aumento del riesgo trombótico.

### **2.6.1. MECANISMOS IMPLICADOS Y CONSECUENCIAS DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

Los mecanismos responsables de la disfunción endotelial pueden ser múltiples e incluyen cambios en la síntesis, liberación, degradación de los diversos factores derivados del endotelio. Asimismo, puede ser consecuencia de cambios en los receptores endoteliales para los agonistas y antagonistas de los factores vasoactivos, modificaciones de la respuesta de las células endoteliales a dichos agentes, o incluso debido a alteraciones de los receptores y de las señales intracelulares de transducción de las células diana de los factores derivados del endotelio.

#### **Alteraciones del tono vasomotor**

La arteriosclerosis, la hipertensión o la diabetes producen, entre otras, modificaciones cambios de los factores vasodilatadores y/o vasoconstrictores que, finalmente, alteran el tono vasomotor. Estos cambios pueden afectar a cualquiera de los factores endoteliales que median la vasorrelajación dependiente de endotelio: NO, PGI<sub>2</sub> o EDHF. Sin embargo, la mayor parte de los estudios han sugerido una baja disponibilidad de NO, que es la característica principal de la disfunción endotelial asociada a factores de riesgo vascular. Si consideramos que la disponibilidad de NO es el resultado del balance entre su síntesis y su degradación, una reducción de los niveles

de NO puede ser consecuencia por tanto, de cambios en ambos procesos. Diversos mecanismos pueden, a su vez, estar implicados en una menor producción de NO. En relación con la enzima que cataliza su síntesis, la NOSe, se ha observado que polimorfismos en el gen de la NOSe se asocian a insuficiencia cardiaca e hipertensión, alteraciones que tienen en común la disfunción endotelial. Se ha propuesto el polimorfismo de la NOSe como un factor de riesgo adicional para el desarrollo de estas complicaciones vasculares presentes en estas enfermedades (Heltianu et al., 2005). Otro posible mecanismo implicado sería una menor disponibilidad de alguno de los cofactores necesarios para su síntesis, como la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) o incluso de su sustrato, la L-arginina, debido a alteraciones en el transporte transcelular de la L-arginina, a la acumulación de inhibidores competitivos de la misma o a una disminución de la afinidad de la NOSe por el sustrato. La reducción de la expresión de la NOSe o de su actividad son otros de los mecanismos propuestos para explicar la reducción en la disponibilidad de NO y por tanto la disfunción endotelial asociada a hipertensión. De todas formas no existe un consenso en este aspecto ya que se han publicado resultados contradictorios (Alexander et al., 1999, Lou et al., 2001, Miyamoto et al., 1998, Moreno et al., 2002, Yoshiyama et al., 1999). Además un aumento de la producción de los radicales libres, en especial el anión superóxido, podría también estar implicado en la disfunción endotelial hipertensiva debido a la degradación del NO para producir aniones peroxinitritos (OONO<sup>-</sup>), que participan en procesos de daño celular (peroxidación lipídica, nitrosación de proteínas y alteración de los ácidos nucleicos) y vascular (Munzel et al., 1997, Nakazono et al., 1991, Radi et al., 1991).

Un exceso de factores constrictores podría ser otro de los mecanismos de la disfunción endotelial. En condiciones normales existe un balance entre los factores vasoconstrictores y vasodilatadores, pero una menor disponibilidad de estos últimos, favorecerá la sobreexpresión de factores vasoconstrictores tanto sistémicos (AII y catecolaminas) como los producidos por el propio endotelio (TXA<sub>2</sub>, ET).

### **Adhesión de leucocitos al endotelio**

Existen fundamentalmente dos familias donde se agrupan las moléculas de adhesión: la familia de las selectinas, como la E- y la P-selectina, y las proteínas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas como las Moléculas de Adhesión a las Células Vasculares, VCAM-1 (del inglés Vascular Cell Adhesion Molecule) y las Moléculas de Adhesión Intercelular, ICAM-1, 2 y 3 (del inglés Intercellular Adhesion Molecule). Las moléculas de adhesión actúan como ligandos de

integrinas presentes en las membranas de los leucocitos.

Las moléculas de adhesión para receptores específicos de leucocitos circulantes, tienen un papel clave durante el desarrollo de la placa aterosclerótica y en la respuesta inflamatoria vascular. Además se ha observado tanto en estudios clínicos con pacientes hipertensos como en modelos animales de hipertensión inducida por infusión con L-NAME, con angiotensina II o en SHR, que existe un aumento de la producción de moléculas de adhesión la molécula de adhesión a células vasculares tipo 1 (VCAM-1), la proteína quimiotáctica de monocito tipo 1 (MCP-1) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), respectivamente (Gonzalez et al., 2000, Komatsu et al., 1997, Luvara et al., 1998, Tummala et al., 1999).

## **2.6.2. EVALUACIÓN CLÍNICA Y EXPERIMENTAL DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

En la actualidad no existe acuerdo sobre ningún parámetro bioquímico que permita valorar la disfunción endotelial, aunque se han propuesto diferentes marcadores plasmáticos como el fvW, la trombomodulina o el t-PA (Blann et al., 1995) e incluso de manera más reciente, se está investigando el papel que puedan jugar algunas moléculas de adhesión (Blann y McCollum, 1994). Sin embargo, aunque la mayoría de ellos suelen hallarse elevados en enfermedades que comportan daño endotelial agudo, su poca sensibilidad y/o especificidad no ha permitido establecerlos como detectores de disfunción endotelial.

Puesto que una de las características de la disfunción endotelial presente en la hipertensión es la menor biodisponibilidad de NO, también se ha intentado determinar su producción *ex vivo*. Sin embargo, la determinación directa de NO se halla limitada tanto por su corta vida media como por su inestabilidad. Por ello, se suelen utilizar sus productos estables de degradación, nitratos y nitritos, como medida indirecta de la producción de NO (Baylis y Vallance, 1998), aunque también presenta limitaciones ya que puede ser modificada por diversos factores como la dieta, el tabaco y el ejercicio físico. Por todo ello, en la actualidad la manera de evaluar la función endotelial es valorar la respuesta a vasodilatadores dependientes de endotelio como la acetilcolina, la bradikinina o la sustancia P (Vanhoutte, 1999). Estas medidas se realizan en distintos lechos vasculares mediante diversas técnicas, dependiendo si la evaluación es clínica o experimental.

La valoración clínica de la función endotelial se puede llevar a cabo en las arterias coronarias mediante la cateterización cardiaca que permite medir

cuantitativamente el diámetro de la luz arterial en cualquier punto de la circulación coronaria. La utilización de coronariografía ampliada con ultrasonografía Doppler permite, además, la medida del flujo coronario bien basal como en respuesta a diversos agonistas como la Ach. Además, se puede valorar mediante tomografía por emisión de positrones, que tiene la ventaja de ser un método no invasivo, que permite medir cuantitativamente el flujo coronario basal o tras un estímulo hiperémico.

En la circulación del antebrazo se valora la función endotelial mediante técnicas de pletismografía de oclusión venosa o mediante un método no invasivo como es la ultrasonografía Doppler. La pletismografía de oclusión venosa mide el flujo sanguíneo arterial de una extremidad a partir de los cambios de volumen que se producen en los vasos de resistencia, cuando se obstruye el retorno venoso de esta extremidad (Benjamin et al., 1995). Estos cambios son proporcionales al flujo arterial, siempre que se mantenga constante la presión de perfusión (presión arterial) y, son el reflejo de los cambios del tono de la musculatura lisa de arteriolas y arterias de pequeño tamaño. La medida se puede realizar tanto en condiciones basales como después de la administración intraarterial de distintos vasodilatadores como acetilcolina, nitroprusiato sódico o nitroglicerina.

La ultrasonografía Doppler (Celermajer et al., 1992) tiene la ventaja de ser un método no invasivo con una buena reproducibilidad ya que presenta una variabilidad de un 20%. Mide la vasodilatación postisquémica producida por la oclusión del brazo durante 3 ó 5 minutos con un manguito. El aumento del flujo sanguíneo (entre 5-7 veces), una vez finalizada la oclusión, da lugar a una vasodilatación mediada por un incremento de las fuerzas de cizallamiento que es dependiente de endotelio.

La valoración de la función endotelial en estudios experimentales se puede llevar a cabo en arterias de gran calibre o en arterias de resistencia, mediante experimentos *in vitro* o *in vivo*. En la actualidad existen muchos estudios de reactividad vascular *in vitro* realizados en la aorta, en arterias coronarias, en el lecho vascular mesentérico, etc., y dependiendo del tipo de vaso estudiado y del diámetro de la luz de la arteria se utilizarán diferentes técnicas de reactividad vascular. Para arterias de gran calibre, que varía entre 1 y 4 mm de diámetro interno se utiliza el baño de órganos, que permite mantener un fragmento de arteria denominado anillo, en condiciones controladas de temperatura, pH, tensión, oxigenación, y bajo un permanente control de la tensión ejercida por las paredes musculares de la misma. El anillo aórtico se sujeta a un bastidor dentro del baño de órganos y se le acopla otro alambre a través de la luz del anillo que está conecta a un dinamómetro o de fuerza que determina la tensión que el fragmento arterial ejerce sobre los alambres que lo sujetan dentro de la copa. Los transductores

están conectados a una interfase que convierte los registros de fuerza en señales eléctricas codificables por un ordenador. Finalmente, mediante una aplicación informática se registran y se analizan las señales (Figura 6).

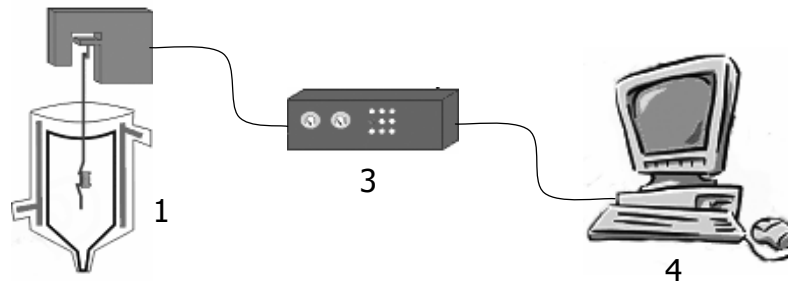


Figura 6. Elementos básicos de la técnica de reactividad vascular. 1: Copa o baño de órganos, 2: Transductor de fuerza, 3: Interfase, 4: Ordenador y software.

### 3. REMODELADO VASCULAR

#### 3.1. ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL NORMAL

La pared de las arterias está formada por tres capas: la íntima, la media y la adventicia. La capa íntima está constituida por una monocapa de células endoteliales dispuestas longitudinalmente en la dirección del flujo sanguíneo que tapiza el interior de la pared arterial. La capa media está formada por células de músculo liso vascular (CMLV) cuyo eje transversal es perpendicular a la dirección del flujo sanguíneo y cuyo eje longitudinal se dispone concéntricamente con respecto a la luz. Estas CMLV están rodeadas por una densa red de tejido conectivo integrado por colágeno, fibronectina y elastina. La capa adventicia está formada por muchos componentes tales como nervios simpáticos, cantidades considerables de colágeno y fibroblastos sin ninguna ordenación aparente. La íntima y la media están separadas por una interfase llamada lámina elástica interna, mientras que la capa media y la adventicia están separadas por la lámina elástica externa.

La principal característica funcional de los vasos es el diámetro de la luz del vaso, ya que determina su resistencia ( a la cuarta potencia de acuerdo con la ley de Poiseuille). Esta característica se determina por las propiedades activas y estructurales de los vasos. Las propiedades activas se determinan por la capacidad contráctil de las CMLV, su número y su disposición. Las propiedades estructurales del vaso como el

diámetro de la luz, el grosor de la media, el grosor de la pared y por tanto la relación media:luz y pared:luz, se determinan con las CMLV relajadas y con los vasos expuestos a una presión intravascular dada (Mulvany, 2002).

### **3.2. REMODELADO ARTERIAL**

Los principales cambios morfológicos que caracterizan el remodelado arterial en hipertensión arterial son el engrosamiento de la capa íntima, de la capa media y de la capa adventicia. Además de estos cambios histológicos, se ha descrito un aumento de las terminaciones nerviosas presentes en la pared y una disminución de la densidad de los capilares que la perfunden en arterias de animales hipertensos.

El engrosamiento de la íntima puede deberse a tres factores principales, la alteración morfológica de las células endoteliales; la infiltración de macromoléculas (lipoproteínas) y células circulantes como monocitos y macrófagos; y la infiltración de células musculares de la capa media cuyo tropismo y motilidad estarían alterados. A estos factores se les debe añadir la acumulación de ciertas sustancias de la sangre facilitada por el aumento de la permeabilidad de las células endoteliales, y el depósito de proteoglicanos producidos por las CMLV.

El engrosamiento de la capa media es el cambio más relevante del remodelado vascular hipertensivo y puede deberse a cuatro alteraciones de las células musculares como la hipertrofia, la hiperplasia, la modificación de la posición y la adquisición de capacidad para sintetizar sustancias de la matriz extracelular. Se ha descrito que en el remodelado arterial asociado a hipertensión, hay una reorientación de los ejes de las células musculares y por tanto las CMLV perderían su disposición concéntrica y adquirirían una disposición perpendicular al eje de la arteria y por tanto el grosor de la capa media aumentaría. Como consecuencia, el diámetro de la luz disminuye y el diámetro externo de la arteria disminuye.

El engrosamiento de la adventicia se debe una hipertrofia de los fibroblastos presentes en ella y al aumento de la producción de colágeno por los mismos.

El remodelado vascular puede ser considerado como un proceso adaptativo en respuesta a cambios prolongados en el flujo sanguíneo o presión, lo que ocasiona una continua tensión circunferencial y/o un rozamiento y cizalladura. Estos cambios están interrelacionados, ya que cualquier cambio en el radio arterial producido por alteraciones en el flujo sanguíneo y la cizalladura, induce cambios en la tensión de la pared. En hipertensión, los efectos del estrés tensional están mediados por dos mecanismos: un incremento en la presión intraarterial y una distensión en el diámetro

arterial. De acuerdo con la ley de Laplace,  $T = P \times R$ , donde la tensión de la pared (T) es proporcional a la presión intraarterial (P) y al radio (R), e inversamente proporcional al grosor de la pared. Así, la hipertrofia de la pared arterial sirve de mecanismo compensatorio al aumento del producto de la presión por el radio. Sin embargo, en estudios in vivo en pacientes y animales hipertensos este aspecto de la ley de Laplace no se observa ya que el aumento en el diámetro o es pequeño (como es el caso de arterias centrales) o no cambia (como en arterias periféricas) y por tanto se produce una reducción en la relación pared/lumen. Otra posibilidad es que una función endotelial alterada pueda mantener el diámetro arterial constante a través de cambios en las fuerzas de cizalladura y/o la liberación de compuestos vasoactivos. Un ejemplo de esta posibilidad se da en las primeras fases del desarrollo en SHR, donde se ha descrito un aumento en el gasto cardíaco temporal así como un mayor flujo sanguíneo carotídeo (Safar et al., 1998).

El remodelado vascular puede tener su origen en múltiples fuentes como la presión, el flujo y las hormonas. La presión intravascular provoca un aumento del estrés de la pared que va a estimular algunos procesos hipertróficos originando un aumento en el grosor de la pared. Un aumento en el flujo sanguíneo aumenta el diámetro del vaso y provoca un engrosamiento de la pared. En este caso, el aumento del diámetro se debe inicialmente a una vasodilatación mediada por vasodilatadores liberados por el endotelio. La relajación también puede provocar un aumento en la tensión de la pared (según la ley de Laplace), derivando en el aumento del diámetro y de nuevo, el engrosamiento de la pared. Se piensa que el remodelado vascular estaría iniciado por factores de crecimiento incluida la AII. Pero aún permanece sin esclarecer si estos procesos de remodelado se debe a la proliferación (aumentando el número de células) o al aumento del tamaño celular, aunque el remodelado mediado por flujo se ha relacionado con la proliferación y la desdiferenciación celular. La hipertensión esencial parece estar asociada a un remodelado eutrófico (disminución de la luz y engrosamiento de la pared por redistribución de células y material intersticial) y no a un proceso hipertrófico de las CMLV (Sun y Weber, 1996). Sin embargo, los factores que originan el remodelado eutrófico se desconocen por el momento, pero se ha propuesto un aumento de la actividad neurohormonal que genera vasoconstricción y aumento de la presión arterial como un mecanismo posible. Según la ecuación de Laplace, la disminución del diámetro y por tanto el engrosamiento de la pared, garantizaría una tensión de la pared normal y de esta manera se eliminaría la respuesta hipertrófica (Mulvany, 2002).

#### **4. INFLAMACIÓN**

La respuesta inflamatoria e inmunitaria está mediada por unas sustancias proteicas que son producidas por diversos tipos de células. Estos mediadores son las interleuquinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), los interferones (INF- $\gamma$ ) y los factores estimuladores de colonias (CSF) y actúan sobre las células a través de receptores de membrana. Desde su descubrimiento, en la década de los sesenta, cuando estas sustancias se denominaban linfoquinas o monoquinas debido al tipo celular que las producía, la clasificación, caracterización y regulación de las citoquinas ha ido ampliándose de manera abrumadora. Las citoquinas se producen en múltiples tipos celulares como los mastocitos, fibroblastos, hepatocitos, adipocitos, células endoteliales, células de músculo liso vascular y cardiomiocitos entre otros.

Las citoquinas presentan una gran diversidad funcional y estructural, no obstante, comparten algunas propiedades. Además, pueden actuar de manera individual o bien, interactuar entre ellas y poseen la capacidad de interactuar en distintos tejidos produciendo múltiples efectos biológicos. La convergencia en las mismas acciones biológicas les confiere a estos mediadores una propiedad redundante. Las citoquinas tienen gran versatilidad en función de su concentración, el estado de la célula sobre la que actúan o la secuencia temporal de actuación respecto a otras citoquinas. Esta puesta en escena permite diseñar un complejo entramado formado por sinergismos, antagonismos e inhibidores naturales (Filella y Zarco, 1999).

Las citoquinas interactúan con las células diana a través de receptores específicos de membrana. La regulación de la expresión de estos receptores está mediada normalmente por la propia citoquina. Al interactuar la citoquina con el receptor correspondiente, éste se internaliza dentro de la célula induciendo la activación del proceso inflamatorio, como en el caso del receptor soluble de la IL-6, o inhibiéndolo, como sucede con los receptores solubles de la IL-2 y TNF- $\alpha$  respectivamente. Por tanto, el sistema debe estar estrechamente regulado para poder ejercer su función (Fernandez-Botran et al., 1996, Gehr et al., 1992).

La arteriosclerosis se considera un proceso inflamatorio donde las citoquinas juegan un papel muy importante. Así, cuando una placa arteriosclerótica se vuelve vulnerable, existe gran cantidad de linfocitos T activados así como de macrófagos que fagocitan moléculas de colesterol adquiriendo un fenotipo de células espumosas. Estos tipos celulares van a generar gran cantidad de citoquinas siendo las más representativas la interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), la interleuquina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o el interferón gamma (INF- $\gamma$ ) entre otras (Kinlay y Selwyn, 2003). La IL-

6 es una citoquina multifuncional que participa en la proliferación de los linfocitos B y la síntesis de anticuerpos. Además es un mediador importante de la fase aguda de la respuesta inflamatoria ya que en el hígado promueve la síntesis de proteína C reactiva (PCR), de amiloide sérico tipo A (ASA) y de angiotensinógeno (Han et al., 1999). De esta manera, la PCR se ha convertido en un marcador predictivo de riesgo cardiovascular imprescindible en la analítica de los pacientes con enfermedades cardiovasculares. Así, en estudios prospectivos se ha demostrado que pacientes con inflamación crónica de bajo grado, donde se han encontrado niveles plasmáticos moderadamente elevados de PCR, han desarrollado infarto de miocardio y/o accidentes cerebrovasculares. Existen multitud de ensayos clínicos en pacientes que revelan la importancia de la PCR como marcador pronóstico de riesgo de padecer un IAM, un ictus o bien insuficiencia cardiaca (Ridker, 2003).

En el hígado, los hepatocitos son capaces de responder tanto a citoquinas proinflamatorias como a LPS, señales generadas por procesos como la infección, el shock hemorrágico, la sepsis, la hepatectomía parcial, la isquemia-reperfusión, etc. Esta señales inducen la expresión de la NOSi y la producción de grandes cantidades de NO, que constituiría una señal moduladora de diversas vías de transducción implicadas en los procesos de inflamación, en la resolución de dicha inflamación y en la regeneración hepática (Martin-Sanz et al., 2002).

La IL-6 induce la síntesis de reactantes de fase aguda a través de dos vías de transducción de señales distintas iniciadas en su receptor específico. La primera ruta es la compuesta por tirosin kinasas denominadas janus kinasa (JAK) en combinación con la señal activadora y transductora de la transcripción (STAT, del inglés signal transducer and activator of transcription). La segunda ruta es la formada por la proteína G pequeña y soluble Ras en combinación con la proteína kinasa mitogénica activada y el factor nuclear dependiente de IL-6. De estas dos rutas, la principal ruta responsable de la síntesis de reactantes de fase aguda es la de JAK/STAT. La IL-6 activa esta ruta en hepatocitos al unirse a la cadena  $\alpha$  del receptor IL-6R que carece de actividad kinasa. La unión de varios complejos (IL-6-cadena  $\alpha$  IL-6R) junto con una proteína transmembrana denominada transducina (gp130) forman un complejo activado de señalización en la membrana plasmática. Este complejo va a reclutar entonces tirosin kinasas (JAK 1 y 2 y Tyk2) que van a fosforilar al gp130. A continuación le sigue la captura de los factores de transcripción citoplasmáticos (STAT1 y 3) que se unirán a gp130 a través de los dominios de homología src tipo 2 (SH2). Los STATs, como también son sustratos de las kinasas JAK/Tyk, se fosforilan los restos de tirosina, permitiendo así su dimerización y translocación al núcleo donde activarán los genes de

respuesta de fase aguda como la PCR, ASA, fibrinógeno y angiotensinógeno (Brasier et al., 2002).

#### **4.1. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR kappa B (NFκB)**

El regulador por excelencia de la respuesta inmunitaria, inflamatoria y de fase aguda es el NFκB, pero está involucrado en la regulación de muchos aspectos de la actividad, el estrés y el daño celular. El NFκB es un complejo proteico regulador que se activa por distintos mediadores biológicos y factores exógenos. La capacidad del NFκB y de otros factores de transcripción como el AP-1 (fos, jun), de unirse al ADN depende de modificaciones tales como la fosforilación, defosforilación o el estado redox. Se localizó por primera vez en linfocitos B maduros al unirse a la secuencia de bases localizada en el inductor intrónico de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina (de ahí la denominación κB) (Sen y Baltimore, 1986). Actualmente se ha descrito que el NFκB está presente en múltiples tipos celulares. Además la secuencia de bases nitrogenadas a la que se une el NFκB para activar la transcripción está presente en multitud de promotores e inductores de gran número de genes inducibles y tiene la siguiente secuencia consenso GGG RNN YYC C , siendo R una base nitrogenada de purina, e Y una base nitrogenada de pirimidina (May y Ghosh, 1998).

El NFκB se encuentra en el citoplasma de las células en su forma inactiva ya que está unido a otras proteínas que le impiden translocarse al núcleo para activar la transcripción génica. La forma citoplasmática del NFκB está formada por 3 subunidades. La proteína p50, que contiene el dominio de unión a ADN, el dominio de dimerización y el de translocación nuclear (NLS). La proteína p65, cuyas propiedades son la compartición de la actividad de unión al ADN y la de dimerización que contiene un dominio de activación de la transcripción. Finalmente, una proteína reguladora IκB que se une a la p65. Cada uno de los dominios, el de dimerización, el de enlace a ADN y el de transactivación, son sitios reguladores y objetivos de las vías señalizadoras redox.

Los principales genes regulados por el NFκB suelen ser (Tabla 5) genes que codifican para citoquinas inmunomoduladoras (IL-6, TNF-α, GM-CSF, IL-1β); genes que codifican para receptores inmunomoduladores de la superficie celular (antígenos del sistema de histocompatibilidad MHC-I, subunidades no polimórficas de MHC y

receptores de la IL-2); genes que codifican para las proteínas de la fase aguda (amiloide sérico tipo A, angiotensinógeno, proteína C reactiva) o genes que codifican el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VHI) entre los más representativos

#### GENES REGULADOS POR NFκB:

CLASE	GENES
Citoquinas	TNF- $\alpha$ y $\beta$ ; IFN- $\beta$
	IL-1; IL-2; IL-6; IL-8; IL-12
Quimioquinas	MCP-1; IL-8, GRO, IP-10, RANTES, MIP-1, eotaxina
Moléculas de Adhesión	E-Selectina; ICAM-1; VCAM-1; ELAM
Proteínas de fase aguda	PCR; ASA; Angiotensinógeno
	Factor de Complemento B y C4
Factores de Crecimiento	IL-3; GM-CSF; M-CSF; G-CSF
Inmunoreceptores	Cadena Ligera de Ig $\kappa$ ; MCH-I y II
	Cadena $\beta$ del TCR; IL-2R $\alpha$ ; Factor Tisular
Enzimas	NOSi; COX-2; PLA <sub>2</sub> ; 5 y 12-LPO
Factores de Transcripción	I $\kappa$ B; p105, p100, c-Rel (p65), Bcl-3

Tabla 5. Genes regulados por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

La proteína I $\kappa$ B forma un complejo con el heterodímero p50-p65, lo inactiva y lo secuestra en el citoplasma impidiendo su translocación al núcleo y la unión al ADN. Cuando un estímulo extracelular como una citoquina, una proteína viral, LPS o un agente oxidante activa la ruta de señalización del NF $\kappa$ B, el I $\kappa$ B se fosforila en los restos de serina 32 y 36. Esta fosforilación es una señal de ubiquitinización de las lisinas 21 y 26, lo que origina una eliminación rápida del I $\kappa$ B a través de la degradación por el proteosoma. Así, el complejo NF $\kappa$ B se libera, se activa y posteriormente se transloca al núcleo donde activa la transcripción génica (Figura 7). Se han descrito dos Serin/Treonin kinasas, denominadas IKK-1 e IKK-2 o alfa y beta, responsables de la fosforilación del I $\kappa$ B. Recientemente se ha descrito que estas IKK tienen una actividad fosforiladora mayor sobre I $\kappa$ B cuando está unido al complejo NF $\kappa$ B, lo que explicaría la capacidad que tienen tanto las IKK y el I $\kappa$ B libre para coexistir en la misma célula y regular al NF $\kappa$ B. Aunque no se conoce muy bien, en la activación del NF $\kappa$ B no solo participa la disociación del I $\kappa$ B y la translocación al núcleo, sino que también participa

la fosforilación del p65 por la proteína quinasa A citosólica (PKAc). La PKAc se une al complejo NFκB/IκB en el citoplasma, donde está inactiva por la unión a IκB, hasta que este se disocia, momento en el cual la PKAc se activa, fosforila la serina 273 de la subunidad p65, y activa la actividad transcripcional del NFκB/IκB. Recientemente se ha demostrado que esta fosforilación del p65 es necesaria para el reclutamiento de la proteína de unión a CREB y la p300 (CBP/p300), que es un coactivador transcripcional del NFκB. Se han descrito otras proteínas kinasas que regulan el p65 como la caseína quinasa II (McKay y Cidlowski, 1999).

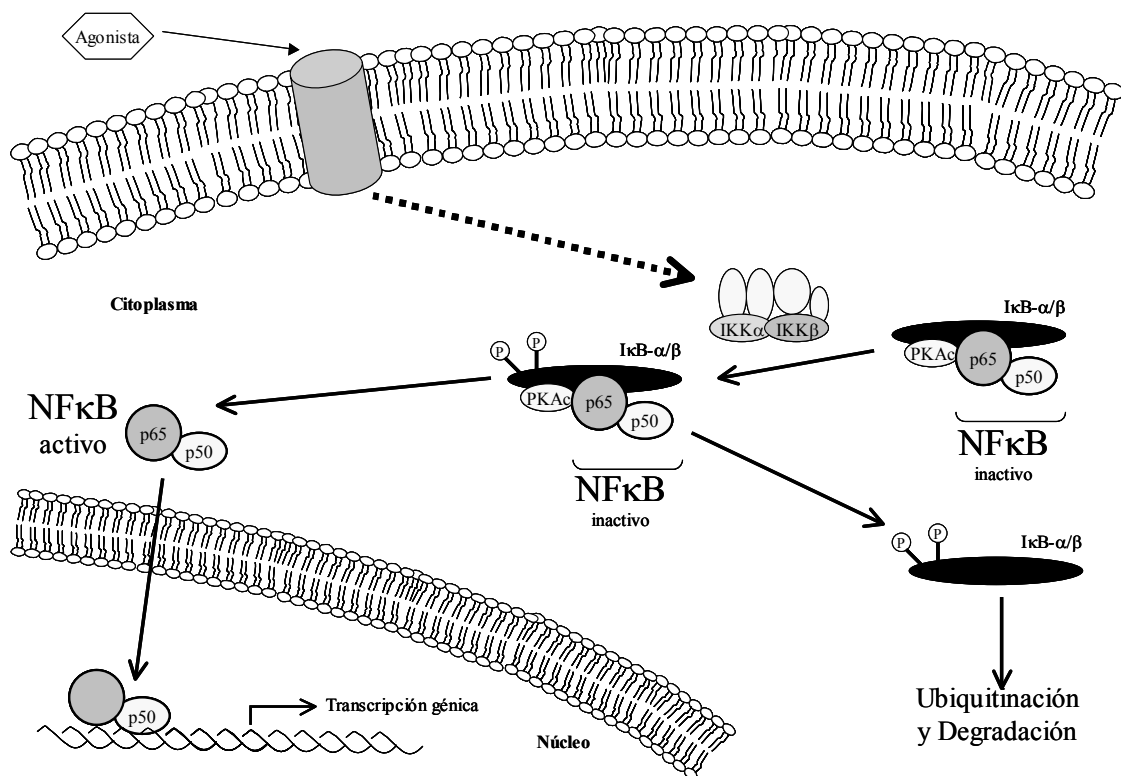


Figura 7. Mecanismo de activación del NF-κB.

El heterodímero clásico p65/p50 es el principal inductor de genes inflamatorios. Existe gran cantidad de señales proinflamatorias extracelulares que pueden activar el NFκB entre los que están los virus (herpes simple y adenovirus), proteínas virales, productos derivados de bacterias como el lipopolisacárido, citoquinas inflamatorias como el TNF-α, IL-1 o IL-2, así como una variedad de agentes dañinos de ADN y agentes oxidantes (Tabla 6).

<b>ESTÍMULOS DE NFκB</b>
Endotoxina (lipopolisacárido bacteriano, LPS)
Virus: herpes, citomegalovirus, adenovirus, hepatitis B, HIV
Estrés químico: oxidativo, osmótico (glucosa, albúmina)
Estrés mecánico
Mitógenos: ésteres de forbol (estímulos de PKC), suero, fitohemaglutinina, factores de crecimiento
RNA bicatenario
Luz ultravioleta
Citoquinas: IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN
Proteínas de activación de membrana: moléculas de adhesión, fibronectina, CD2, CD3, CD28, a b TCR
Inmunoreceptores
Agentes vasoactivos: angiotensina II, trombina, endotelina

Tabla 6. Factores activadores del NF- $\kappa$ B.

Tras la activación del complejo, el NF $\kappa$ B se acopla a los sitios de unión en la cromatina y modula la expresión génica de factores involucrados en la respuesta inmune e inflamación. La síntesis de novo de I $\kappa$ B provoca el secuestro de NF $\kappa$ B en el citoplasma y la atenuación de la activación transcripcional, proporcionando un mecanismo de retroalimentación que modula la extensión y duración de las respuestas inflamatorias por la célula. A parte del papel regulador en el sistema inmunitario (incluyendo desarrollo linfocitario, respuesta inflamatoria y mecanismos de defensa celulares), el NF $\kappa$ B está implicado en procesos de apoptosis y desarrollo embionario (McKay y Cidlowski, 1999).

**Endotelio e Inflamación.** Existe una estrecha relación entre el endotelio y el proceso inflamatorio debido a la capacidad que tienen las células endoteliales de interactuar con los leucocitos y de producir citoquinas proinflamatorias. Primero, el endotelio es el vigilante del reclutamiento de los leucocitos en un foco inflamatorio y en el alojamiento de los linfocitos hacia los órganos linfoides secundarios. En segundo lugar, puede modular la activación leucocitaria y finalmente, son los objetivos de las moléculas derivadas de leucocitos, provocando la activación celular endotelial o la muerte (Biedermann, 2001). Bajo ciertas circunstancias, el espacio subendotelial se convierte en un entorno de inflamación como en vasculitis, vasculopatías autoinmunes o arteriosclerosis. Las citoquinas proinflamatorias activan a las células endoteliales que expresan moléculas de adhesión que facilitarían el reclutamiento leucocitario, así como una gran cantidad de moléculas presentadoras de antígeno como los sistemas de histocompatibilidad tipo I y II (MHC I y II). Cuando el endotelio expresa un antígeno, se convierten en un objetivo directo de las moléculas efectoras derivadas de los leucocitos cuyo destino final es la muerte celular.

En presencia de factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia, la hipertensión, la diabetes o el envejecimiento, la pared vascular sufre ciertas alteraciones que van a generar inflamación, oxidación de lipoproteínas, proliferación de CMLV, depósito de matriz extracelular, activación de plaquetas y la formación de trombos (Liao, 1998). La disfunción endotelial puede ser causa y consecuencia del proceso inflamatorio. Así, los factores de riesgo mencionados anteriormente, producirían una disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico que conduciría a una disfunción endotelial (Figura 8).

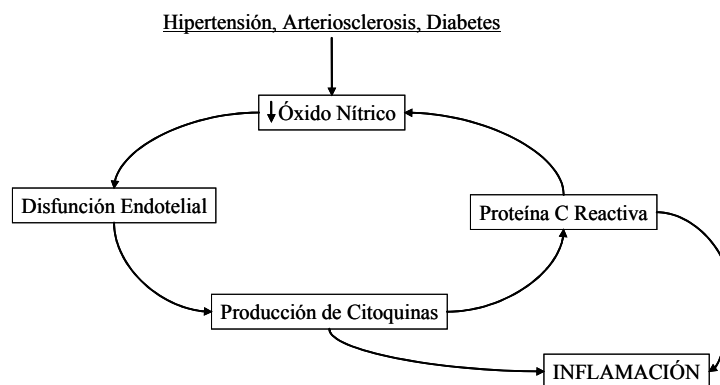


Figura 8. Relación entre la disfunción endotelial asociada a distintos factores de riesgo cardiovascular y la inflamación.

En esta situación se produce una activación de la síntesis de citoquinas inflamatorias que inducen la síntesis hepática de la proteína C reactiva, considerada como un reactante de fase aguda y marcador predictor de riesgo cardiovascular. En este punto, la PCR fomenta la reducción de la disponibilidad de NO así como el proceso inflamatorio (Cachofeiro et al., 2004).

## **5. ANGIOTENSINA II**

### **5.1. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

El sistema renina-angiotensina (SRA) es el principal sistema hormonal que regula el tono vascular y el equilibrio hidroelectrolítico. Tradicionalmente se ha considerado la existencia de un SRA circulante (Laragh et al., 1972), sin embargo existen SRA locales que actuarían de forma paracrina y autocrina en diferentes tejidos como el cerebro, las glándulas adrenales, los órganos reproductores, el corazón y especialmente los vasos sanguíneos (Rosenthal et al., 1984, Samani et al., 1988). Actualmente se consideran los SRA locales como las principales fuentes de angiotensina II y aquellos con mayor relevancia fisiológica y patológica.

La cascada del SRA se inicia con la renina, una enzima proteolítica con alta especificidad que se sintetiza en forma de pre-prorenina. En las células yuxtglomerulares del riñón humano, la prorenina sigue una vía de secreción constitutiva o bien es almacenada en gránulos inmaduros. Dentro de éstos sufre otras dos proteolisis más para dar la renina activa, que queda almacenada en gránulos maduros. La renina se libera de las células yuxtglomerulares junto con la prorenina pasando a la circulación sistémica. La transformación de prorenina en renina se produce por la acción de diversas peptidasas como la plasmina, la tonina, la calicreína, la elastasa, el t-PA, la catepsina G y la enzima activadora de la renina derivada del endotelio (Figura 9). La renina actúa sobre su sustrato, el angiotensinógeno, una  $\alpha_2$ -globulina que se secreta casi de forma constante, generando un decapeptido inactivo, la AI. A su vez, la AI es el sustrato de la ECA, glicoproteína ácida compuesta por una sola cadena polipeptídica que contiene un átomo de  $Zn^{2+}$  en su centro activo, para dar lugar al octapeptido AII, que es el principal efector del sistema.

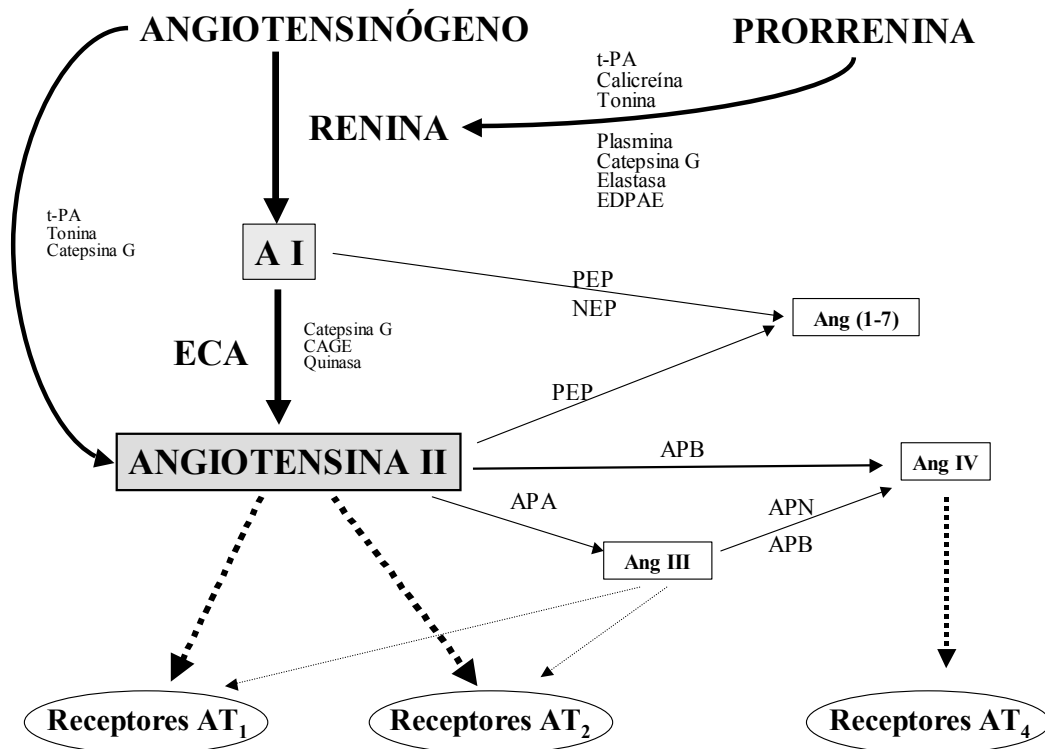


Figura 9.- Componentes del sistema renina-angiotensina.

La AII parece tener un efecto estimulador sobre el angiotensinógeno, actuando como un mecanismo de retroalimentación positivo sobre la síntesis de angiotensinógeno (Blair-West et al., 1974), mientras que sobre la renina puede inhibir su liberación (Herrmann y Dzau, 1983). La ECA se encuentra principalmente en la superficie de las células endoteliales vasculares del pulmón, por lo que la formación de AII tiene lugar fundamentalmente en la circulación pulmonar. La AI no es el único sustrato sobre el que puede actuar la ECA, ya que in vitro puede tener acción sobre una gran variedad de péptidos, mientras que in vivo es más selectiva. La AII por acción de la aminopeptidasa A, origina la angiotensina III (AIII) o angiotensina 2-8, con acciones similares a la AII aunque con menor intensidad. Asimismo, la acción de la aminopeptidasa B sobre la AII da lugar a la AIV o angiotensina 3-8, que es un hexapéptido que a través de su receptor específico AT<sub>4</sub> estimula la liberación del inhibidor del activador de Plasminógeno tipo 1 (PAI-1), un potente factor antitrombótico. Mediante la acción de una endopeptidasa sobre la AI o sobre la AII se genera la angiotensina 1-7 [A(1-7)] cuyas acciones parecen ser opuestas a las que presenta la AII (Moriguchi et al., 1995). La A(1-7) tiene un efecto natriurético y diurético en el riñón (DelliPizzi et al., 1994, Handa et al., 1996, Hilchey y Bell-Quilley, 1995) y produce vasodilatación en diferentes territorios vasculares

(Brosnihan et al., 1996, Osei et al., 1993, Porsti et al., 1994). Estas acciones de la A(1-7) parecen ser dependientes de las PGs, del NO y/o de las quininas (Abbas et al., 1997, Brosnihan et al., 1996, Hilchey y Bell-Quilley, 1995).

La formación de AII también puede tener lugar a través de otras rutas distintas de la renina y la ECA. De hecho, se ha descrito la existencia de distintas vías enzimáticas de síntesis de la AII en numerosos tejidos (Dzau et al., 1993), aunque el significado fisiopatológico todavía no está totalmente establecido. Se puede generar AII directamente a partir del angiotensinógeno con la catepsina G, la tonina y el t-PA. También se han detectado peptidasas en la pared de los vasos sanguíneos, diferentes de la renina, que pueden actuar sobre el angiotensinógeno y formar AI. Asimismo, se ha descrito que la ECA, no es la única enzima capaz de formar AII, ya que otras enzimas como la catepsina G, la quimasa y la enzima generadora de AII "sensible a quimostatina" ó CAGE pueden sintetizar AII a partir de AI. Aunque la relevancia fisiológica o fisiopatológica de estas vías de síntesis de AII permanece todavía por esclarecer, recientemente se ha sugerido que la vía de la quimasa en el corazón y en la pared vascular podría tener importancia tanto en el aspecto funcional como en distintas situaciones fisiopatológicas (Husain, 1993).

## **5.2. RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II**

La AII ejerce sus acciones a través de su unión a receptores específicos. Se han descrito tres tipos de receptores para la AII, designados como AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> y AT<sub>4</sub>. Los receptores AT<sub>1</sub> se localizan en numerosos tejidos como en la aorta, el riñón, el corazón, el cerebro, el útero, los adipocitos, los ovario, los testículos, la glándula adrenal, el bazo, los pulmones, la hipófisis y el cerebro (Kakar et al., 1992). Los receptores AT<sub>2</sub>, se han detectado fundamentalmente en tejidos embrionarios o en crecimiento, y en individuos adultos se han encontrado en la pared vascular, las glándulas adrenales, el sistema nervioso central, el miometrio y en los folículos ováricos atrésicos.

El receptor AT<sub>1</sub> pertenece a la familia de receptores acoplados a las proteínas G o proteínas fijadoras de GTP, que incluye a los receptores para otros factores vasoconstrictores como la NA, la adrenalina, la dopamina, la VP, la serotonina, la ET o la trombina. El receptor AT<sub>1</sub> presenta siete dominios transmembrana, localizándose el grupo carboxi-terminal en el citoplasma y el grupo amino terminal glicosilado en el espacio extracelular (Figura 10). La AII se une a la superficie externa de los dominios 2

y 3 y activa al receptor  $AT_1$ . El lazo intracelular que une los dominios 5 y 6 y la porción carboxi-terminal constituyen la zona de acoplamiento y de regulación de la proteína  $G_{q\alpha}$ . Esta unión activa la PLC que a su vez hidroliza el fosfatidil-4,5-bisfosfato, formándose inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $IP_3$  actúa sobre receptores específicos localizados en la membrana del retículo sarcoplásmico y facilita la liberación del calcio allí almacenado y la posterior entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio. El resultado final es un aumento de la concentración intracelular de calcio que puede ser inhibido por bloqueantes de los canales de calcio e inhibidores de la PLC.

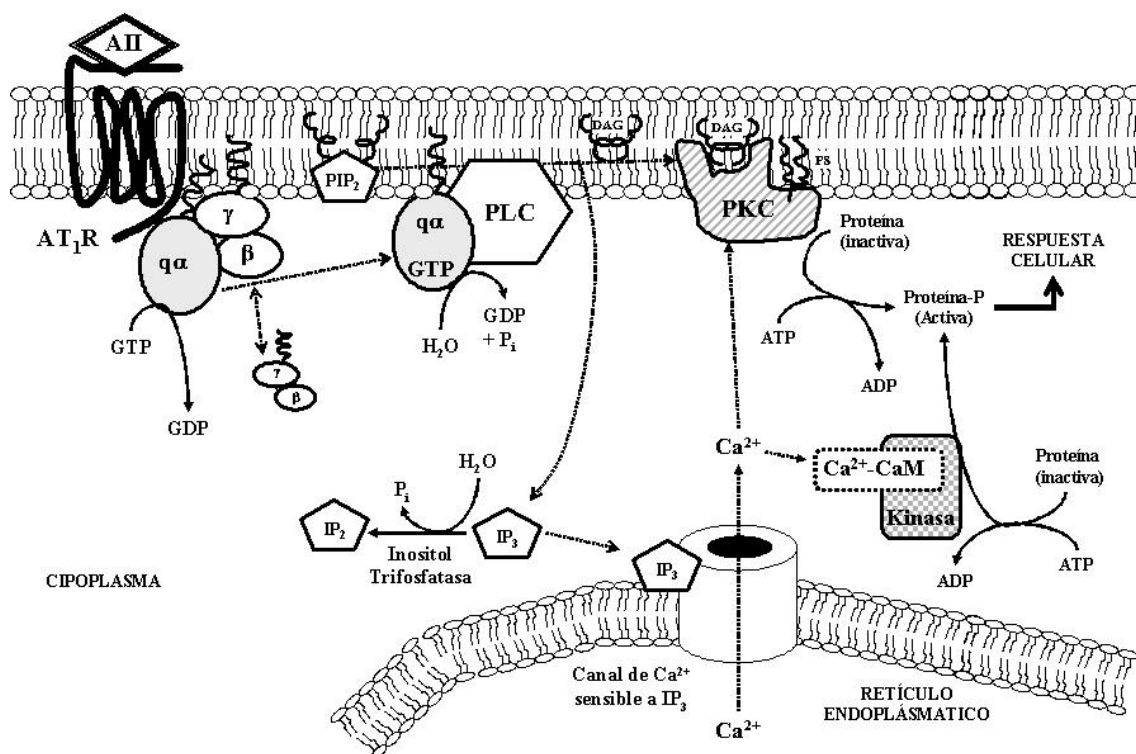


Figura 10. Mecanismo de acción de la Angiotensina II a través de los receptores  $AT_1$ .

El aumento de la concentración de calcio intracelular a nivel del músculo cardíaco aumenta la contractilidad y la frecuencia cardíaca, en el músculo liso vascular aumenta el tono arterio-venoso y en la glándula adrenal aumenta la síntesis de aldosterona. A su vez, el DAG activa y transloca la proteína quinasa C hacia la membrana celular donde estimula la fosforilación de diversas proteínas, activa el intercambiador  $Na^+/H^+$  y la  $PLA_2$  que aumenta la síntesis de eicosanoides y en particular de  $PGE_2$ . Además favorece la expresión de diversos factores de transcripción

(Erg-1, c-fos, c-jun) y cierra distintos canales de potasio. Este último efecto despolariza la membrana y conduce a la activación de canales dependientes de voltaje tipo-L, lo que también produce un aumento de la contractilidad cardíaca y del tono vascular. Además de los efectos mencionados, la estimulación de los receptores AT<sub>1</sub> en el hígado o en la hipófisis puede activar proteínas G<sub>iα</sub> que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa disminuyendo los niveles celulares de AMPc (de Gasparo et al., 2000).

El receptor AT<sub>2</sub> tiene siete dominios transmembrana tiene poca homología (34%) con el receptor AT<sub>1</sub> y la transducción de la señal no parece estar asociada a la activación de los fosfoinositoles o al incremento en la concentración intracelular de calcio. La posibilidad de que la transmisión de la señal de los receptores AT<sub>2</sub> implique la activación de proteínas G no está totalmente aclarada, pero si parece activar la guanilato ciclasa. Además, la unión de la AII al receptor AT<sub>2</sub> conduce a la activación de la tirosina fosfatasa que inhibe la fosforilación de diversas proteínas. Los receptores AT<sub>2</sub> se expresan de manera marcada en tejidos embrionarios donde se supone que median el remodelado orgánico a través de la apoptosis de las células innecesarias. Sin embargo, la expresión de estos receptores en el adulto es bastante escasa, apareciendo únicamente en situaciones patológicas como sitios de inflamación, daño tisular u otras formas de estrés celular como en la hipertrofia cardíaca experimental, cicatrización de heridas o isquemia (Zaman et al., 2002).

El receptor AT<sub>4</sub> es un receptor acoplado a proteínas G formado por muchas subunidades, siendo la subunidad alfa la que alberga el sitio de unión a A IV. Se expresa en muchos tejidos como el corazón, el riñón, la vasculatura, el timo, la vejiga, la aorta, las adrenales y muchas zonas del cerebro (Zhang et al., 1999). Se ha descrito que la angiotensina VI estimula la expresión de c-Fos en regiones del cerebro asociadas con el proceso de conocimiento, también estimula c-Fos, c-Jun, and egr-1. La activación del receptor AT<sub>4</sub> aumenta la expresión del inhibidor del activador de Plasminógeno tipo 1 (PAI-1), un potente factor anti trombótico (de Gasparo et al., 2000).

### **5.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ANGIOTENSINA II**

La regulación de la síntesis de AII depende en primer lugar de la actividad de la renina sobre la AI y el angiotensinógeno, y en segundo lugar de la actividad de la ECA. El principal mecanismo hormonal regulador de la síntesis de AII depende de su retroalimentación negativa sobre la secreción de renina, el cual supone un autocontrol del sistema ya que si se produce un aumento de la secreción de renina y como consecuencia de AII, ésta es capaz de autorregular su síntesis bloqueando la secreción de renina.

La regulación de la síntesis y liberación de la renina es un factor decisivo para la formación de AI y por tanto de AII, ya que la cantidad de angiotensinógeno disponible, que es sintetizado por el hígado, es prácticamente constante y la reacción renina-angiotensinógeno depende casi exclusivamente de la tasa de secreción del enzima. Por ello, el control de la secreción de renina a través de diferentes mecanismos que se describen a continuación, junto con el de la ECA, es el principal punto de regulación del eje renina-angiotensina. Sin embargo, hay que señalar la existencia de Sistemas Renina Angiotensina locales donde ni el angiotensinógeno, ni la renina provienen del hígado o del aparato yuxtaglomerular y son capaces de regular el SRA circulante.

#### **Mácula densa**

La estrecha asociación anatómica que se observa entre la mácula densa y las células yuxtaglomerulares hizo pensar en la existencia de una relación funcional entre ambos tipos de células. Las células de la mácula densa se localizan en la porción túbulo distal de la nefrona, al final del asa de Henle, y están adyacentes a la arteriola aferente, y células yuxtaglomerulares. Detectan las variaciones de flujo o de la concentración de solutos en el túbulo distal, modificando consecuentemente la liberación de renina por parte de las células yuxtaglomerulares. Vander propuso en 1967 que la secreción de renina aumenta cuando disminuye la concentración tubular de NaCl y viceversa, lo que indica que la secreción de renina varía inversamente al contenido tubular de NaCl.

No se conoce muy bien el mecanismo por el cual las células de la mácula densa median los cambios en la secreción de renina, ni la señal que actúa como mediador entre éstas y las células yuxtaglomerulares. Sin embargo, se ha descrito que las prostaglandinas inducen la síntesis de renina a través del sistema calicreína-quininógeno

(Bailie et al., 1976). La adenosina es un inhibidor de la síntesis de renina. El aumento de la actividad ATP-asa, necesaria para que se lleve a cabo el transporte de sodio por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , tiene como consecuencia la hidrólisis de ATP y el incremento de la producción de adenosina en las células de la mácula densa inhibiendo la liberación de renina (Spielman y Thompson, 1982). Otra teoría postula que la reabsorción de fluido en la región extracelular del mesangio podría expandir este espacio y actuar como un mecanorreceptor que regularía la liberación de renina.

### **Barorreceptor-presión de perfusión renal**

Los primeros estudios que permitieron establecer una relación entre la presión de perfusión renal y la secreción de renina fueron realizados por Goldblatt en 1934. Sin embargo, fueron Tobian y cols. en 1959 quienes formularon por primera vez la existencia de un mecanismo barorreceptor implicado en la secreción de renina, describiendo una relación inversa entre ambos parámetros, al demostrar que un aumento de la presión arterial y por tanto de la presión de perfusión renal producía una disminución en el número y contenido de gránulos de renina de las células yuxtglomerulares. Así, las mismas células yuxtglomerulares se comportarían como un barorreceptor sensible a las modificaciones de la presión intravascular o de la tensión transmural de la pared de la arteriola aferente, traduciendo estas modificaciones en cambios en la secreción de renina. Las variaciones de la presión de perfusión renal también pueden alterar la tasa de filtrado glomerular (TFG) y por tanto la cantidad de NaCl que llega al túbulo distal, afectando así a las células de la mácula densa. En condiciones fisiológicas, por tanto, es posible que ambos mecanismos estén actuando conjuntamente, sumando sus efectos para inhibir o estimular la secreción de renina (Sealey y Laragh, 1990).

### **Sistema nervioso simpático**

El sistema nervioso simpático juega un importante papel regulando la secreción de renina en situaciones que requieren una respuesta inmediata como el ejercicio, el cambio postural o la pérdida de volumen. Se ha observado que la innervación de las células yuxtglomerulares es predominantemente simpática (Barajas, 1979), y en general, un incremento de esta actividad determina un aumento en la liberación de

renina (Vander, 1965). El aumento de la secreción de renina producido por la estimulación nerviosa simpática, o mediado por la noradrenalina se bloquea con propanolol, lo que demuestra que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos están implicados en dicha acción. La presencia de este tipo de receptores en las células yuxttaglomerulares, junto con la observación de que los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos estimulan la liberación de renina tanto in vivo como in vitro, parecen confirmar este hecho (Desaulles et al., 1978).

El papel de la estimulación  $\alpha$ -adrenérgica en el control de la secreción de renina no está totalmente esclarecido, aunque la mayoría de los estudios realizados hasta ahora apuntan hacia un efecto inhibitorio; se le han atribuido tanto acciones inhibitorias como estimuladoras sobre la secreción de renina. Además, hay que tener en cuenta que la estimulación de la liberación de renina mediada por la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se da en situaciones de un incremento moderado del tono simpático, mientras que la inhibición de la secreción de renina a través de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos sólo ocurre en situaciones de elevada estimulación nerviosa que pueden afectar también a la hemodinámica y la función excretora renal. Estudios recientes realizados en riñones aislados y en cultivos celulares demuestran que los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos son capaces de inhibir la liberación de renina directamente.

### **Mediadores celulares**

Los principales mecanismos implicados en la regulación de la liberación de renina a nivel celular parecen ser el  $\text{Ca}^{2+}$ , el AMPc y el GMPc. El aumento de la concentración intracitosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células yuxttaglomerulares, así como las que producen renina, inhibe la secreción de renina y viceversa. Esta correlación inversa entre el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la liberación de renina se observa en presencia de bloqueantes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, que estimulan la secreción basal de renina, o con ionóforos y agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que inhiben su liberación. No se conoce como las alteraciones en la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden modificar la secreción de renina, pero se piensa que este efecto inhibitorio del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está mediado a través de su unión a calmodulina (Hackenthal et al., 1990). Existen algunos estudios que demuestran que inhibidores de la calmodulina

incrementan la secreción de renina y bloquean la acción inhibitoria de la AII sobre las células yuxtaglomerulares.

El AMPc también es un mensajero intracelular importante para la secreción de renina. Compuestos como la forskolina, que estimulan la actividad adenilato ciclasa, son capaces de incrementar marcadamente la liberación de renina (Keeton y Campbell, 1980). Asimismo, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* utilizando análogos de AMPc, como el dibutilil-AMPc, se consigue aumentar la secreción de renina. Por tanto, la estimulación de la secreción de renina por agentes como los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, la PGE<sub>2</sub>, la PGI<sub>2</sub>, la histamina o la dopamina se debe a que activan la adenilato ciclasa e incrementan los niveles de AMPc en las células yuxtaglomerulares. Sin embargo existen dudas sobre si las modificaciones de los niveles de AMPc en las células yuxtaglomerulares pueden regular la liberación de renina independientemente de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares, ya que el AMPc puede reducir los niveles de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático en un gran número de tejidos, estimulando su salida al exterior y su entrada a los depósitos intracelulares.

El GMPc es un segundo mensajero de gran relevancia en la regulación del tono vascular. Un aumento de los niveles intracelulares de GMPc, bien por la activación de la guanilato ciclasa soluble (GC<sub>s</sub>), o por la guanilato ciclasa particulada (GC<sub>p</sub>), produce la relajación del músculo liso vascular. Dada la relación existente entre las células del músculo liso vascular y las células productoras de renina, cabría esperar que la liberación de renina estuviera asociada con incrementos del GMPc en las células yuxtaglomerulares. Se ha descrito además, que el GMPc puede activar la bomba de Ca<sup>2+</sup> dependiente de ATP en la membrana, disminuyendo así la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular y constituyendo un estímulo para la secreción de renina. El NO, que estimula la GC<sub>s</sub>, o el péptido natriurético auricular (PNA), que estimula la GC<sub>p</sub>, elevan los niveles citosólicos de GMPc en las células yuxtaglomerulares y ejercen un efecto inhibitorio sobre la secreción de renina. Sin embargo conviene resaltar que los resultados obtenidos mediante la administración de inhibidores de la síntesis de NO son en cierta medida contradictorios, ya que al revisar la literatura se observan aumentos, disminuciones o ninguna alteración de la secreción de renina. Esto parece ser dependiente de las maniobras experimentales realizadas, así como de las modificaciones de la presión de perfusión renal, de la carga tubular de NaCl y de la activación simpática.

Se ha propuesto que el NO junto con el  $\text{Ca}^{2+}$  podría ser la señal que uniese los cambios en la presión de perfusión renal con la secreción de renina. Cuando aumenta la presión de perfusión renal se produce una vasoconstricción mediada por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular al interior de las células musculares lisas, con objeto de aumentar la resistencia vascular y mantener el flujo sanguíneo renal constante (autorregulación del flujo sanguíneo renal) a expensas de un aumento de la velocidad de flujo. Como consecuencia se produce un aumento de las fuerzas de cizallamiento de la sangre sobre las células endoteliales vasculares, que constituye uno de los principales estímulos físicos para la liberación de NO por dichas células. Este factor puede difundir además hacia las células yuxtglomerulares aumentando la concentración de GMPc e inhibiendo la liberación de renina.

#### **5.4. ACCIONES DE LA ANGIOTENSINA II**

La utilización de antagonistas específicos de los receptores de angiotensina ha permitido conocer las acciones de la A II a través de sus receptores específicos:

##### **RECEPTORES $\text{AT}_1$**

Las principales acciones de la AII a través de los receptores  $\text{AT}_1$  (Zaman et al., 2002) son:

- Vasoconstricción (preferentemente coronaria, renal y cerebral)
- Retención de Sodio (Aumenta la producción de sodio)
- Inhibición de síntesis de Renina (por retroalimentación negativa)
- Retención de agua (liberación de vasopresina)
- Hipertrofia de células miocárdicas y CMLV
- Estimulación de fibrosis miocárdica y vascular
- Inotropismo / contractilidad (miocardiocitos)
- Estimulación del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1)
- Estimulación de formación de anión superóxido
- Activación del sistema nervioso simpático
- Aumento de la secreción de endotelina

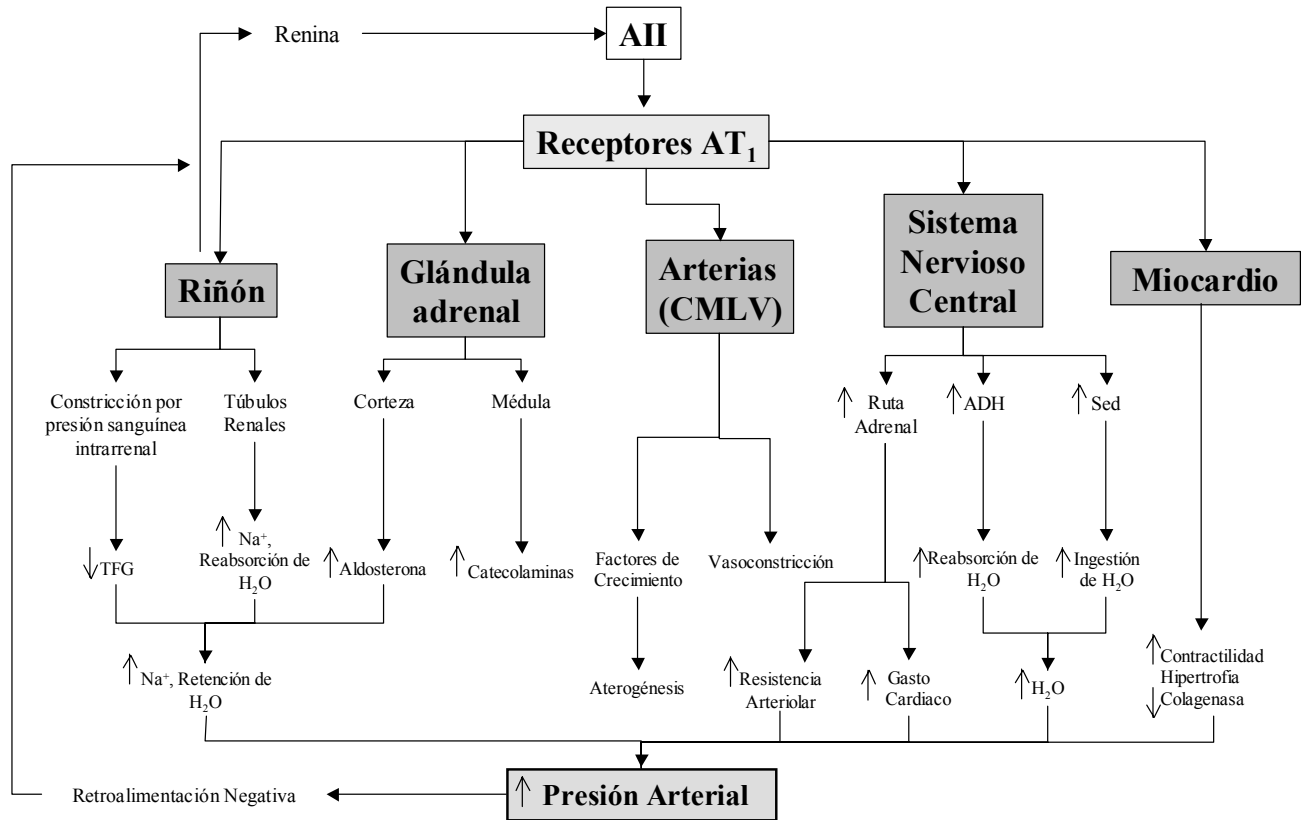


Figura 11. Principales acciones de la Angiotensina II a través de los receptores  $AT_1$ .

Dichas acciones afectan a la homeostasis cardiovascular y renal y como consecuencia participan en el desarrollo y mantenimiento de algunas patologías como la aterosclerosis, la hipertensión arterial (Figura 11), la insuficiencia cardiaca, el infarto de miocardio, el infarto cerebral, la insuficiencia renal o la nefropatía diabética (Timmermans et al., 1993). A continuación vamos a ver más detalladamente las acciones de la AII a través de los  $AT_1$  en cada uno de los órganos que pueden verse afectados.

### Acciones renales

La AII ejerce una acción vasoconstrictora selectiva sobre la arteriola eferente (Hall, 1986). Ello no implica que no se produzca vasoconstricción aferente, ni que no existan receptores a este nivel, sino que la acción vasoconstrictora de la AII se encuentra compensada por factores vasodilatadores como la  $PGI_2$  y el NO, que ejercen una acción protectora sobre esta arteriola, ante aumentos de la AII. El hecho de que la

AII ejerza una vasoconstricción funcional selectiva sobre la arteriola eferente, supone una disminución del flujo sanguíneo renal (FSR) pero un mantenimiento de la tasa de filtración glomerular (TFG) (Romero y Knox, 1988). Por ello, la activación del SRA es importante para la regulación de la TFG en situaciones como la ingesta baja de sodio, la estenosis de la arteria renal o la insuficiencia cardíaca. La vasoconstricción de la arteriola eferente es un mecanismo indirecto por el que la AII disminuye la natriuresis (Figura 5), ya que el descenso del FSR sin cambios en la TFG va a aumentar la fracción de filtración, produciendo una mayor reabsorción de agua y electrolitos en el túbulo proximal. Esto, a su vez, provoca la disminución del volumen del fluido tubular que llega a la porción descendente del asa de Henle y por consiguiente permite que aumente la osmolaridad de la médula renal y de la orina. Otro mecanismo indirecto por el que la AII ejerce su efecto antinatriurético es mediante la reducción del flujo sanguíneo medular como consecuencia de su efecto vasoconstrictor sobre la arteriola eferente de las nefronas yuxtamedulares y de los vasos rectos. Este efecto unido al incremento de la osmolaridad intersticial medular, hace que aumente la capacidad de concentración de la orina (Hall et al., 1980, Hall, 1986a, Hall, 1986b).

La AII participa además en el proceso de autorregulación renal, que consiste en el mantenimiento del FSR y de la TFG cuando aumenta la presión de perfusión renal. Si disminuye la presión arterial y por tanto, la presión de perfusión renal, disminuye la presión hidrostática glomerular y con ella la filtración glomerular. Como consecuencia, la concentración de NaCl que alcanza la mácula densa se reduce y ello supone la activación de la secreción de renina y por tanto de AII, que aumenta la vasoconstricción eferente elevando la presión hidrostática glomerular y ayudando a mantener la TFG.

Las acciones tubulares de la AII son principalmente la reabsorción de sodio, agua, bicarbonato y cloruro, dando lugar a una marcada diuresis, natriuresis y cloruresis; evidenciando así el importante papel de la AII y de los receptores AT<sub>1</sub> en la regulación de la reabsorción de fluido y electrolitos en el túbulo proximal (Cogan et al., 1991). El efecto tubular de la AII sobre la reabsorción de agua y sodio tiene una gran importancia en el mecanismo de presión diuresis/natriuresis. Como se ha señalado anteriormente, el aumento de la presión de perfusión renal conlleva una disminución de la AII intersticial que afecta a la acción del péptido sobre la reabsorción tubular de sodio, por lo que esta disminuye y se produce el característico aumento de diuresis y natriuresis que acompaña al aumento de presión de perfusión renal.

### **Acciones sobre la glándula adrenal**

La AII es uno de los principales estímulos para la síntesis y liberación de la aldosterona en la zona glomerulosa de la corteza adrenal, aunque no es el único órgano donde se libera ya que en corazón, cerebro y vasos también se expresa. Sin embargo, se ha demostrado que pequeños aumentos de AII intrarrenal a dosis no presoras, producen cambios considerables de la natriuresis que no se acompañan de modificaciones de la concentración plasmática de aldosterona (Kanagy et al., 1990). Por tanto, la participación de la aldosterona en la acción antinatriurética de la AII en condiciones normales parece ser secundaria, aunque hay que destacar que la aldosterona contribuye a evitar una pérdida excesiva de sodio y por tanto de retención de agua, en situaciones de una ingesta baja en sal. Además, la AII actúa también de forma indirecta a través del sistema simpático en la médula de la glándula adrenal, facilitando la liberación de catecolaminas por la médula adrenal e interfiriendo con la recaptación de noradrenalina por las terminaciones presinápticas. Cuando se inyecta AII a través de las arterias vertebrales, su efecto presor es más acentuado que si se administra la misma dosis por vía sistémica, indicando su efecto a nivel del SNC y, más concretamente, a nivel del área postrema.

### **Acciones sobre el sistema nervioso central**

En el SNC, la AII participa en procesos tan diversos como los relacionados con la memoria, la atención, el comportamiento, la regulación vasomotora, la secreción de la vasopresina, el mecanismo de la sed y la secreción de ACTH (Phillips, 1987). En la mayoría de estas áreas se generan unas acciones relacionadas con la regulación de la presión arterial y del equilibrio hidroelectrolítico, interaccionando con distintos neurotransmisores como las catecolaminas, la acetilcolina, la dopamina, la serotonina y el GABA. La AII activa el eje adrenal en el SNC y aumenta la síntesis de vasopresina generando un aumento de la resistencia arteriolar y un mayor gasto cardíaco. Además se produce un aumento de la hormona antidiurética ADH cuyo principal efecto es la reabsorción de agua, así como un aumento en la sensación de sed, promoviendo la ingesta de agua (Figura 5). Estudios *in vitro* e *in vivo* también han sugerido que la liberación de vasopresina por la AII a través de los receptores AT<sub>1</sub> implica vías catecolaminérgicas en el cerebro. Diversos estudios han puesto de manifiesto la relación

entre la AII a nivel central e ingesta de sal. De hecho, se ha sugerido que el SRA central es sensible a aumentos de la ingesta de sal en pacientes con sensibilidad a la sal y se ha propuesto que las alteraciones de este SRA podrían contribuir a la llamada hipertensión sensible a la sal (de Gasparo et al., 2000, Zaman et al., 2002).

### **Acciones cardiacas**

En el corazón la AII, a través de los receptores  $AT_1$ , ejerce un efecto inotrópico y cronotrópico positivo que conduce a un aumento del volumen minuto (Dzau et al., 1993) y dichos efectos tienen lugar con cantidades de AII que carecen de efecto vasoconstrictor. También, la AII generada localmente en el corazón participa en la regulación de la comunicación entre cardiomiocitos y en la propagación del impulso cardiaco y en la regulación del flujo coronario mediante un efecto vasoconstrictor.

Además del aumento de la contractilidad mediado por la AII, también es importante señalar el efecto hipertrófico de la AII en el miocardio independientemente de su acción presora (Neyses et al., 1993). La hipertrofia ventricular izquierda y el engrosamiento de la pared vascular, son fenómenos frecuentemente asociados a la hipertensión, y tienen notables repercusiones funcionales para determinados órganos como el cerebro, el corazón y el riñón. La activación de los receptores  $AT_1$  por parte de la AII, contribuye de manera importante a la producción de hipertrofia ventricular (HV). La AII actúa a través del  $TGF-\beta_1$ , que ejerce una mayor influencia en la producción de matriz extracelular por los fibroblastos, sobre todo de colágeno y fibronectina, característica del proceso de reparación. La fibronectina es un indicador sensible de cambios en el fenotipo de los fibroblastos cardíacos, y su presencia precede la aparición morfológica de fibrosis. Es probable que la Ang II sea reguladora indirecta de la función de los fibroblastos cardíacos a través de factores de crecimiento específicos, tales como el  $TGF-\beta$ , la osteopontina y la ET-1. El  $TGF-\beta$  requeriría para dicha acción factores de apoyo, tales como proteínas receptoras o activadoras. La OPN parece ser un importante mediador del remodelado por AII, y procede principalmente de los cardiomiocitos. La ET-1, sintetizada por miocitos y fibroblastos estimula la producción de colágeno I y III en las CMLV coronarias. Además la AII regula la degradación del colágeno atenuando la producción de MMPs en los fibroblastos cardíacos y aumentando la producción de TIMP-1 (Tissue Inhibitor MetalloProteinase-

1) por las células endoteliales (CE). Por otro lado, la AII regula el sistema funcional local miocítico de aldosterona que participa de forma muy importante en la fibrosis cardiaca. La sobrecarga dinámica como consecuencia de la hipertensión, es el principal factor mecánico que afecta al miocardio, por lo que se considera que el crecimiento miocárdico en respuesta a una presión arterial elevada es un proceso adaptativo. Tanto los factores mecánicos como los humorales, promueven señales intracelulares que aumentan la expresión de protooncogenes como el c-Jun, c-Myc o el c-Fos que estimulan la síntesis ulterior de proteínas actuando a tres niveles: codificando la síntesis de factores de crecimiento, codificando la síntesis de receptores para los factores de crecimiento y codificando la síntesis de factores de transcripción (Komuro et al., 1988). Todo ello conduce a una hipertrofia de los cardiomiocitos y a la aparición de fibrosis intersticial que lleva al desarrollo de la hipertrofia ventricular. Recientes estudios han sugerido que la sobrecarga dinámica puede activar a los receptores  $AT_1$  independientemente de la generación de AII. Así, se ha propuesto que la AIII y la AIV podrían ejercer acciones independientes de las mediadas por AII, a través de los receptores  $AT_1$ . Pero la alternativa más interesante para explicar estos efectos es la posible interacción entre los receptores  $AT_1$  y los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR). Recientemente, se ha descrito la heterodimerización entre los receptores  $AT_1$  y los receptores acoplados a proteína G, como los receptores  $\beta$ -AR, que se unen formando complejos moleculares y que al bloquear los receptores  $AT_1$  se puede inhibir la señalización a través de los receptores  $\beta$ -AR. Este aspecto es de gran importancia si se considera el uso de ARAII o  $\beta$  bloqueantes en el tratamiento de enfermedades como el fallo cardiaco ya que la utilización de un antagonista podría bloquear más de una ruta de señalización (Barki-Harrington et al., 2003).

### **Acciones vasculares**

La AII participa en la regulación del tono vasomotor, del crecimiento celular y de apoptosis. Induce la acumulación de colágeno en los tejidos y la migración celular. Tiene características proinflamatorias y estimula la producción de factores de crecimiento como el PDGF y vasoconstrictores como el ET-1. De esta forma es un factor muy importante de la integridad anátomo-funcional de la pared arterial y en procesos que regulan la presión arterial. Las acciones (múltiples) de la Ang II están

mediadas por complejos sistemas de señalización que se activan al unirse la hormona a su receptor (Touyz y Schiffrin, 2000).

La AII participa en la regulación del tono vascular mediante su acción vasoconstrictora del músculo liso vascular y por su acción facilitadora de la transmisión adrenérgica. La contracción del músculo liso vascular está principalmente regulada por activación del receptor y de las proteínas contráctiles. En respuesta a estímulos específicos la concentración calcio libre citosólico aumenta y el catión se combina con calmodulina, formando el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina que activa a la kinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que va a fosforilar a la cadena ligera de miosina, permitiendo la formación del puente cruzado de actina-miosina. El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta por liberación del mismo desde el retículo sarcoplásmico o por entrada a la célula a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , como se ha descrito anteriormente (ver página 56 Fig. 10). El calcio se une a la calmodulina activando la kinasa de la cadena ligera de miosina, que la va a fosforilar y promover la contracción del músculo liso vascular (Dzau, 1986). El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular junto con la PKC promueven la expresión de factores de transcripción tales como c-Fos, c-Myc y c-Jun, así como la transcripción de factores de crecimiento como el PDGF-A o de TGF- $\beta$ , todos ellos vinculados a procesos fibróticos (Kanaide et al., 2003).

La AII induce crecimiento vascular en las CMLV, las células endoteliales, los fibroblastos o las células mesangiales. Este efecto está mediado a través de los receptores  $\text{AT}_1$  que inducen la fosforilación de las proteínas tirosin-kinasa de MAP (MAPK) (Thomas et al., 2002). Como consecuencia de este crecimiento, se produce la formación de nuevos capilares o angiogénesis.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, alteraciones en la matriz extracelular pueden inducir el desarrollo de las complicaciones vasculares. Así, la fibrosis vascular asociada a hipertensión genera cambios en las arterias como la producción de colágeno y fibronectina, destrucción de las fibras elásticas e hipertrofia de las CMLV. Se ha descrito que tanto la AII como el TGF- $\beta$  participan de manera activa en la señalización que induce la acumulación de matriz. De hecho, estudios en modelos animales de daño vascular, se ha observado la importancia de la AII a través de los receptores  $\text{AT}_1$  en el proceso fibrótico (Brede and Hein, 2001, de Gasparo et al., 2000, Mezzano et al., 2001, Ruiz-Ortega et al., 2001). Estas alteraciones de la estructura vascular tienen importantes repercusiones no sólo morfológicas, sino también funcionales para diversos órganos como el corazón, el SNC y el riñón.

La AII, junto con el estrés hemodinámico que se produce en la hipertensión arterial, es uno de los principales factores causantes de las alteraciones morfológicas de la pared vascular (Heagerty, 1991). Las acciones de la AII sobre el crecimiento de la pared vascular dependen de la activación de los receptores AT<sub>1</sub> en las células musculares lisas. Es importante destacar que las señales intracelulares puestas en marcha por la AII, a corto plazo median la vasoconstricción, pero a largo plazo modifican la expresión génica promoviendo la síntesis de ADN y de proteínas. Se ha demostrado que la AII a través de la activación de las rutas de la p38 MAPK y de la p42/44 MAPK promueve una respuesta hipertrófica en las CMLV (Ushio-Fukai et al., 1998). Como se ha mencionado anteriormente, la AII también es capaz de estimular la producción y la acción de factores mitogénicos como el bFGF, el PDGF, el factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ), el VEGF o el CTGF que estimulan la proliferación de las células musculares lisas y la síntesis de proteínas.

### **Acciones sobre el proceso aterogénico**

Numerosas evidencias indican que la AII puede ser considerada como un factor proaterogénico ya que influye en diversos mecanismos que participan en la iniciación y desarrollo de la aterosclerosis. La AII bien directa o indirectamente mediante la producción de otros factores vasoconstrictores como catecolaminas, ET y TXA<sub>2</sub> que producen un aumento de las resistencias periféricas y por tanto, de la presión arterial (Heagerty, 1991, Lahera et al., 2000), produce un mayor estrés hemodinámico sobre la pared vascular favoreciendo el desarrollo de una lesión endotelial que es una pieza clave en el inicio del proceso aterosclerótico. Además, la activación de los factores de crecimiento de acción local por la AII, estimula la proliferación y la migración de las células musculares lisas y la producción de colágeno, elastina y proteoglicanos por la pared vascular, lo cual favorece la formación de la lesión aterosclerótica. Asimismo, este péptido aumenta la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno como los aniones superóxido a través de actividades enzimáticas como la NADH/NADPH oxidasa al estimular alguna de las subunidades de este complejo enzimático (Rajagopalan et al., 1996). Este aumento del estrés oxidativo favorece también la oxidación de las LDL, con los consiguientes efectos deletéreos sobre la función endotelial.

La AII juega también un papel clave en la respuesta inflamatoria que subyace al desarrollo aterosclerótico a través de distintos mecanismos. En primer lugar, promueve la adhesión de leucocitos al endotelio al inducir la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-P, ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales mediante la activación del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (Kranzhofer et al., 1999). Asimismo, la AII promueve la infiltración de células en la pared vascular no sólo al aumentar la expresión de citoquinas como la Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1, MCP-1 y la IL-8 (Bush et al., 2000) sino también, al aumentar la permeabilidad vascular vía PGs y factores de crecimiento (Williams et al., 1995). En presencia de moléculas LDL oxidadas, la AII promueve la diferenciación de los monocitos a macrófagos y aumenta la expresión de receptores para las LDL oxidadas como los receptores scavenger CD36 y los receptores LOX-1 (lecitin-like) facilitando la formación de células espumosas (Keidar et al., 1993). Este octapéptido favorece, asimismo, la progresión de la lesión aterosclerótica porque va a participar en la migración y proliferación de las células musculares lisas favoreciendo a su vez, el paso de fenotipo contráctil a fenotipo sintético lo que determina la producción de la matriz extracelular (colágeno, elastina y proteoglicanos) (Pratt y Dzau, 1993). Esto inicia la respuesta fibrótica en la neointima que da lugar, finalmente, al remodelado de la pared vascular y la formación de la cápsula fibrosa que recubre el núcleo lipídico y el tejido necrótico.

La AII puede también participar en la inestabilidad de la placa y en la aparición de eventos agudos al favorecer la trombogenicidad de la misma alterando el balance de coagulación y fibrinólisis. La AII activa la cascada de la coagulación en los vasos ateroscleróticos ya que induce el factor tisular que inicia el proceso de coagulación al unirse al factor VII activado (Dechend et al., 2000). Asimismo, se ha observado que puede favorecer la producción de otros factores implicados en la cascada de la coagulación como el fibrinógeno, la trombomodulina y el factor XII (Schmidt-Ott et al., 2000). La AII, además, favorece la activación y la agregación plaquetaria directa o indirectamente. Directamente al estimular la producción de  $\text{TXA}_2$  y catecolaminas (Arakawa, 2001). Por último, es importante destacar que la AII puede modificar el balance fibrinolítico ya que induce un rápido aumento dosis-dependiente de los niveles del inhibidor del plasminógeno tisular tipo 1 (PAI-1) (Brown et al., 1998) al aumentar la expresión del gen, reduciendo por tanto, la degradación de fibrina. Este aumento puede ser estimulado también por otros componentes del SRA como la AIV, que actúa a través de receptores específicos distintos de los que median las acciones de la AII (Kerins et

al., 1995). Por tanto, una activación del SRA promueve un estado protrombótico que tiene su máxima relevancia cuando se rompe la placa de ateroma, favoreciendo las complicaciones clínicas de dicho proceso.

Es importante mencionar que no sólo la AII juega un papel importante en el desarrollo aterosclerótico al estimular la mayor parte de los procesos implicados en el mismo, sino que además se produce un aumento de los niveles de AII en el desarrollo aterosclerótico. La hipercolesterolemia y las LDL oxidadas aumentan la producción de AII mediante el aumento de la actividad de la ECA. Este aumento se produce especialmente en las zonas de las placas con un alto contenido de células inflamatorias (Fukuhara et al., 2000). Estos datos sugieren que la AII no sólo favorece el desarrollo aterosclerótico sino que la hipertensión, siendo uno de los principales factores de riesgo para su desarrollo, potenciaría las acciones de la AII.

## **RECEPTORES AT<sub>2</sub>**

La AII a través de su unión con los receptores AT<sub>2</sub> ejerce unas acciones diferentes a las ejercidas a través de los receptores AT<sub>1</sub>. Estas son las siguientes (Zaman et al., 2002):

- Inhibición del crecimiento celular o antiproliferación
- Promueve la diferenciación celular
- Diferenciación celular
- Reparación de tejido
- Apoptosis
- Vasodilatación
- Desarrollo renal y del tracto urinario
- Efecto protector frente a isquemia

Los receptores AT<sub>2</sub> inhiben el crecimiento celular, inducen apoptosis, participan en procesos de antiproliferación de células endoteliales coronarias, inhibición de neoíntima y diferenciación celular. Además, están vinculados al remodelado cardiaco tras el infarto de miocardio. Se ha descrito que la estimulación de los receptores AT<sub>2</sub> (in vitro) induce la producción de NO (con el consiguiente efecto vasodilatador), inhibe el

crecimiento y proliferación del músculo liso vascular y cardíaco, estimula apoptosis, y promueve síntesis de la matriz extracelular (Henrion et al., 2001). Sin embargo, la estimulación crónica de los receptores AT<sub>2</sub> (in vivo) induce hipertrofia cardíaca y fibrosis. De hecho, se ha descrito que en fibroblastos cardíacos localizados en las zonas fibróticas de corazones insuficientes de ratas, hay una sobreexpresión de los receptores AT<sub>2</sub> que ejercen acción anti-AT<sub>1</sub> durante la progresión de la fibrosis, inhibiendo el metabolismo del colágeno y el crecimiento de los fibroblastos, durante el remodelado cardíaco (Ohkubo et al., 1997). Además de las acciones de la AII a través de los receptores AT<sub>2</sub> arriba expuestas, se ha descrito que pueden aumentar la síntesis de prostaciclina en cultivo de adipocitos. El mecanismo que subyace a dicho efecto permanece sin esclarecer así como los mecanismos de otras tantas acciones. Sin embargo, se han descrito varias rutas de señalización a través de las cuales, la AII y los receptores AT<sub>2</sub> ejercen algunas de sus acciones. Estas son la activación las proteínas G acopladas al receptor, de manera similar al mecanismo de los AT<sub>1</sub>; otra es la activación de las fosfatasa 2A de serina/treonina (PP2A) y la consiguiente apertura de los canales rectificadores retardados de potasio; otra es la activación de las fosfatasa de fosfotirosina (PTP) citosólicas que pueden cerrar los canales de calcio tipo T, a través de la inactivación o la activación de manera temporal las MAPK, cuyo efecto inhibitorio presumiblemente es a través de PP2A, MKP-1 u otras PTP mientras que la activación es a través de la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Aún así, todavía quedan muchas dudas sin resolver respecto a los mecanismos (de Gasparo et al., 2000).

## **6. ANTAGONISTAS NO PEPTÍDICOS DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> DE ANGIOTENSINA II**

Teniendo en cuenta que la AII participa decisivamente en el desarrollo y las complicaciones de diversas patologías cardiovasculares y renales como la aterosclerosis, la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia renal, etc, la inhibición de las acciones de la AII ha sido de gran importancia en el avance del tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y sigue siendo uno de los objetivos primordiales de la terapéutica cardiovascular y renal actual.

El primer antagonista de los receptores de AII (ARAI) sintetizado fue la saralasin, un antagonista peptídico de la AII eficaz por vía intravenosa (Pals et al., 1971) y con efectos agonistas (Anderson et al., 1977, Castellion and Fulton, 1979).

Posteriormente se desarrollaron los antagonistas no peptídicos S-8307 y S-8308, que carecían de los efectos agonistas de la saralasin y otros como el EXP9654, el EXP9270 y el EXP9020, que eran capaces de reducir la presión arterial al ser administrados por vía intravenosa y eran más eficaces que la saralasin al ser administrados oralmente. Después de numerosos cambios en la estructura y diseño de estos compuestos, se desarrolló el primer antagonista de naturaleza no peptídica de la AII, selectivo y activo por vía oral (Rhaleb et al., 1991, Timmermans et al., 1991), losartan, que fue aprobado para su uso terapéutico en 1995. A partir de entonces se han desarrollado más antagonistas derivados del bifenil-metil o tienil-metil de ácido acrílico.

### **6.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ARAII**

El principal mecanismo de acción de los antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> es la inhibición de la activación de estos receptores por la AII. Como consecuencia quedan inhibidas de manera selectiva la mayoría de las acciones clásicas de la AII anteriormente citadas. Hay que destacar que estas acciones no son consecuencia de un efecto de los antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> sobre otros tipos de receptores, ya que son altamente selectivos y se ha demostrado que no son capaces de desplazar a ligandos que se unen a canales de calcio, receptores adrenérgicos, muscarínicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos, opioides, histaminérgicos, etc. Los efectos anteriores son muestra de la implicación de los receptores AT<sub>1</sub> como estimuladores o potenciadores de la liberación de otros agentes.

Las acciones de los ARAII se deben al bloqueo de una serie de señales intracelulares como el aumento de la concentración de calcio intracelular, previniendo la vasoconstricción en las células musculares lisas y la secreción de aldosterona por las células de la corteza adrenal. Asimismo, la acción vasoconstrictora de la AII se puede bloquear actuando sobre diferentes mecanismos: inhibiendo la activación de la PLA<sub>2</sub> y la PLD, responsables de la producción de prostaglandinas vasoconstrictoras (PGE<sub>2</sub>); bloqueando la reducción de los niveles de AMPc; y disminuyendo la concentración de calcio intracelular originado a partir de la activación de la PLC. Además, la vía de señales intracelulares de las MAP kinasas (Proteína Mitogénica Activada), sufre una disminución de su actividad siendo responsable de los efectos antiproliferativos y reductores del crecimiento celular de estos fármacos. En esta acción disminuye la fosforilación de numerosas proteínas, así como la activación de MAPK y la expresión

de diferentes protooncogenes (c-Fos, c-Jun y c-Myc) que estimulan la síntesis de factores de crecimiento y de transcripción (Berk y Corson, 1997).

Recientemente se ha destacado otro posible mecanismo de acción de los ARAII que involucra una acción antioxidante. Como se ha señalado, el aumento de la producción local de especies oxidantes del oxígeno, tiene un papel clave en la inactivación del NO y por tanto en el desarrollo de la disfunción endotelial. Los ARAII reducen la producción de aniones superóxido en diversos modelos experimentales de hipertensión y aterosclerosis, mediante la disminución de la expresión y actividad de enzimas como la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa, contribuyendo de esta manera al aumento de la disponibilidad del NO y a la mejora de la función endotelial en dichas situaciones (Cediel et al., 2003, Sanz-Rosa et al., 2005).

En los últimos años se ha discutido sobre la posible implicación de los receptores AT<sub>2</sub> en los efectos de los antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub>. Se ha propuesto que aunque la afinidad de la AII por estos últimos es mucho menor que por los AT<sub>1</sub>, en presencia de antagonistas de estos receptores, la AII podría unirse a los receptores AT<sub>2</sub> y activar las acciones relacionadas con éstos. Como dichas acciones parecen ser en general opuestas a las de los receptores AT<sub>1</sub>, se ha propuesto que parte de las acciones observadas en presencia de antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> podrían también tener un componente dependiente de AT<sub>2</sub>. Diversos resultados experimentales han puesto de manifiesto que el bloqueo de los receptores AT<sub>2</sub> disminuye los efectos de los antagonistas de los AT<sub>1</sub> como la disminución de la presión arterial, el aumento del flujo sanguíneo renal de la diuresis y natriuresis y la disminución de la hipertrofia vascular en modelos experimentales de hipertensión. La activación de los receptores AT<sub>2</sub> parece estimular la síntesis de NO y el aumento de la concentración de GMPc, así como la estimulación de la fosfotirosina fosfatasa implicada en la inhibición de la proliferación celular (de Gasparo y Levens, 1998).

El antagonismo de los receptores AT<sub>1</sub> no sólo tiene relación con los procesos relacionados con la hipertensión como el aumento de resistencias periféricas y las alteraciones de la función renal, sino también y en los últimos años se ha demostrado un posible papel en la inhibición del desarrollo aterosclerótico y en sus complicaciones, así como en el equilibrio fibrinolítico (Oubina et al., 2002). Los resultados obtenidos hasta ahora son en modelos experimentales de aterosclerosis (Strawn et al., 2000), que demuestran claramente una reducción del tamaño de la lesión y la estabilización de la placa de ateroma, como consecuencia de una disminución de todos sus componentes,

células espumosas, células musculares, contenido lipídico y matriz extracelular (las Heras et al., 1999).

## **6.2. EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE LOS ARAII**

Los antagonistas no peptídicos de los receptores de AII se pueden dividir en tres grupos: aquellos que bloquean selectivamente los receptores AT<sub>1</sub>, los que bloquean los receptores AT<sub>2</sub> y los que antagonizan de manera similar los dos tipos de receptores. Los del segundo tipo se desarrollaron inicialmente con la esperanza de encontrar algún uso terapéutico, sin embargo todavía no se conoce ningún proceso o mecanismo patológico que pueda hacer útil, desde el punto de vista terapéutico, el bloqueo de los receptores AT<sub>2</sub>, por lo que este tipo de antagonistas se han quedado como meras herramientas de investigación. Los actuales antagonistas no peptídicos de los receptores AT<sub>1</sub> muestran una afinidad por estos receptores unas 10.000 veces mayor que la que tienen por los receptores AT<sub>2</sub>.

Varios estudios realizados en animales y en pacientes hipertensos han mostrado que el tratamiento antihipertensivo fue capaz de mejorar la relajación endotelio dependiente y reducir el engrosamiento de la pared arterial (Rizzoni et al., 1998, Rodrigo et al., 1997, Schiffrin et al., 2000, Schiffrin and Deng, 1995, Thybo et al., 1995). A pesar de ello, la mera reducción de la presión arterial elevada no parece ser el único mecanismo responsable de los efectos beneficiosos de los fármacos antihipertensivos. De hecho tanto los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina como los antagonistas de los receptores de angiotensina II han demostrado ser los fármacos antihipertensivos más eficaces a la hora de mejorar la disfunción endotelial y el remodelado vascular (Rizzoni et al., 1998, Rodrigo et al., 1997, Schiffrin et al., 2000, Schiffrin y Deng, 1995, Thybo et al., 1995). Los mecanismos responsables de estos efectos beneficiosos ejercidos por los IECAs y ARAIIs sobre la disfunción endotelial han sido ampliamente estudiados, generando una variedad de resultados, incluyendo el aumento en la disponibilidad de NO y una reducción de la producción vascular de anión superóxido (Cachofeiro et al., 1995, Gibbons, 1997, Mombouli y Vanhoutte, 1999, Munzel et al., 1997, Rizzoni et al., 1998, Rodrigo et al., 1997, Schiffrin et al., 2000, Schiffrin y Deng, 1995, Thybo et al., 1995).

Diversos estudios han demostrado que los ARAII son capaces de reducir la morbilidad y mortalidad cardiovascular en situaciones de hipertensión, diabetes e

insuficiencia cardiaca. Por ejemplo, el estudio LIFE (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hipertensión) demostró que para un mismo control de la presión arterial, el antagonista de los receptores tipo 1 de Angiotensina II, Losartán, era superior a la hora de reducir los objetivos cardiovasculares, principalmente el ictus, frente al antagonista de los adrenoreceptores  $\beta$ , Atenolol (Dahlof et al., 2002). Posteriormente, en el estudio sobre el conocimiento y pronóstico en el anciano, SCOPE, se concluyó que en pacientes ancianos hipertensos tratados con Candesartán, experimentaban una ligera reducción de la presión arterial respecto de aquellos que fueron tratados con el diurético, hidroclorotiazida, y que esa reducción se asociaba con una modesta y no significativa reducción de los principales eventos cardiovasculares y con una marcada disminución en la incidencia de accidentes cerebrovasculares no fatales (Lithell et al., 2003). Pero no todos los ensayos clínicos muestran resultados positivos a favor de los ARAII. Por ejemplo, en el estudio VALUE, donde se comparó Valsartán con el calcio antagonista Amlodipino, los pacientes tratados con el ARAII sufrieron más casos de infarto de miocardio y de ictus en lugar de estar mejor prevenidos. Por otro lado, en el grupo de pacientes tratados con Valsartán hubo menos casos de desarrollo de Diabetes que en los pacientes tratados con Amlodipino. Ante estos resultados no parecería aconsejable el uso de ARAII, sin embargo, los investigadores sugieren que estos resultados negativos son fuente de un mal control de la presión arterial, ya que en todo momento el grupo de pacientes tratados con Valsartán tuvo como media 2 mm de Hg mas elevada la PAS que el resto de pacientes (Julius et al., 2004). Recientemente, en el estudio CHARM Alternativo se demostró que Candesartán estaba bien tolerado en aquellos pacientes con intolerancia previa a otro inhibidor del SRA. Además en pacientes con insuficiencia cardiaca crónica y sintomática e intolerancia a IECA, el tratamiento con Candesartán redujo la morbimortalidad cardiovascular. En pacientes tratados con IECAS y  $\beta$ -bloqueantes, la incorporación de Candesartán a la terapia, reducía de manera importante la morbimortalidad cardiovascular en pacientes con fallo cardiaco (CHARM Adicional). Este beneficio se obtenía con pocos efectos adversos, aunque existía un aumento en el riesgo de hipotensión, hiperkalemia y disfunción renal. Finalmente, el CHARM preservado ponía de manifiesto que el bloqueo de los receptores tipo 1, con Candesartán, reducía de manera significativa las hospitalizaciones por insuficiencia cardiaca y prevenía el desarrollo de Diabetes Mellitus (Pfeffer et al., 2003).

# OBJETIVOS



Teniendo en cuenta que la hipertensión se asocia a daño vascular y que la angiotensina II parece jugar un importante papel en este daño, el objetivo general del presente trabajo es profundizar en los mecanismos que participan en las alteraciones estructurales, funcionales e inflamatorias asociadas a la hipertensión en ratas. Para llevar a cabo este objetivo se estudiarán los mediadores de:

1. El remodelado vascular
2. La reactividad vascular
3. El estrés oxidativo
4. El proceso inflamatorio vascular

Asimismo, se estudiará el papel de la angiotensina II en las alteraciones asociadas a la hipertensión anteriormente mencionadas, mediante el tratamiento crónico con un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II.



# **METODOS**



## **1.-ANIMALES, DIETA Y TRATAMIENTO**

Se utilizaron ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR, n=18) y sus controles normotensos, ratas Wistar Kyoto (WKY, n=18) (Harlan Interfauna Ibérica, S.L. Barcelona, España) de 22 semanas de edad. Las ratas estuvieron en instalaciones adecuadas con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, bajo condiciones de temperatura controlada y con acceso libre al agua y alimento (dieta estándar, A. 04 Panlab, Barcelona, España). Las ratas se trataron con Candesartán-cilexetil (en adelante candesartán; AstraZenecaSpain S.A.) a una dosis de 2 mg/Kg/día en el agua de bebida durante 10 semanas. La elección de la dosis de candesartán se realizó en base a experimentos pilotos y revisión bibliográfica (Yoshiyama et al., 1999) con objeto de obtener un efecto antihipertensivo moderado en las ratas hipertensas. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la normativa de la Unión Europea para el tratamiento ético de los animales de experimentación.

## **2.-MEDIDA DE LA PRESIÓN ARTERIAL**

La presión arterial sistólica se midió de manera indirecta en la arteria caudal de la cola de las ratas mediante un método pletismográfico (Narco Bio-Systems, Houston, TX, USA). Diez días antes de comenzar el experimento se acostumbraron a las ratas diariamente al proceso de la medida de la PAS (Presión arterial sistólica). El procedimiento fue el siguiente, las ratas se colocaban en sus jaulas dentro de una habitación con una temperatura mantenida de 28° C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se les medía la PAS sin llegar a inmovilizarlas totalmente para evitar que los animales se estresaran. Una vez acostumbradas las ratas al proceso de medida, se determinó la PAS. El valor de la PAS fue la media aritmética de la toma de ocho medidas sucesivas en dos días consecutivos y a la misma hora.

Con objeto de validar el método de medida indirecta de la PAS, se comparó ese método con uno de medida directa. Se tomaron al azar una serie de animales de los distintos grupos (n=7) a los que se les implantó un catéter en la arteria femoral. Dos días después de la intervención se conectaron a un transductor de presión (modelo P23XL, Spectromed, Oxnard, CA, USA) que estaba acoplado a un polígrafo (7E, Grass

Instruments, Quincy, MA, USA) para registrar la PAS directamente en la rata consciente. La comparación de ambos métodos mostró una correlación media de todos los experimentos del  $93 \pm 3 \%$  entre los valores determinados por medida directa y los obtenidos de manera indirecta.

### **3.-FUNCIÓN VASCULAR**

La aorta torácica se disecó, se extrajo y se sumergió en una solución bicarbonatada de Krebs oxigenada y fría que tenía la siguiente composición en mmol/L : NaCl 118.5, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 y glucosa 11.1. La grasa y el tejido conjuntivo adherido a la adventicia se eliminaron cuidadosamente. Posteriormente, la arteria se seccionó transversalmente en segmentos de aproximadamente 3 mm de longitud. Los anillos aórticos se colocaron en baños de órganos que contenían 5 mL de Krebs a una temperatura de 37°C y se montaron entre dos alambres rígidos de acero (150  $\mu$ m de diámetro) que se introducían por la luz arterial con cuidado de no producir estiramientos en el vaso ni dañar el endotelio. Uno de los alambres permanecía fijo a la pared del baño y el otro, paralelo al anterior, se conectó a un transductor de fuerza (modelo FT03, Grass) que se encontraba acoplado a un sistema computerizado (Mc Lab 8E, AD Instruments) con el objeto de registrar los cambios en la tensión isométrica desarrollados. El medio de incubación era continuamente oxigenado con una mezcla gaseosa de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> que proporcionaba un pH final fisiológico entre 7,4 y 7,6.

Los segmentos arteriales se equilibraron a una tensión inicial de 2 g, reajustándolos a esta tensión y cambiando el medio de incubación con una frecuencia de 15 minutos, hasta que transcurrido un periodo de 60-90 minutos los anillos se estabilizaron a dicha tensión basal. En estudios previos se comprobó que la tensión basal de 2 g era la óptima para la expresión de la contracción inducida por cloruro potásico (KCl) en anillos de aorta de SHR. La presencia de un endotelio funcional se comprobó al final de cada experimento valorando la vasorelajación inducida por  $10^{-5}$  mol/L de Ach. Todos los anillos que no presentaban respuesta vasodilatadora a Ach fueron eliminados.

### 3.1. Respuesta vasoconstrictora

Se estudió la respuesta inducida por concentraciones crecientes de KCl (10-80 mmol/L) en anillos aórticos con endotelio para valorar si se producían alteraciones en los mecanismos contráctiles generales de las células de músculo liso vascular.

Se estudió la vasoconstricción a un agonista de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos como es la fenilefrina (FE;  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mmol/L) en anillos aórticos con endotelio. Asimismo, se evaluó la respuesta vasoconstrictora dependiente de receptor en anillos aórticos con endotelio, inducida por angiotensina I y II (AI y AII;  $10^{-6}$  mmol/L). Se utilizó una sola concentración de AI y AII para evitar el efecto taquifiláctico.

La contracción dependiente de endotelio inducida por la acetilcolina ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  mmol/L) en presencia de un inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L) se realizó en anillos aórticos con endotelio con objeto de estudiar la liberación de los factores vasoconstrictores derivados de endotelio, EDCFs endógenos. La Ach a elevadas concentraciones además de estimular la liberación de NO, PGI<sub>2</sub> y EDHF en las células endoteliales, también es capaz de producir la liberación de EDCFs, principalmente de TXA<sub>2</sub> y/o PGH<sub>2</sub>. Para poder estudiar adecuadamente la contracción a dichos agentes es necesario inhibir la síntesis de NO, ya que éste es el principal factor liberado por la Ach en aorta y debido a su acción vasodilatadora puede enmascarar la contracción inducida por estos EDCFs (Auch-Schwelk et al., 1992, Kung and Luscher, 1995)

### 3.2. Respuesta vasodilatadora

Los anillos con endotelio se contrajeron previamente con fenilefrina (FE;  $5 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$  mol/L) hasta alcanzar una contracción submáxima (entre el 60-70 % de la respuesta máxima) y estable, necesaria para realizar las curvas de concentración - respuesta a la Ach ( $10^{-11}$ - $10^{-8}$  mol/L), a un agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, Isoproterenol (ISO;  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  mol/L), y a un donador de NO, Nitroprusiato Sódico (NPS;  $10^{-10}$ - $10^{-7}$  mol/L).

### **3.3. Reactivos químicos utilizados**

- Angiotensina I y II (Sigma Aldrich Química)
- Clorhidrato de N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginina metil ester (Sigma Aldrich Química)
- Cloruro de acetilcolina (Sigma Aldrich Química)
- Cloruro cálcico (Panreac)
- Cloruro de fenilefrina (Sigma Aldrich Química)
- Cloruro Potásico (Merck)
- Cloruro sódico (Panreac)
- Dihidrógeno carbonato de sodio (Panreac)
- Dihidrógeno fosfato de potasio (Panreac)
- Nitroprusiato sódico (Sigma Aldrich Química)

Los reactivos se disolvieron en agua destilada a una concentración inicial de  $10^{-2}$  mol/L, y se almacenaron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . En el momento de su utilización, se prepararon diluciones en solución Krebs de cada uno de los reactivos, teniendo en cuenta que el volumen final era de 5 mL que corresponde con el volumen que contiene el baño de órganos. De esta manera se obtiene la concentración molar final de cada uno de los reactivos que aparece indicado en los apartados previos.

## **4. MEDIDAS DE MARCADORES INFLAMATORIOS**

La sangre se recogió en tubos heparinizados. Los plasmas se separaron tras centrifugar los tubos a una velocidad de 3000 rpm durante 15 minutos y a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se hicieron alícuotas y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

#### **4.1. Concentración plasmática de Interlequina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), Interlequina 6 (IL-6), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y Proteína C Reactiva (PCR).**

La concentración plasmática de los parámetros inflamatorios IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  se midieron utilizando kits comerciales (R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA). Estos ensayos emplean una técnica cuantitativa de ensayo inmunoenzimático en microplacas de 96 pocillos. Se añadieron 50  $\mu$ L de plasma a los pocillos previamente cubiertos con anticuerpos específicos de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , respectivamente. Se incubaron las muestras durante un tiempo de 2 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación de los plasmas con los anticuerpos se lavaron los pocillos para eliminar cualquier unión inespecífica. A continuación, se añadió un conjugado formado por un anticuerpo policlonal que reconoce a la citoquina específica y que está acoplado a una enzima que cataliza una reacción colorimétrica. Posteriormente se añadió el sustrato de la reacción y se generó un color azul que cambió a amarillo cuando la reacción finalizó. La intensidad del color medido fue proporcional a la cantidad de citoquina unida al anticuerpo. La placa se analizó en un lector de Elisa a una longitud de onda de 450 nm y con un filtro diferencial de 570 nm. Las absorbancias obtenidas se extrapolaron en la curva estándar para calcular la concentración que se expresó en pg/mL.

La proteína C reactiva (PCR) se midió mediante un test inmunoturbidimétrico (Sigma Diagnostics Ref. 371, Sigma-Aldrich Química, St. Louis, USA). La muestra de plasma se mezcla con una solución tamponada y un anticuerpo anti-PCR de cabra. Se produce un agregado insoluble que genera un aumento de turbidez en la solución que es proporcional a la cantidad de proteína C reactiva de la muestra. Este ensayo se realizó en un autoanalizador Hitachi 912 (Roche Diagnostics) y los resultados se expresaron en mg/dL.

## 5. EXPRESIÓN GÉNICA

### 5.1. Extracción de ARN

Las aortas torácicas congeladas de rata se pulverizaron con un mortero de acero inoxidable y siempre en contacto con Nitrógeno líquido. Inmediatamente después, se pesaron 100 mg de tejido pulverizado y se homogenizaron con 1 mL de Tri-Reagent (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA) utilizando un homogenizador Potter de vidrio-teflón. Tras una centrifugación de 10 minutos a una velocidad de 12000 g a 4°C, se recogió el sobrenadante y se procedió a extraer el ARN según el método de fenol cloroformo propuesto por Chomczynski (Chomczynski, 1993). El protocolo es el siguiente:

1. Se añade 0.2 mL de Cloroformo a cada tubo que contiene el sobrenadante.
2. Se homogeneizan al Vórtex durante 15 segundos.
3. Se dejan a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. Se centrifugan los tubos a 12000 g durante 15 minutos a 4° C.

En este paso se crean dos fases:

Fase Acuosa	Sin Color	ARN
Interfase	Fenol-Cloroformo	ADN
Fase Orgánica	Roja	PROTEINAS

5. Se toma la fase acuosa y se añaden 0.5 mL de isopropanol para precipitar el ARN.
6. Se deja temperatura ambiente durante 10 minutos.
7. Se centrifugan los tubos a 12000 g durante 8 minutos a 4° C. Aparecerá un pellet blanco que es el ARN precipitado.
8. Se elimina el sobrenadante.
9. Se lava el ARN añadiendo al pellet 1mL de etanol 75% y se agita al vortex.
10. Se centrifugan los tubos a 7500 g durante 5 minutos a 4° C.
11. Se elimina el etanol del lavado.
12. Se deja secar el pellet de ARN al aire durante 5 minutos.

13. Se disuelve el pellet de ARN en H<sub>2</sub>O con DEPC al 0.1% pasándolo por la pipeta varias veces y se incuba 15 minutos a 55° C. Seguidamente se introduce en hielo rápidamente.
14. Se alícuota y se almacena a -80° C.

Posteriormente los ARN se cuantificaron midiendo la densidad óptica a 260 nm utilizando un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf, Germany). Este método se basa en la ley de Lambert Beer, por la cual a partir de una longitud de onda determinada, un coeficiente de extinción molar establecido, así como la distancia recorrida por el haz de luz al atravesar la cubeta de medición, se puede determinar la concentración de una sustancia disuelta en un líquido.

$$\text{Abs} = [\text{c}] \times \epsilon \times \text{l}$$

Siendo:

Abs, la absorbancia obtenida al medir a una longitud de onda de 260nm

$\epsilon$ , el coeficiente de extinción molar; para ARN es 40

l, la longitud recorrida por el haz de luz. En este caso 1 cm.

Seguidamente, 2  $\mu\text{g}$  de ARN de cada una de las muestras se separó o fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en una solución tamponada de TAE 1x y con un 0.5% (v/v) de bromuro de etidio para comprobar su integridad. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 50 voltios durante 1 hora y media. Una vez terminada la electroforesis, el gel se visualizó en un sistema de documentación de geles.

Este dispositivo es una combinación de un transiluminador que genera luz ultravioleta y una cámara digital acoplada a un soporte informático para digitalizar las imágenes. El bromuro de etidio es un compuesto que se intercala en las hebras de ácido nucleico, ya sea ADN, ADNcopia o ARN. Al incidir sobre él la luz ultravioleta, el bromuro de etidio emite fluorescencia. Por tanto, cuando se coloca el gel de agarosa sobre un transiluminador únicamente se van a visualizar aquellas moléculas de ácidos nucleicos que estén unidos a bromuro de etidio. Generalmente al chequear el ARN en geles de agarosa se van a visualizar dos bandas mayoritarias correspondientes a ARN ribosómico que son la fracción 28 S y la 18 S respectivamente (la S es la unidad de sedimentación llamada Svedverg y el coeficiente de sedimentación es característico de cada partícula, así cuanto mayor sea la partícula a sedimentar, mayor será su coeficiente

específico). Una vez comprobada la integridad del ARN extraído, se procedió a congelarlos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Si por el contrario existía degradación, se procedía a su eliminación.

## 5.2. Síntesis de la sonda de la NOSe

El ADN copia de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) se obtuvo por Retro Transcripción seguido de Reacción en Cadena de la Polimerasa, RT-PCR, a partir de 100 ng de ARN total. Los oligonucleótidos o cebadores (primers) se diseñaron, utilizando la información genómica del banco de genes y las herramientas de la búsqueda local de alineamiento básico para secuencias de nucleótidos, BLAST (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y se sintetizaron (TIB MOLBIOL, Alemania). Las secuencias de los oligos fueron 5'GGCATCACCAGGAAGAAGAC 3' (sentido) y 5'CGAACACACAGA ACCTGACC 3' (antisentido). El tamaño flanqueado por estos primers fue de 485 pares de bases (pb). Tras una electroforesis en gel de agarosa 1% en solución tamponada TBS 1x y con 0.5% de bromuro de etidio, la banda que apareció a esa altura se extrajo mediante un proceso de purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN). Tras la secuenciación y comprobación de que el inserto pertenecía al gen de la NOSe, éste se fusionó con un vector de clonaje pGEM-T easy vector (Promega CO. Madison, WI, USA). La razón por la cual se realiza esta fusión es para que al introducir el vector en bacterias, estas generaran una gran cantidad de replicas del vector, lo que comúnmente se denomina clonaje. Para la clonación se utilizaron células competentes una cepa de Escherichia Coli, la cepa DH5- $\alpha$ . La transformación de las mismas se consiguió con un choque térmico de  $42^{\circ}\text{C}$ . Tras el crecimiento y selección de las colonias transformadas en medio sólido con ampicilina y  $\beta$ -galactosidasa, el ADN plasmídico se extrajo y se secuenció. Una vez realizada esta comprobación, las bacterias transformadas se crecieron en medio líquido LB (Medio Luria-Bertiani; Triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L y extracto de levadura 5 g/L, pH 7.0) con ampicilina. El ADN plasmídico se extrajo y fue digerido con la enzima de restricción ECO RI (Amersham Pharmacia Biotech, Europe). Posteriormente se separó el inserto del plásmido por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en solución tamponada TBS 1x y al 0.5% (v/v) de bromuro de etidio. El ADN copia se extrajo del gel (QIAquick gel extraction, QIAGEN Ltd, UK) y cuantificó midiendo la

densidad óptica a 260 nm utilizando un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf, Germany).

### **5.3. Transferencia Northern**

Diez microgramos de ARN total de aorta se utilizaron para realizar una electroforesis en gel de agarosa con 1% de formaldehído. Después de tres horas a 50 V, se realizaron lavados repetidos de H<sub>2</sub>O-DEPC, NaOH 50mM y SSC 10x. Los ARNs fueron transferidos a una membrana de Nylon Hybond<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech, Europe). Tras la transferencia la membrana se expuso a la luz ultravioleta en un crosslinker (BioRad) para fijar covalentemente el ARN a la misma, y se incubó a 42°C con la solución de pre-hibridación Ultra-Hyb (Ambion Inc. Austin, USA). El ADN copia de 485 pb de la NOSe de rata fue marcada radiactivamente con P<sup>32</sup> dCTP (Nuclear Ibérica S.A. Spain) con un kit de marcaje de ADN aleatorio, Random Primed ADN labelling kit (Boehringer Ingelheim GmbH, Germany), y se purificó para eliminar la radiactividad inespecífica. La membrana se incubó junto con 2x10<sup>6</sup> cpm (cuentas por minuto) de la sonda marcada por mL de solución de hibridación, durante 24 horas. Seguidamente se hicieron lavados con soluciones tamponadas a base de SSC 2x, 0.1% SDS y SSC 0.1x, 0.1% SDS. Finalmente, la membrana se expuso a unas películas o clichés fotográficos (Kodak X-OMAT films) en presencia de pantallas intensificadoras y a una temperatura de -70°C. Las películas se revelaron y se escanearon y la cantidad de radiactividad en las bandas se cuantificó en un densitómetro PC IMAGE (Foster Findlay, UK).

El mismo procedimiento de marcaje y visualización de las bandas se utilizó para la detección del ARN de 28S. El ARN 28 S se clasifica como ARN ribosómico y forma parte, además de otras moléculas, de la estructura de la subunidad mayor de los ribosomas en organismos eucariotas. Este ARN se utiliza como control interno debido a que su expresión génica en las células se mantiene constante. Una vez cuantificadas las bandas, se calculó la relación del gen diana respecto al gen constitutivo y se calculó el porcentaje de cambio respecto a las ratas controles.

#### **5.4. Síntesis de ADNcopia**

La síntesis de ADNcopia (ADNc) se realizó a partir de cinco microgramos de ARN total. Se realizó una incubación previa a 70 °C durante 5 minutos con 2 µM de hexámeros al azar tras la cual se enfrió en hielo. Posteriormente se añadió una mezcla de reacción compuesta por 0.7 U de inhibidor de ARNasa, 25 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 27 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DTT, 0.4 mM de dNTP's (deoxinucleótidos) y 2.5 U la enzima retrotranscriptasa MMLV (virus de la leucemia murina de Moloney) durante una hora a 37°C utilizando el kit comercial RTeasy Reverse Transcription kit (Maxim Biotech. So. San Francisco, CA, U.S.A.). Seguidamente se calentó a 95°C durante 10 minutos y se enfrió en hielo. Luego la mezcla se completó con agua libre de ADNasa hasta un volumen final de 50 µl.

#### **5.5. PCR Multiplex**

Debido a los avances tecnológicos, las técnicas utilizadas en el laboratorio van cambiando conforme pasa el tiempo. De ahí, que la metodología utilizada para ver la expresión génica del resto de parámetros a estudiar sea distinta a la utilizada para la NOSe. El cambio de técnica del Northern a PCR proporcionó una mejor infraestructura, un menor riesgo y una mayor rapidez para realizar estudios de expresión génica. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método sencillo y de gran utilidad para amplificar únicamente ADN específico a partir de una cantidad pequeña del mismo. Consiste en tres pasos de incubación a temperaturas diferentes repitiéndolos de manera cíclica. El primer paso es el de desnaturalización (se cambia la conformación del ácido nucleico de doble hebra a dos hebras sencillas) por el que el ADNc se desnaturaliza por calor. En el segundo paso, denominado anillamiento o annealing, los dos oligos o primers aparean a baja temperatura por complementariedad de bases nitrogenadas con el ADNc desnaturalizado. El tercer paso, es la extensión a partir de los oligos apareados a la hebra complementaria por una ADN polimerasa. Debido a que el gen específico duplica el número de copias en cada ciclo, la PCR por tanto puede amplificar más de 10<sup>6</sup> copias de fragmentos de ADN en un periodo corto de tiempo.

### 5.5.1. Expresión génica de citoquinas vasculares IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B e I $\kappa$ B.

Una vez obtenido el ADNc se realizó la reacción Multiplex PCR (MPCR) utilizando cebadores específicos para los genes a estudiar (Maxim Biotech. So. San Francisco, CA, U.S.A.), y la enzima Taq Polimerasa. Cinco microlitros de ADNc se añadieron a una mezcla de reacción específica del kit comercial (MPCR kit for rat inflammatory genes set-2, Maxim Biotech. So. San Francisco, CA, U.S.A.), 2.5 U de la enzima Taq ADN Polimerasa y oligos o primers específicos para la reacción de PCR Multiplex. En este caso se añadió una mezcla de primers para estudiar la expresión de genes de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y del precursor de la subunidad p50 del NF $\kappa$ B, p105, I $\kappa$ B y GAPDH. Se diseñó el siguiente programa de tiempo-temperatura utilizado para el desarrollo de la PCR:

2 ciclos	Desnaturalización	1 minuto	96 ° C
	Anillamiento y Amplificación	2 minutos	58-60° C
X ciclos*	Desnaturalización	1 minuto	94 ° C
	Anillamiento y Amplificación	2 minutos	58-60° C
1 ciclo	Extensión final	10 minutos	70° C

\* Se hicieron 27 ciclos para la amplificación de los genes de IL-1 $\beta$ , p105, I $\kappa$ B y GAPDH y 32 ciclos para los genes de IL-6 y TNF- $\alpha$ .

Como control interno se utilizó la expresión del gen constitutivo de gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los productos resultantes se analizaron mediante separación por electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) en solución tamponada TBS 1x y al 0.5% (v/v) de bromuro de etidio. Seguidamente se visualizaron en un sistema de documentación de geles (SYNGENE, Cambridge, UK) y se cuantificó la intensidad de las bandas resultantes con un software de análisis de geles Gene Tools (SYNGENE, Cambridge, UK). El tamaño de los amplicones o de los insertos amplificados de los genes fueron 532 pb para GAPDH, 453 pb para IL-6, 396 pb para el p105 (precursor de la subunidad p50 del NF $\kappa$ B), 351 pb para TNF- $\alpha$ , 294 pb para IL-1 $\beta$  y 167 pb para I $\kappa$ B, respectivamente. El dato numérico de la intensidad de la banda del gen del estudio se normalizó con el dato numérico de la intensidad de la

banda del gen constitutivo GAPDH. Se agruparon por grupos y se obtuvieron las medias y los errores estándar.

### 5.5.2. Expresión génica de p22phox

Se estudió la expresión del gen de la subunidad p22phox de la enzima NADPH Oxidasa por la metodología de la MPCR semicuantitativa. Para ello se hizo una PCR Multiplex (MPCR; Maxim Biotech, San Francisco, CA) con 5 µl de ADNc previamente sintetizado, una mezcla de reacción tamponada, la enzima Taq ADN Polimerasa y los primers específicos para p22phox y GAPDH respectivamente. El programa de tiempo-temperatura utilizado para llevar a cabo la MPCR fue el siguiente:

2 ciclos	Desnaturalización	1 minuto	96 ° C
	Anillamiento y Amplificación	2 minutos	58-60° C
28 ciclos	Desnaturalización	1 minuto	94 ° C
	Anillamiento y Amplificación	2 minutos	58-60° C
1 ciclo	Extensión final	10 minutos	70° C

Las secuencias de los primers fueron las siguientes :

p22phox	5'-GTCATCTGTCTGCTGGAGTA-3' (sentido)
	5'-ACGACCTCATCTGTCACTGGA-3' (antisentido)
GAPDH	5'-TATGATGACATCAAGAAGGTGG-3' (sentido)
	5'-CACCACCTGTTGCTGTA-3'(antisentido)

Estos oligos se diseñaron utilizando el banco de genes de rata y la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool) proporcionada por la página web del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Posteriormente se sintetizaron por TIB MOLBIOL.

El producto de la MPCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en solución tamponada TBS 1x y al 0.5% (v/v) de bromuro de etidio. Seguidamente se visualizó en un sistema de documentación de geles (SYNGENE,

Cambridge, UK) y se cuantificó la intensidad de las bandas resultantes con un software de análisis de geles Gene Tools (SYNGENE, Cambridge, UK). El tamaño del inserto amplificado de los genes fue 433 pares de bases para p22phox y 212 pares de bases para GAPDH, respectivamente. El dato numérico de la intensidad de la banda de p22phox se relacionó con el dato numérico de la intensidad de la banda del gen constitutivo GAPDH. Se agruparon por grupos y se obtuvieron las medias y los errores estándar de las medias.

### 5.5.3. Expresión génica de CTGF

La expresión del gen CTGF se evaluó por MPCR semicuantitativa. Para ello se hizo una PCR Multiplex (MPCR; Maxim Biotech, San Francisco, CA) con 5 µl de ADNc previamente sintetizado, una mezcla de reacción tamponada, la enzima Taq ADN Polimerasa y los primers específicos para p22phox y GAPDH respectivamente. El programa de tiempo-temperatura utilizado para realizar la MPCR fue el siguiente:

2 ciclos	Desnaturalización	1 minuto	96 ° C
	Anillamiento y Amplificación	2 minutos	58-60° C
22 ciclos	Desnaturalización	1 minuto	94 ° C
	Anillamiento y Amplificación	2 minutos	58-60° C
1 ciclo	Extensión final	10 minutos	70° C

Las secuencias de los primers fueron las siguientes :

CTGF	5'-GAGTGGGTGTGTGACGAGCCCAAGG-3' (sentido)
	5'-ATGTCTCCGTACATCTTCCTGTAGT-3' (antisentido)
GAPDH	5'-TATGATGACATCAAGAAGGTGG-3' (sentido)
	5'-CACACCTGTTGCTGTA-3'(antisentido)

Los oligos se diseñaron utilizando las aplicaciones de internet como el banco de genes de rata y la búsqueda de alineamiento básico local (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool) proporcionada por la página web del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Posteriormente se sintetizaron por TIB MOLBIOL.

El producto final de la MPCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en solución tamponada TBS 1x y al 0.5% (v/v) de bromuro de etidio. Seguidamente se visualizó en un sistema de documentación de geles (SYNGENE, Cambridge, UK) y se cuantificó la intensidad de las bandas resultantes con un software de análisis de geles Gene Tools (SYNGENE, Cambridge, UK). El tamaño de los amplicones fue 378 bp para CTGF y 212 pb para GAPDH respectivamente. El dato numérico de la intensidad de la banda de p22phox se relacionó con el dato numérico de la intensidad de la banda del gen constitutivo GAPDH. Se agruparon por grupos y se obtuvieron las medias y los errores estándar de las medias.

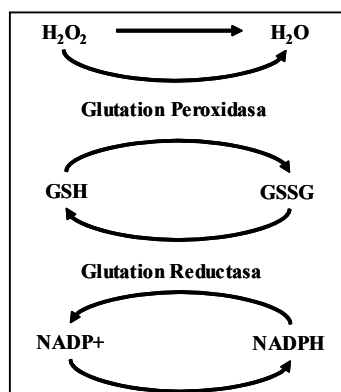
## **6. ESTADO REDOX**

### **6.1. Parámetros oxidativos hepáticos**

El hígado de las ratas se aisló y se cortó en porciones de 1 gramo aproximadamente. Inmediatamente después se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}$  C hasta su procesamiento. Las muestras hepáticas para la determinación de glutation reductasa (GRed) y la relación entre el glutation reducido y el oxidado (GSH/GSSG) se homogenizaron en una solución tamponada de  $K_3PO_4$  (50 mM, pH 7.5) que contenía EDTA a una concentración 1mM y BSA a una concentración de 1mg/mL utilizando un homogenizador Potter de vidrio-teflón (1g hígado/2mL solución). Alternativamente las muestras hepáticas para la determinación de glutation peroxidasa (GPx) y malonildialdehido (MDA), se homogenizaron en una solución tamponada de TRIS HCl (50 mM, pH 7.2), EDTA a una concentración 5mM y 2-mercaptoetanol a una concentración de 1mM (1g hígado/6mL solución) utilizando un homogenizador Potter de vidrio-teflón. Tras las homogenizaciones, todas las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 3000 rpm y  $4^{\circ}$  C, se retiró el sobrenadante en el que se evaluaron los parámetros oxidativos, y se determinaron las proteínas para expresar los resultados en función de su concentración. Dichas proteínas se determinaron mediante el método de Biuret adaptado a un autoanalizador Hitachi 912 (Roche Diagnostics).

### 6.1.1. Medida de glutatión peroxidasa

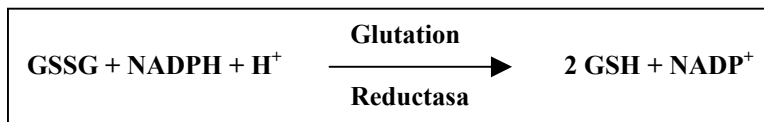
La actividad de la enzima glutatión peroxidasa se valoró por ensayos espectrofotométricos (Unicam 8700 Series espectrofotómetro UV/visible, Unicam Ltd., UK) y mediante la utilización de kits comerciales (Bioxytech GPx-340, Oxis Research, Portland, OR, USA). El ensayo de glutatión peroxidasa se basa en la medida indirecta de la actividad celular de la GPx. El GSSG que se produce cuando la GPx reduce un peróxido orgánico, se recicla a su estado reducido por la acción de la GRed. Paralelamente en esta reacción, el NADPH se oxida a  $\text{NADP}^+$  lo que genera una disminución de la absorbancia que es directamente proporcional a la actividad de la GPx, cuando se mide la reacción en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. Los resultados se expresaron en unidades de GPx por gramo de proteína del extracto de hígado.



### 6.1.2. Medida de glutatión reductasa

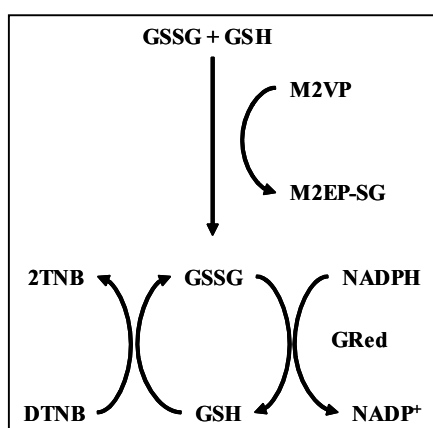
La actividad de la enzima glutatión reductasa se valoró por ensayos espectrofotométricos (Unicam 8700 Series espectrofotómetro UV/visible, Unicam Ltd., UK) y mediante kits comerciales (Bioxytech GR-340, Oxis Research, Portland, OR, USA). El ensayo de la glutatión reductasa se basa en la oxidación de NADPH a  $\text{NADP}^+$  catalizada por la GRed. Una unidad de GRed se define como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de un micromol de GSSG por minuto a pH 7.6 y 25° C. Por cada molécula de GSSG que se reduce, se consume otra de NADPH. Por consiguiente, la reducción de GSSG se determina indirectamente midiendo el consumo de NADPH, como se demuestra por el descenso en la absorbancia a 340 nm en función del tiempo.

Los resultados se expresaron en unidades de GRed por gramo de proteína del extracto de hígado.



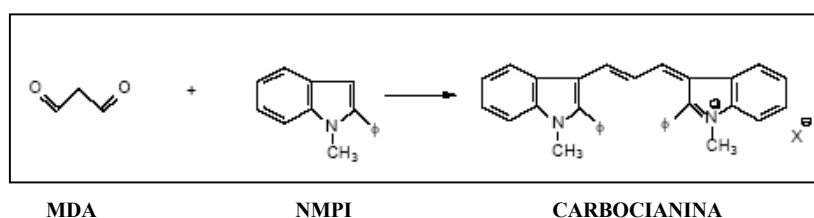
### 6.1.3. Cociente de GSH/GSSH

La relación entre glutatión reducido y glutatión oxidado se determinó por ensayos espectrofotométricos (Unicam 8700 Series espectrofotómetro UV/visible, Unicam Ltd., UK) y mediante el uso de kits comerciales (Bioxytech GSH/GSSG-412, Oxis Research, Portland, OR, USA). En el ensayo de GSH/GSSG se utiliza un reactivo, el 1-metil-2-vinilpiridina trifluorometanosulfonato (M2VP), que secuestra los grupos tioles o sulfhidrilos y forma la sal de 1-metil-2(2-tioetil)-piridina (M2EP-SG). De esta manera se puede inactivar el GSH y así no interferir con el ensayo de GRed. El GSSG se puede determinar por la reducción de GSSG a GSH que es entonces determinado por la reacción entre el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), que va a reaccionar con el GSH para formar un producto que se detecta por espectrofotometría a 412 nm.



### 6.1.4. Medida de malonildialdehido

Los niveles hepáticos de malonildialdehido se valoraron utilizando ensayos comerciales espectrofotométricos (MDA-586, Bioxytech, Oxis Research) y se analizaron en espectrofotómetro (Unicam 8700 Series espectrofotómetro UV/visible, Unicam Ltd., UK). El ensayo de MDA se basa en la reacción producida entre el reactivo cromogénico N-metil-2-fenilindol (NMPI) y el malonildialdehido a una temperatura de 45° C. Una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de NMPI generando un compuesto cromóforo estable (carbocianina) que absorbe a 580 nm.



Los datos de absorbancia de las muestras se extrapolan en una curva estándar de MDA para obtener las concentraciones que se expresan en  $\mu\text{moles}$  por gramo de proteína del extracto de hígado.

## 6.2. PARÁMETROS OXIDATIVOS PLASMÁTICOS

### 6.2.1. 8-Isoprostanos

En este caso se utilizaron plasmas con citrato como anticoagulante para la medida de 8-isoprostanos y se almacenaron en alícuotas que contenían al antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) en un 0.005% para evitar nuevas peroxidaciones. Los niveles plasmáticos de 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  se valoraron en inmunoensayos (8-Isoprostane EIA kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor,MI) tras purificar las muestras utilizando columnas de absorción de afinidad a 8-isoprostanos (Cayman Chemical Company, Ann Arbor,MI). El ensayo se basa en la reacción competitiva entre el 8-isoprostano y el conjugado acetilcolinesterasa unido a 8-isoprostano (trazador), para un número limitado de sitios de unión anti suero de conejo específico para 8-isoprostanos. Ya que la concentración del trazador se mantiene constante mientras que

la de los 8-isoprostanos varía, la cantidad de trazador que es capaz de unirse al anti suero de conejo será inversamente proporcional a la concentración de los 8-isoprostanos que queden en el pocillo de la microplaca. El complejo anti suero de conejo junto con 8-isoprostanos (ya sea en forma libre o trazador), se une a un anticuerpo monoclonal previamente unido a la base del pocillo. La microplaca se lava para eliminar los reactivos sin unir y se añade en el pocillo un reactivo llamado reactivo de Ellman que contiene el sustrato para la colinesterasa. El producto de esta reacción enzimática tiene un color amarillo y absorbe a 420 nm (UVM 340 Lector de Microplacas, ASYS Hitech GMBH, Austria). La intensidad del color, determinada por espectrofotometría, es proporcional a la cantidad de trazador unido al pocillo, el cual es inversamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano libre presente en el pocillo durante la incubación. Se expresa en unidades de pg/ml.

## **7. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO**

Los anillos aórticos se fijaron en formaldehído (35%) para interrumpir los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular, tratando de conservar la arquitectura y estructura de los tejidos y células lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo vivo. Después se realizó la deshidratación del tejido en un gradiente creciente en etanol (70, 90 y 100%) y a continuación la inclusión en parafina de los anillos aórticos fijados, que proporcionaba a la pieza anatómica homogeneidad y dureza suficiente para obtener secciones finas de calidad. Los anillos aórticos incluidos en parafina se cortaron posteriormente con un microtomo de rotación (Leitz Model 1512, IMEB INC, Chicago, EEUU) en secciones tisulares de 3-4  $\mu\text{m}$ .

Se realizaron las tinciones de hematoxilina-eosina (H-E) para teñir citoplasmas y núcleos y de tricrómico de Masson para visualizar fibras de colágeno, en dichas secciones y posteriormente se hizo un análisis morfométrico de la pared de la aorta valorándose el área del lumen, el área de la media y el área del vaso.

### **7.1. Tinción con hematoxilina-eosina**

El método de la H-E es la técnica más frecuentemente usada en histología animal y en la rutina anatomopatológica. El colorante básico, la hematoxilina, tiñe las

estructuras ácidas de azul purpúreo. Núcleos, ribosomas y retículo endoplásmico rugoso tienen una gran afinidad por este colorante debido a su alto contenido en ADN y ARN, respectivamente. Por el contrario, la eosina es un colorante ácido que tiñe estructuras básicas y por ello el citoplasma generalmente se tiñe de rosa o de rojo rosado. Para realizar estas tinciones se utilizó el siguiente protocolo:

1. Se desparafina y se hidrata la muestra para captar los colorantes
2. Se tiñe con hematoxilina durante 2 minutos
3. Se lava con agua
4. Se quita el exceso de colorante con alcohol ácido al 1% durante un tiempo de 5 a 30 segundos y controlando al microscopio, para diferenciar las distintas intensidades de los tejidos dependiendo de las propiedades histológicas de la muestra de tejido
5. Se lava en agua durante 5 minutos
6. Se tiñe con eosina durante un tiempo de 20 a 60 segundos
7. Se lava en agua hasta obtener la intensidad deseada de coloración
8. Se deshidrata, aclara y monta utilizando Pertex como resina orgánica sobre la que se colocó el cubre. En general, cuando la técnica de tinción de H-E se aplica a células animales, los núcleos se tiñen de azul y el citoplasma se tiñe de rosa o rojo (García et al., 1993)

## **7.2. Tinción con tricrómico de Masson**

La técnica de tricrómico de Masson se denomina también de tejido conectivo porque se utiliza para visualizar elementos del tejido de soporte, principalmente colágeno. Esta técnica produce tres colores: núcleos y otras estructuras basófilas se tiñen de azul, el colágeno se tiñe de verde y el citoplasma, el músculo, los eritrocitos y la queratina se tiñen de rojo brillante. La metodología se resume en el siguiente protocolo:

1. Se desparafina y se hidrata la muestra para captar los colorantes
2. Se tiñe con hematoxilina durante 5 minutos
3. Se lava con agua
4. Se quita el exceso de colorante con etanol al 95% y con alcohol pícrico hasta que los núcleos se tiñan de negro

5. Se lava en agua hasta que el color amarillo del alcohol pícrico se quite
6. Se tiñe con fucsina ácida de Ponceau durante 5 minutos
7. Se aclara en agua destilada
8. Se trata la muestra con ácido fosfomolibdico durante 5 minutos y sin aclarar se tiñe con acético verde luz durante 5 minutos
9. Se aclara en agua destilada y se vuelve a tratar la muestra con ácido fosfomolibdico durante 5 min
10. Se aclara en ácido acético durante 2 minutos
11. Se deshidrata, aclara y monta utilizando Pertex como resina orgánica sobre la que se colocó el cubre (Gurr, 1973)

El análisis morfométrico del área de la íntima, de la media y del vaso se midió con un analizador de imagen MICROM (las Heras et al., 1999) (Hardware IMCO 10, Kontron Bildanalyse, Software Microm IP, Microm, Walldorf, Alemania). Las imágenes de las secciones se registraron en una cinta de vídeo con una videocámara y se digitalizaron posteriormente para poder ser tratadas con el ordenador, trazándose los segmentos coloreados para la determinación de las áreas. Para determinar el área de la luz se corrigió el área de la sección transversal delimitada por la lámina elástica interna, donde  $l$  es la longitud de la lámina. El área del vaso se determinó mediante el área de la sección determinada por la lámina elástica externa aproximándola a un círculo aplicando el mismo factor de corrección ( $l^2/4\pi$ ) a la medida de la lámina elástica externa. Este método evita los errores en los cálculos de las áreas que se producen por el colapso de los segmentos aórticos en el momento de preparación de las muestras (Ross, 1993).

### 7.3. Inmunohistoquímica De CTGF

La presencia de CTGF se determinó por inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-CTGF sintetizado en conejo que reacciona frente a rata (Torrey Pines Biolabs, San Diego, CA). Para ello, se hicieron cortes de las aortas embebidas en los bloques de parafina (4  $\mu$ m) y se montaron en portaobjetos cubiertos con poli-L-Lisina. Estos portaobjetos se desparafinaron en xilol y en un gradiente decreciente de etanol. Después se rehidrataron y se bloqueó la peroxidasa endógena incubando los portas en una solución al 3% de metanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1) a 25°C durante 30 minutos. Posteriormente se

incubaron en solución tamponada PBS con albúmina sérica bobina (BSA) al 4% (p/v) y suero de caballo al 6% (v/v) respectivamente, durante 1 hora a 37°C para reducir la tinción de fondo no específica. Luego se incubaron toda la noche y a 4°C con el anticuerpo anti-CTGF en solución tamponada de PBS que contenía 4% BSA y 1% de suero de caballo. Después de la incubación, se lavaron los portaobjetos con PBS y las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:100 en una solución tamponada de PBS que contenía 4% BSA durante una hora. Seguidamente, se lavaron los cortes y se tiñeron con 3,3'-diaminobenzidina (Dako Diagnostcs, Barcelona, Spain) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% durante 10 minutos. Las secciones se tiñeron con hematoxilina de Mayer para obtener una tinción de contraste y se montaron en resina Pertex (Histolab, Product AB). En cada experimento, se hicieron controles negativos sin anticuerpo primario para chequear la tinción inespecífica. El estudio de inmunohistoquímica se realizó con un sistema de análisis de 3,0 KZ 300 image analyzer (Zeiss, Munchen-Hallbergmoos, Germany) como se describió previamente (Ruperez et al., 2003b).

#### **7.4. Reactivos utilizados en el análisis morfométrico**

- Ácido acético verde luz (Microm)
- Ácido acético (Panreac)
- Ácido fosfomolibdico (Panreac)
- Alcohol pícrico (Panreac)
- Agua destilada (Millipore ® Sistema de Purificación de Agua)
- Amoníaco (Panreac)
- Carbonato de litio (Panreac)
- Eosina (Microm)
- Etanol absoluto (Merck)
- Etanol ácido (1%) (Merck)
- Fucsina ácida de Ponceau (Microm)
- Hematoxilina (Microm)
- Parafina (Microm)
- Pertex (Histolab, Product AB)
- Xileno (Merck)

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (eem). Las comparaciones estadísticas de los distintos parámetros estudiados entre grupos se realizaron mediante un análisis de la varianza de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de medias (test de Newman-Keuls) cuando se encontraron diferencias. La hipótesis nula fue rechazada cuando el valor de p era menor que 0.05. La elaboración de todas estas pruebas estadísticas se realizó con el apoyo informático del paquete estadístico SPSS (SPSS Inc. Chicago, Illinois).

# RESULTADOS



## 1. EFECTO DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

Como era de esperar, las ratas espontáneamente hipertensas presentaban unos valores de presión arterial (Tabla 1) significativamente mayores que los de las ratas Wistar Kyoto.

El tratamiento crónico con candesartán administrado en el agua de bebida durante 10 semanas, produjo una reducción ( $p < 0.05$ ) en los valores de la PAS en las SHR (Tabla 1). Esto confirma el papel importante de la angiotensina II sobre desarrollo de la hipertensión.

	WKY	SHR	SHR + C
PAS (mm de Hg)	130,4 ± 0,7	208,1 ± 4,9 *	168,3 ± 2,9 *#

Tabla 1. Efecto del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> sobre los valores de presión arterial sistólica (PAS) en las ratas hipertensas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR.

## 2. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub>

### 2.1. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR

#### 2.1.1. Respuesta vasoconstrictora

##### *Respuesta vasoconstrictora a KCl*

El aumento de la tensión isométrica inducido por la despolarización de la membrana de las células del músculo liso vascular con KCl fue menor ( $p < 0.05$ ) en los anillos aórticos de las ratas hipertensas respecto los de las ratas normotensas (Figura 1).

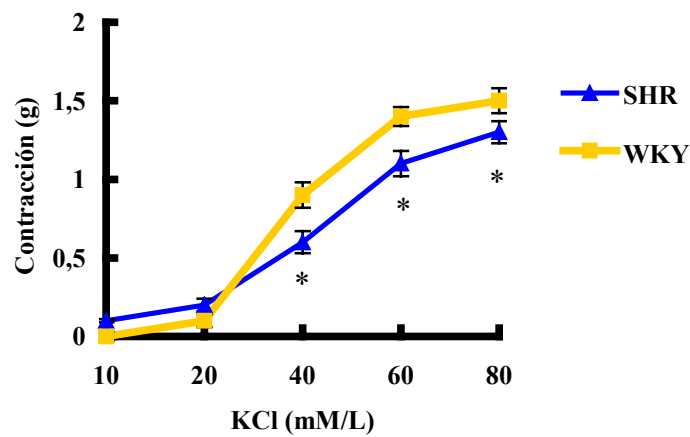


Figura 1. Contracción inducida por KCl en anillos aórticos de ratas WKY y SHR.

\*  $p < 0.05$  vs. WKY

### *Respuesta vasoconstrictora a Fenilefrina*

La contracción en anillos de las ratas SHR al agonista  $\alpha_1$  adrenérgico, fenilefrina, fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que la de las ratas WKY (Figura 2).

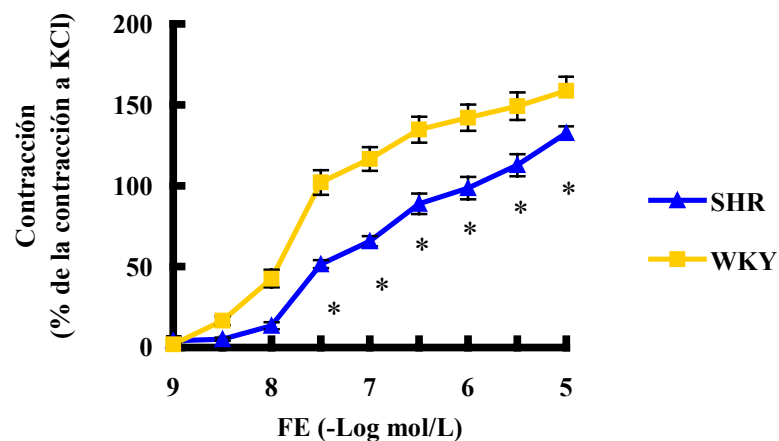


Figura 2. Vasoconstricción inducida por fenilefrina en anillos aórticos de ratas WKY y SHR.

\*  $p < 0.05$  vs. WKY

### *Respuesta vasoconstrictora a Angiotensina I y II*

Las ratas hipertensas presentaron una contracción a Angiotensina I ( $10^{-6}$  M) significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que sus controles normotensos (Figura 3).

Igualmente, la contracción inducida por AII ( $10^{-6}$  M) en las SHR aumentó de manera significativa cuando se comparó con las WKY (Figura 3).

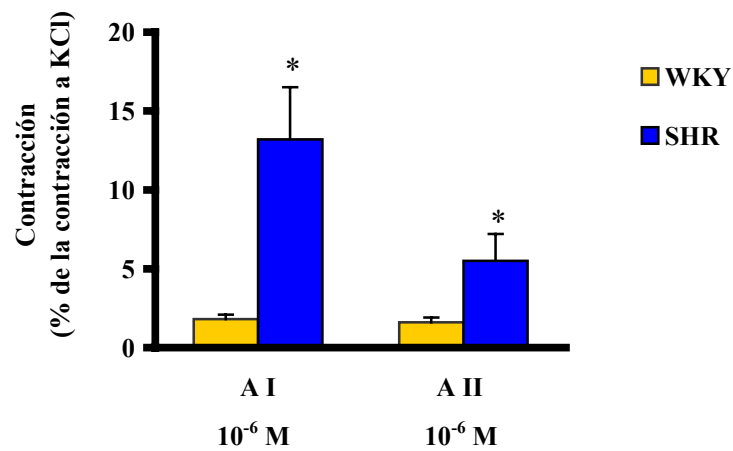


Figura 3. Contracción inducida por Angiotensina I y Angiotensina II en anillos aórticos de ratas WKY y SHR. \*  $p < 0.05$  vs. WKY

#### *Respuesta vasoconstrictora a Ach en presencia de L-NAME*

La contracción inducida por Ach en presencia del inhibidor de la óxido nítrico sintasa endotelial (Ach + L-NAME) fue mayor ( $p < 0.05$ ) en los anillos aórticos de las ratas hipertensas que en las ratas normotensas (Figura 4).

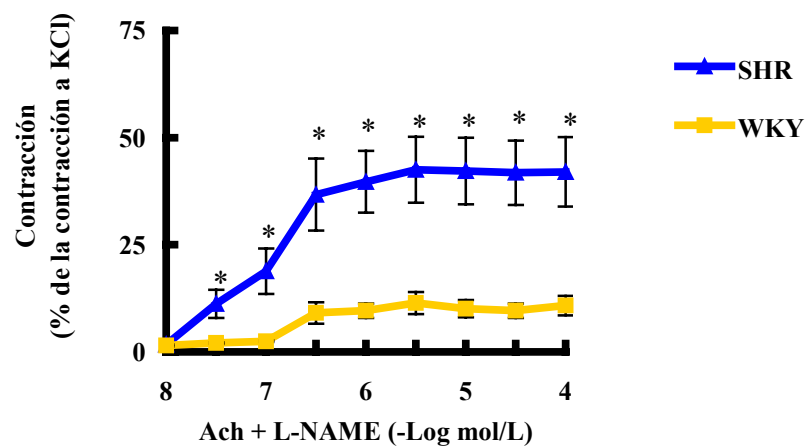


Figura 4. Contracción inducida por la Acetilcolina en presencia L-NAME ( $10^{-4}$  M) en anillos aórticos de ratas WKY y SHR. \*  $p < 0.05$  vs. WKY

### 2.1.2. Respuesta vasodilatadora

#### *Respuesta vasodilatadora a Ach*

La relajación a Ach en los anillos aórticos de las ratas hipertensas fue menor ( $p < 0.05$ ) que en las ratas control (Figura 5). Como se observa en la figura, la curva de relajación en las ratas SHR está desplazada hacia la derecha lo que indica una sensibilidad menor de estos anillos a la acción vasodilatadora de la acetilcolina.

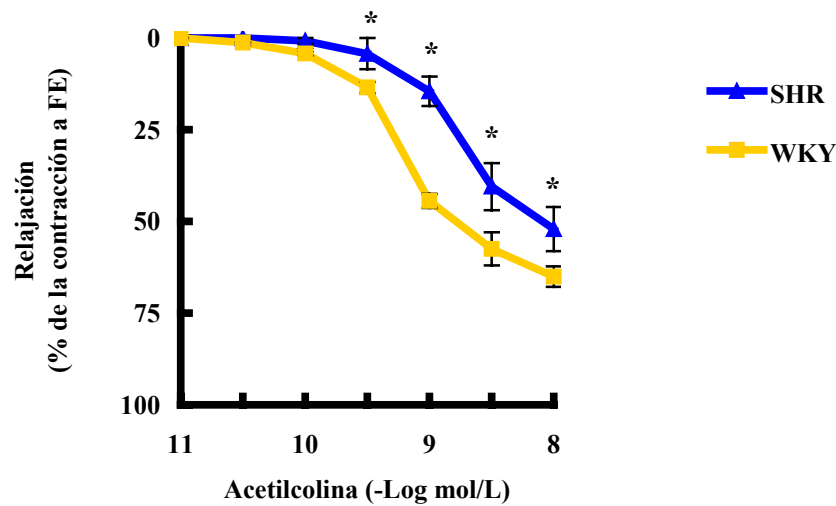


Figura 5. Relajación inducida por acetilcolina en anillos aórticos de las ratas WKY y SHR.

\*  $p < 0.05$  vs. WKY.

#### *Respuesta vasodilatadora a NPS*

La respuesta vasodilatadora a NPS en anillos aórticos fue similar en las ratas normotensas que en las ratas hipertensas (Figura 6).

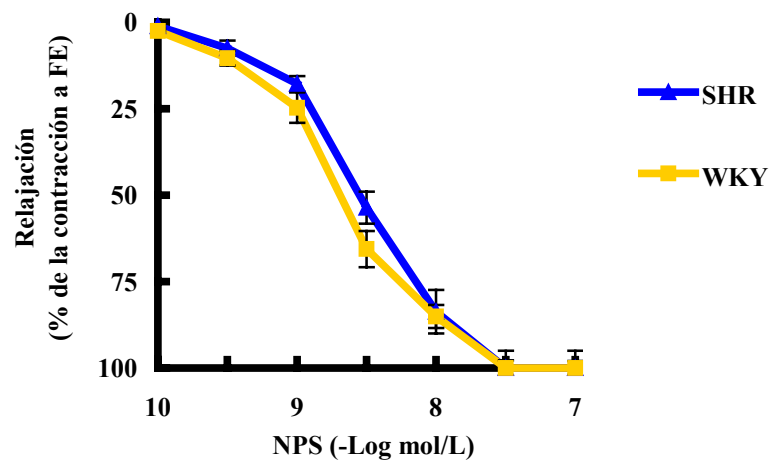


Figura 6. Relajación inducida por nitroprusiato sódico en anillos aórticos de las ratas WKY y SHR.

### *Respuesta vasodilatadora dependiente de los receptores $\beta$ -adrenérgicos*

La relajación inducida por el agonista de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, isoprenalina, en anillos aórticos fue significativamente menor en las ratas hipertensas respecto a las ratas normotensas (Figura 7).

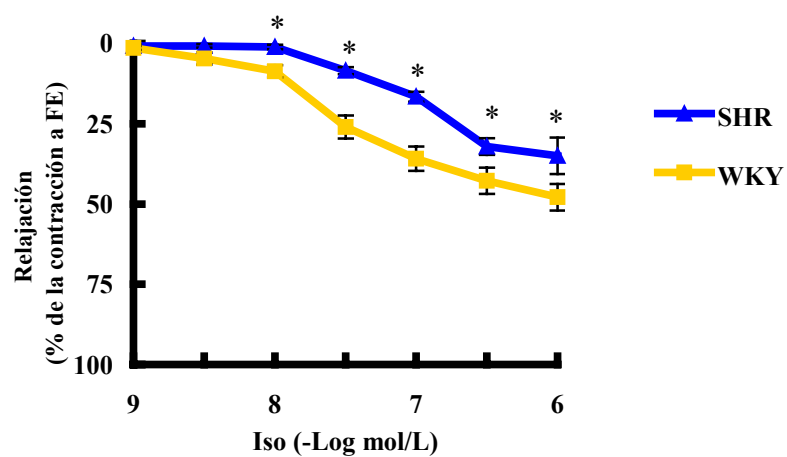


Figura 7. Relajación inducida por el agonista de los receptores  $\beta$ , Isoprenalina, en anillos aórticos de ratas WKY y SHR. \*  $p < 0.05$  vs. WKY

### 2.1.3. Expresión génica de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial en aorta

Los niveles de ARN mensajero de la NOSe aórtica no se modificaron por los niveles elevados de presión arterial cuando fueron comparados con los niveles de las ratas normotensas (Figura 8).

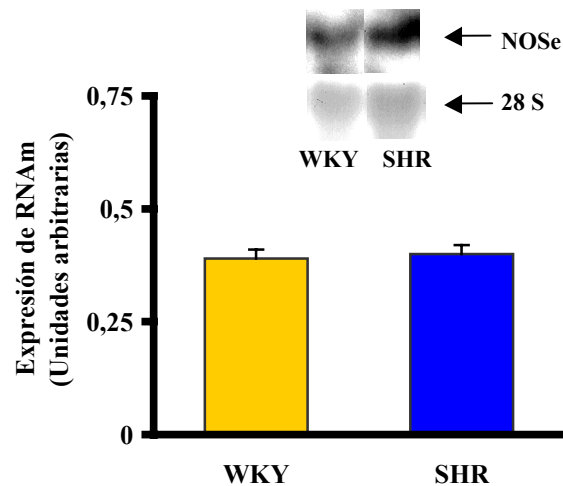


Figura 8. Expresión relativa del ARNm de NOSe en aortas de ratas WKY y SHR. \*  $p < 0.05$  vs. WKY.

## 2.2. CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR

### 2.2.1. Respuesta vasoconstrictora

#### *Respuesta vasoconstrictora a KCl*

El tratamiento con el antagonista de los receptores tipo 1 de Angiotensina II, candesartán, normalizó ( $p < 0.05$ ) la contracción a KCl en los anillos aórticos de las ratas SHR (Figura 9).

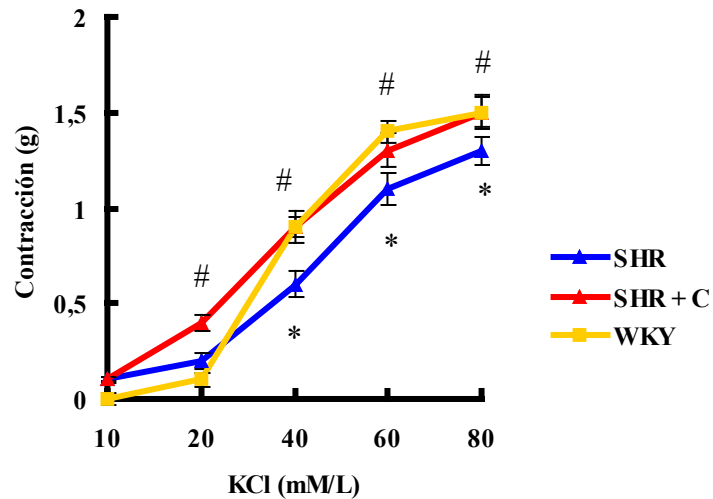


Figura 9. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la contracción inducida por KCl en anillos aórticos de ratas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR.

### *Respuesta vasoconstrictora a Fenilefrina*

Las ratas SHR tratadas con candesartán aumentó ( $p < 0.05$ ) la contracción a FE alcanzando a dosis máximas los valores observados en las ratas normotensas (Figura 10).

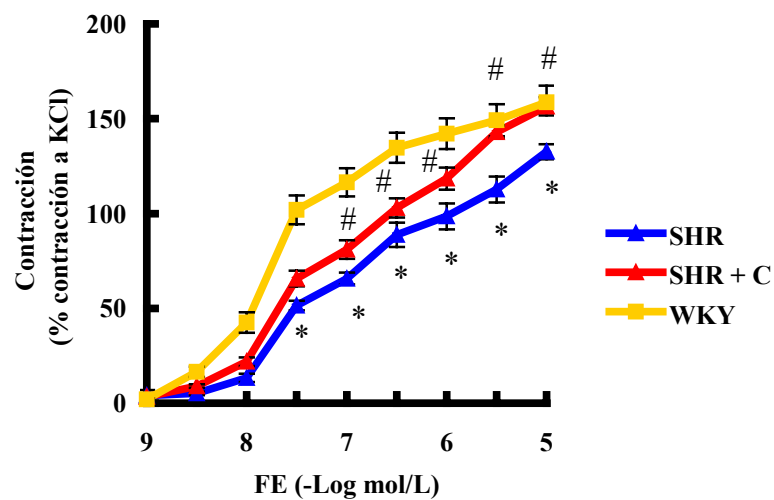


Figura 10. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la contracción inducida por fenilefrina en anillos aórticos de ratas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

### ***Respuesta vasoconstrictora a Angiotensina I y II***

Las ratas hipertensas tratadas con candesartán presentaron una contracción a Angiotensina I ( $10^{-5}$  M) significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que las hipertensas sin tratar (Figura 11). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre la vasoconstricción inducida por AII en las SHR y las SHR tratadas con el antagonista de los receptores tipo 1 de AII (Figura 11). En cualquier caso, dado que la respuesta vasoconstrictora de la AII fue similar a la generada por AI, indicaría la efectividad del tratamiento.

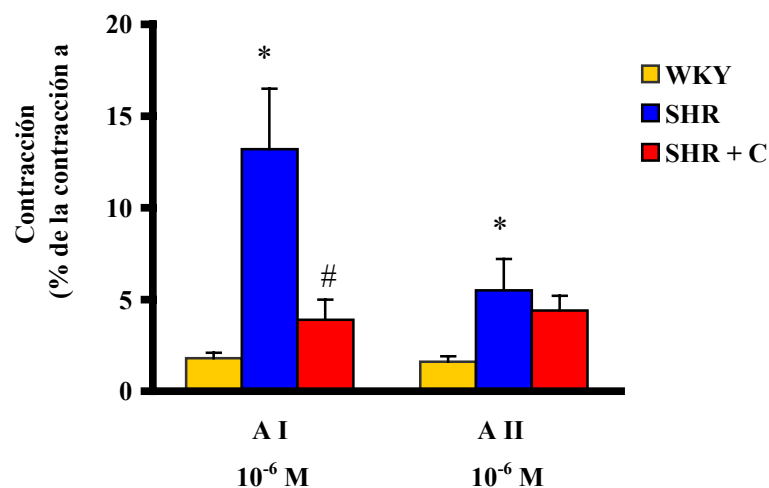


Figura 11. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la contracción inducida por Angiotensina I y Angiotensina II en anillos aórticos de ratas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

### ***Respuesta vasoconstrictora a Ach en presencia de L-NAME***

En las ratas hipertensas, el tratamiento con Candesartán, redujo ( $p < 0.05$ ) la contracción a Ach + L-NAME (Figura 12).

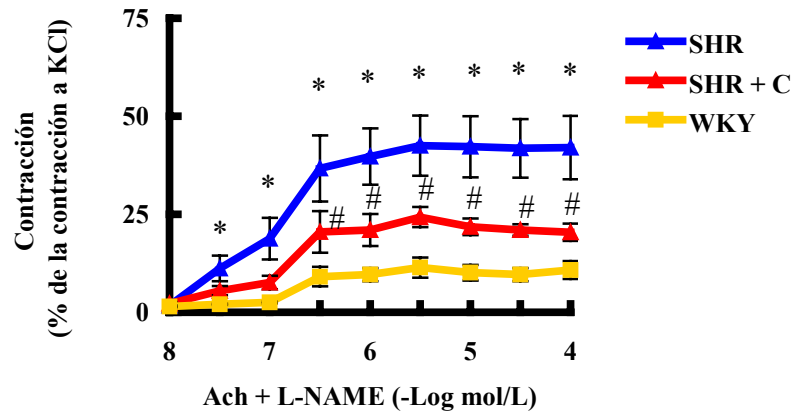


Figura 12. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la contracción inducida por la acetilcolina en presencia del inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial en anillos aórticos de ratas.

\*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

## 2.2.2. Respuesta vasodilatadora

### *Respuesta vasodilatadora a Acetilcolina*

El tratamiento crónico con candesartán en las ratas SHR aumentó significativamente la respuesta a acetilcolina con respecto a las ratas hipertensas no tratadas (Figura 13).

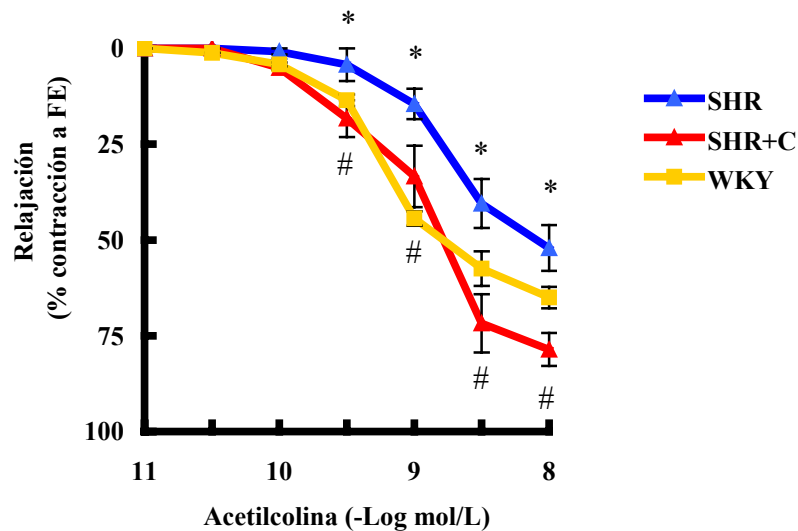


Figura 13. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la relajación inducida por Ach en anillos aórticos ratas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

### *Respuesta vasodilatadora a NPS*

El bloqueo crónico de los receptores tipo 1 de AII en las ratas hipertensas aumentó ( $p < 0.05$ ) la vasodilatación inducida por un dador de NO respecto de las SHR sin tratamiento (Figura 14).

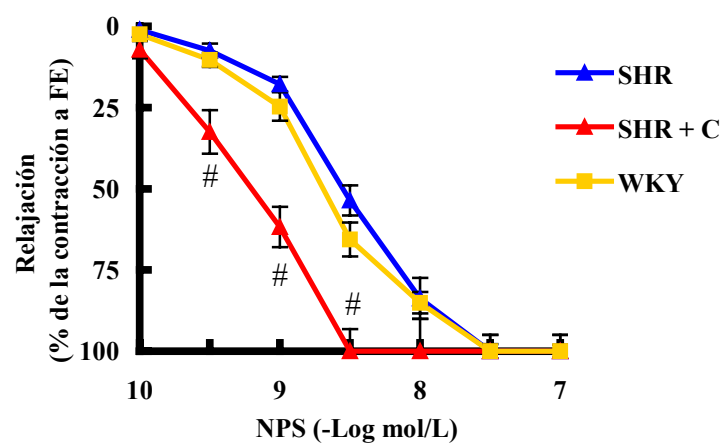


Figura 14. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la respuesta a nitroprusiato sódico en anillos de aorta de ratas. #  $p < 0.05$  vs. SHR

### *Respuesta vasodilatadora dependiente de los receptores $\beta$ -adrenérgicos*

El tratamiento con Candesartán aumentó significativamente la respuesta vasodilatadora mediada por los receptores adrenérgicos de tipo  $\beta_2$  en las SHR (Figura 15).

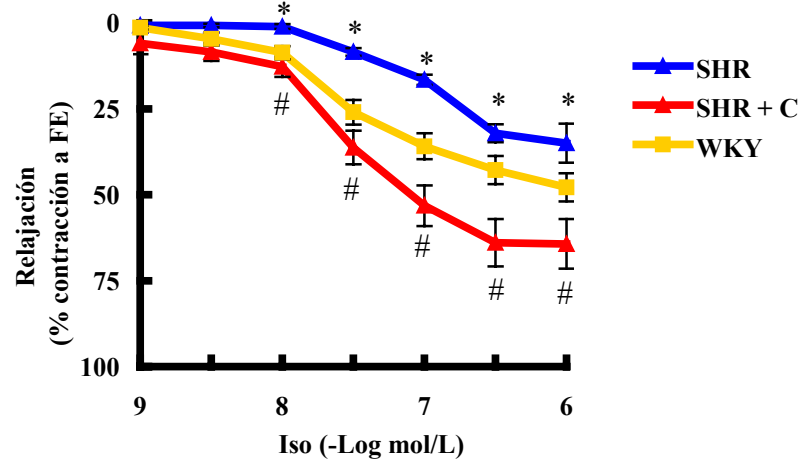


Figura 15. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la relajación inducida por el agonista de los receptores  $\beta$ , isoprenalina, en anillos aórticos de rata. \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

### 2.2.3. Expresión génica de la enzima Óxido Nítrico Sintasa Endotelial en aorta

El tratamiento con Candesartán aumentó ( $p < 0.05$ ) significativamente los niveles de ARN mensajero de la NOSe aórtica en las ratas hipertensas al compararlos con los de las ratas controles (Figura 16).

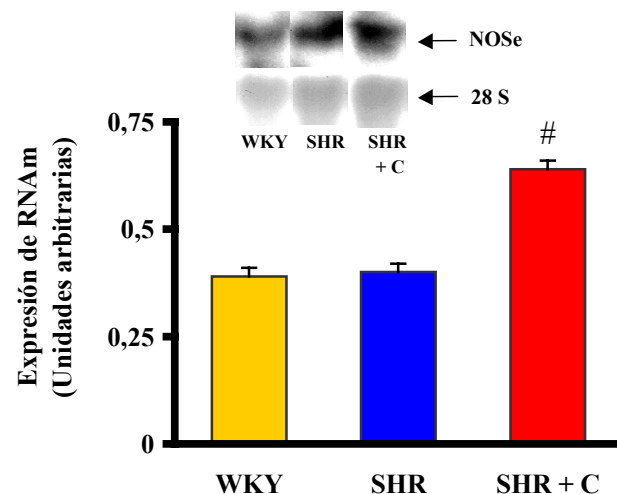


Figura 16. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la expresión relativa del ARN mensajero de NOSe en aortas de rata. #  $p < 0.05$  vs. SHR

### 3. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub>

#### 3.1. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

##### 3.1.1. Estrés Oxidativo Vascular: Expresión génica de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa en aorta

Las ratas SHR presentaban unos niveles de ARN mensajero de p22phox significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que los de las ratas WKY (Figura 17). Este aumento podría sugerir una mayor producción de aniones superóxido.

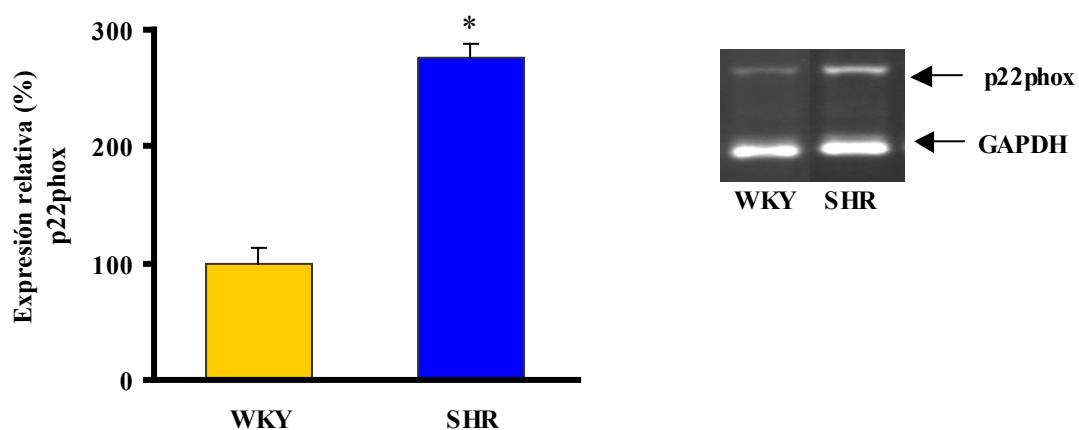


Figura 17. Expresión relativa del ARN mensajero de la subunidad de la NADPH oxidasa, p22phox, en aortas de WKY y SHR. #  $p < 0.05$  vs. SHR

##### 3.1.2. Estrés Oxidativo Hepático: Niveles de GSH/GSSG, GPx, GRed y MDA.

La concentración hepática del glutatión reducido fue menor ( $p < 0.05$ ) en las ratas SHR que en las WKY, mientras que la concentración hepática del glutatión oxidado aumentó ( $p < 0.05$ ) en las ratas hipertensas respecto a las ratas normotensas. Así, las SHR presentaron un cociente de glutatión reducido/glutatión oxidado significativamente

menor que el de las ratas controles (Tabla 2). Asimismo, los niveles hepáticos de la enzima glutatión peroxidasa fueron menores ( $p < 0.05$ ) en las SHR ( $520.9 \pm 19.7$  U/g proteína) respecto de las WKY ( $736.4 \pm 21.9$  U/g proteína; Figura 18). Por el contrario, la concentración de la enzima glutatión reductasa estaba aumentada significativamente en las ratas espontáneamente hipertensas ( $48.1 \pm 1.6$  U/g proteína) cuando se comparó con la que tenían las ratas controles ( $39.0 \pm 1.4$  U/g proteína; Figura 19). Finalmente, los niveles hepáticos de malondialdehído de las ratas hipertensas ( $0.41 \pm 0.02$   $\mu\text{mol/g}$  proteína) eran superiores ( $p < 0.05$ ) a los de las ratas normotensas ( $0.35 \pm 0.01$   $\mu\text{mol/g}$  proteína; Figura 20). Estos resultados podrían indicar la posible vinculación entre los niveles de presión arterial elevada y un aumento del estrés oxidativo debido al aumento del MDA y una reducción del sistema antioxidante hepático reflejado por el cociente GSH/GSSG.

<b>Grupo</b>	<b>GSH (<math>\mu\text{mol/g}</math> proteína)</b>	<b>GSSG (<math>\mu\text{mol/g}</math> proteína)</b>	<b>GSH/GSSG</b>
<b>WKY</b>	<b><math>29,50 \pm 1,2</math></b>	<b><math>0,72 \pm 0,08</math></b>	<b><math>39,25 \pm 4,22</math></b>
<b>SHR</b>	<b><math>23,22 \pm 3,4</math> *</b>	<b><math>0,84 \pm 0,03</math> *</b>	<b><math>27,64 \pm 1,25</math> *</b>

Tabla 2. Concentraciones hepáticas de glutatión reducido, glutatión oxidado y relación GSH/GSSG de ratas normotensas e hipertensas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY.

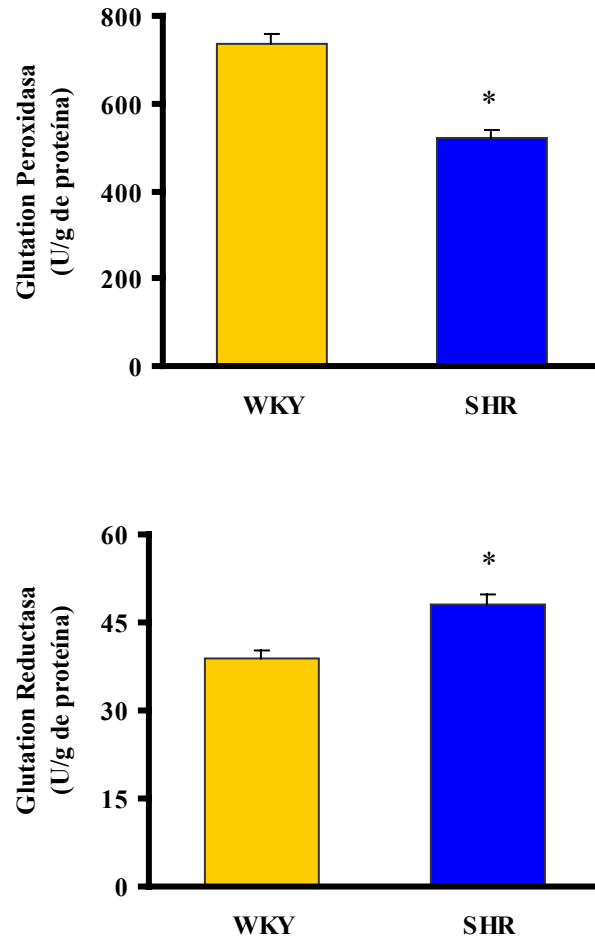


Figura 18 y 19. Estrés oxidativo hepático en ratas WKY y SHR: relación GSH/GSSG (arriba), actividad de la enzima glutathione reductasa (medio) y glutathione peroxidasa (abajo). \*  $p < 0.05$  vs. WKY.

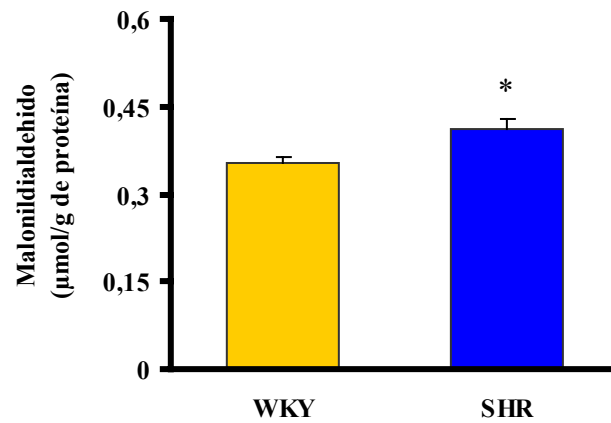


Figura 20. Niveles hepáticos de MDA de las ratas WKY y SHR. \*  $p < 0.05$  vs. WKY.

### 3.1.2. Marcadores Sistémicos: niveles plasmáticos de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>

Sin embargo, la concentración plasmática de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> fue similar tanto en las ratas WKY como en las SHR (13.4 ± 2.3 pg/mL vs. 10.8 ± 1.1 pg/mL; Figura 21).

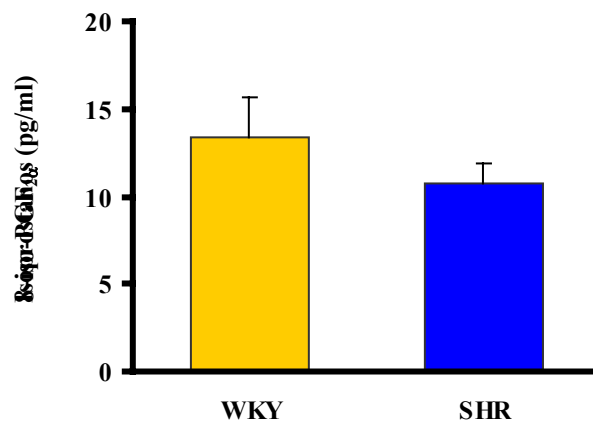


Figura 21. Niveles plasmáticos de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (abajo) en ratas WKY y SHR. \* p<0.05 vs. WKY.

## 3.2. CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

### 3.2.1. Estrés Oxidativo Vascular: Expresión génica de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa en aorta

El bloqueo de los receptores tipo 1 de angiotensina II con candesartán en las ratas SHR disminuyó de manera significativa (p<0.05) la expresión de ARN mensajero de p22phox de aorta al compararla con la de las ratas sin tratar (Figura 22).

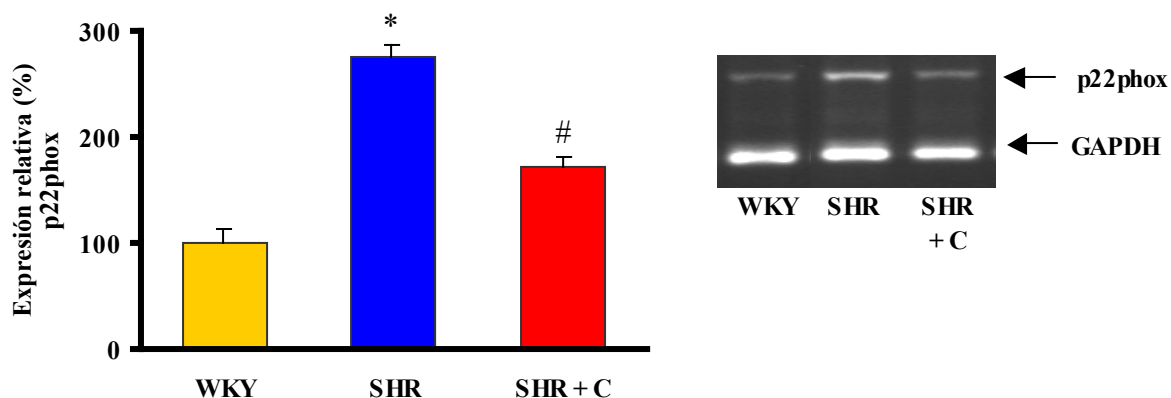


Figura 22. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la expresión relativa de la subunidad de la NADPH oxidasa, p22phox, en aortas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

### 3.2.2. Estrés Oxidativo Hepático: Niveles de GSH/GSSG, GPx, GRed y MDA.

El bloqueo de los receptores de angiotensina II tipo 1 en las SHR redujo ( $p < 0.05$ ) la concentración hepática del GSH respecto a las SHR sin tratar. Igualmente, la concentración hepática del GSSG disminuyó ( $p < 0.05$ ) en las ratas hipertensas tratadas con candesartán respecto a las ratas sin tratar. El bloqueo de los receptores de  $AT_1$  en las ratas espontáneamente hipertensas aumentó significativamente los valores del índice de GSH/GSSG respecto de las ratas SHR (Tabla 3).

Grupo	GSH ( $\mu\text{mol/g}$ proteína)	GSSG ( $\mu\text{mol/g}$ proteína)	GSH/GSSG
WKY	29,50 $\pm$ 1,2	0,72 $\pm$ 0,08	39,25 $\pm$ 4,22
SHR	23,22 $\pm$ 3,4 *	0,84 $\pm$ 0,03 *	27,64 $\pm$ 1,25 *
SHR + C	32,38 $\pm$ 1,3 #	0,66 $\pm$ 0,09 #	46,74 $\pm$ 5,74 #

Tabla 3. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre las concentraciones hepáticas de glutatión reducido, glutatión oxidado y relación GSH/GSSG en ratas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

Sin embargo, el tratamiento con candesartán en las ratas SHR no modificó los niveles hepáticos de GPx ( $480.6 \pm 41.3$  U/g proteína) que estaban reducidos en estas ratas sin tratamiento ( $520.9 \pm 19.7$  U/g proteína; Figura 23). Tampoco se modificaron los niveles hepáticos de la enzima GRed cuando se compararon los valores de las ratas espontáneamente hipertensas tratadas con Candesartán ( $46.2 \pm 1.3$  U/g proteína) respecto a las no tratadas ( $48.1 \pm 1.6$  U/g proteína; Figura 24).

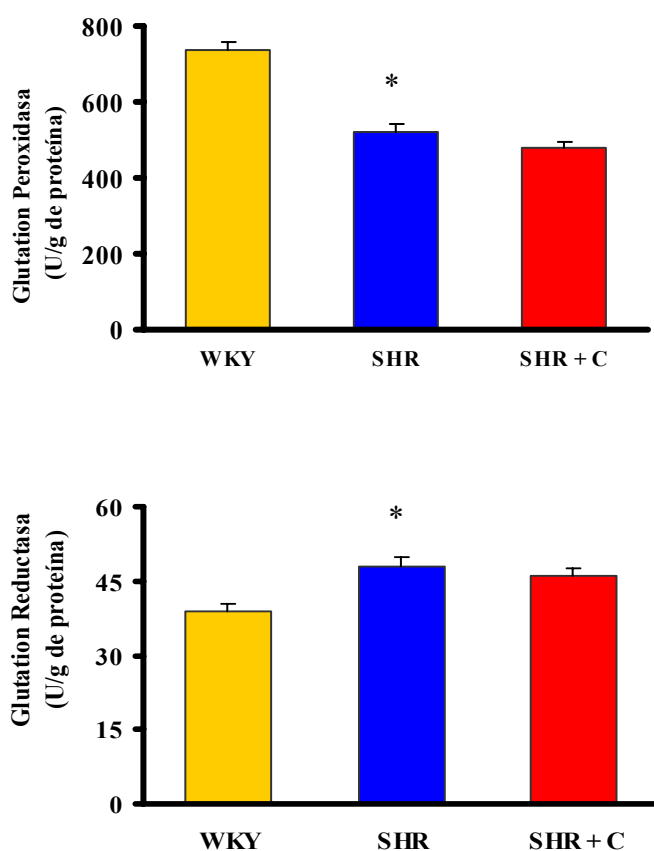


Figura 23 y 24. Efecto del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> sobre el estrés oxidativo hepático en ratas: glutatión peroxidasa (arriba) y actividad de la enzima glutatión reductasa (abajo). \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

El tratamiento con candesartán en las SHR redujo significativamente los niveles hepáticos de malonildialdehído ( $0.33 \pm 0.03$   $\mu\text{mol/g}$  proteína) respecto de las SHR sin

tratamiento ( $0.41 \pm 0.02 \mu\text{mol/g}$  proteína; Figura 25). Estos resultados sugieren el efecto beneficioso del bloqueo de los receptores  $\text{AT}_1$  en las SHR debido a su capacidad de mejorar estatus oxidativo.

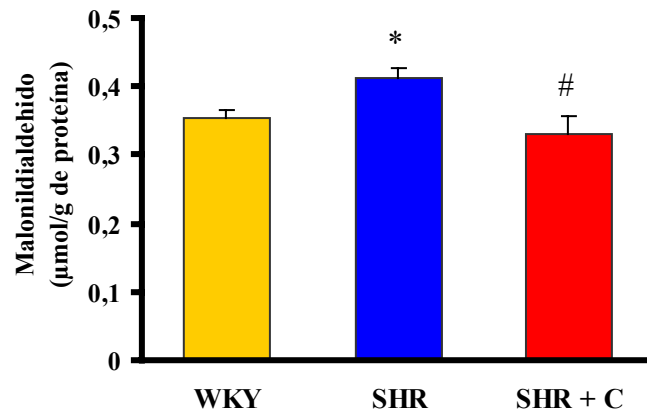


Figura 25. Efecto del bloqueo de los receptores  $\text{AT}_1$  sobre los niveles hepáticos de MDA en ratas.

\*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

### 3.2.3. Marcadores Sistémicos: niveles plasmáticos de 8-iso-PGF $_{2\alpha}$

No se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  en las ratas SHR tratadas con candesartán respecto a las ratas sin tratar ( $16.2 \pm 3.5$  vs.  $10.8 \pm 1.1$  pg/mL; Figura 26)

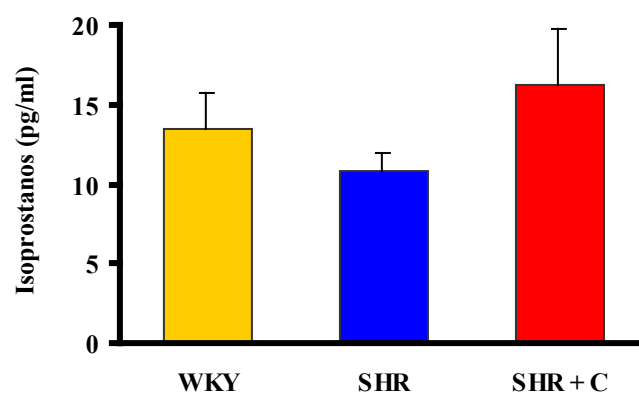


Figura 26. Efecto del bloqueo de los receptores  $\text{AT}_1$  sobre los niveles plasmáticos de 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  en ratas.

#### 4. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA INFLAMACIÓN: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub>

##### 4.1. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA INFLAMACIÓN

###### 4.1.1 Concentraciones Plasmáticas: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ y PCR

Las ratas espontáneamente hipertensas tenían una concentración plasmática de la interleuquina 1 $\beta$  ( $58.3 \pm 10.4$  pg/mL) significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que las ratas normotensas ( $14.6 \pm 2.3$  pg/mL; Figura 27).

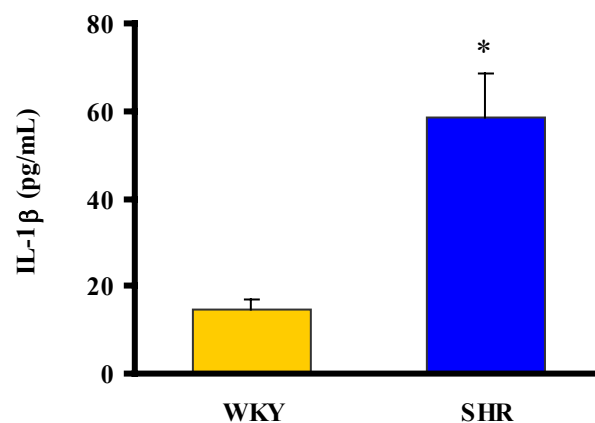


Figura 27. Concentraciones plasmáticas de Interleuquina 1 $\beta$  en ratas WKY y SHR. \*  $p < 0.05$  vs. WKY.

Igualmente, la concentración plasmática de la interleuquina 6 fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en las ratas SHR ( $134.3 \pm 10.1$  pg/mL) cuando se comparó con las WKY ( $96.0 \pm 16.4$  pg/mL) (Figura 28). Este aumento en la concentración plasmática tanto de la IL-6 como de la IL-1 $\beta$  se correlacionó de manera positiva y significativamente con los niveles de presión arterial de las ratas, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.5 para la IL-1 $\beta$  y un 0.52 para la IL-6 (Figura 29).

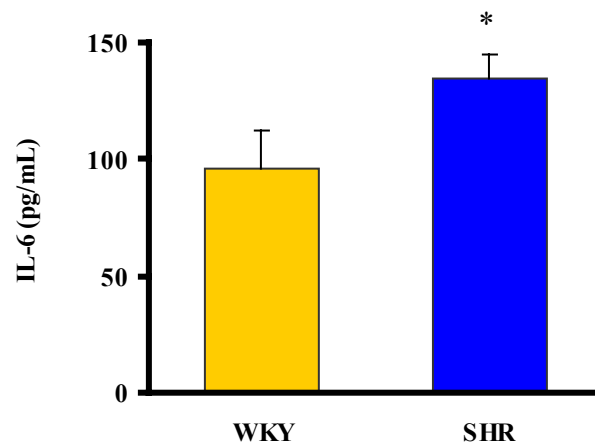
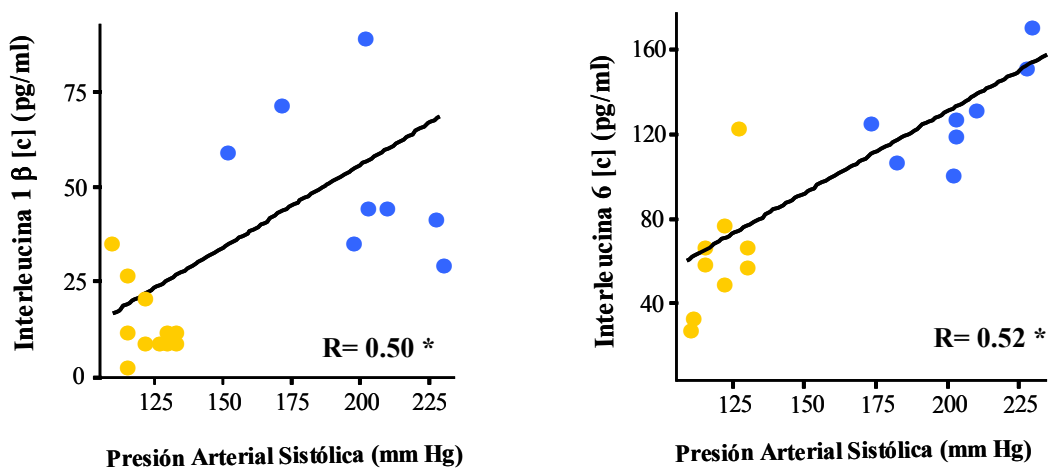


Figura 28. Concentraciones plasmáticas de Interleuquina 6 en ratas WKY y SHR. \*  $p < 0.05$  vs. WKY.



$$\text{Interleucina 1 B [c] (pg/ml)} = -31.47 + 0.37 * \text{PAS}$$

$$\text{Interleucina 6 [c] (pg/ml)} = -1.05 + 0.67 * \text{PAS}$$

Fig 29. Representación gráfica de las correlaciones entre los valores de las concentraciones plasmáticas de IL-1 $\beta$  e IL-6 respectivamente frente a los niveles de presión arterial de las ratas WKY y SHR. Debajo de cada gráfica se detalla la ecuación de la recta de regresión. \*  $p < 0.01$ .

Sin embargo, los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  de las ratas espontáneamente hipertensas y las normotensas fueron indetectables. Por otro lado, no hubo diferencias significativas en la concentración plasmática de IFN- $\gamma$  (Figura 30) de las ratas SHR ( $13.1 \pm 0.3$  pg/mL) y las WKY ( $15.0 \pm 0.8$  pg/mL). De manera similar, tanto las ratas

normotensas como las hipertensas presentaron valores comparables de la concentración plasmática de Proteína C Reactiva ( $0,816 \pm 0,032$  vs.  $0,739 \pm 0,050$  mg/mL; Figura 31).

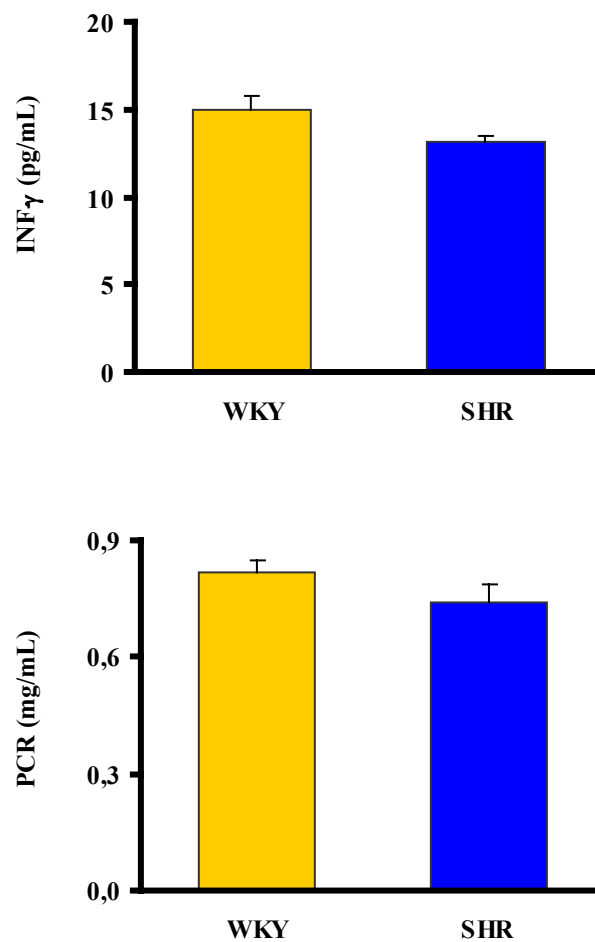


Figura 30 y 31. Concentraciones plasmáticas del Interferón  $\gamma$  (arriba) y Proteína C Reactiva (abajo) en las ratas WKY y SHR.

#### 4.1.2 Expresión génica de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ .

Al estudiar la expresión génica de los parámetros inflamatorios vasculares, se observó que el ARN mensajero de IL-1 $\beta$  de aorta de las ratas espontáneamente hipertensas estaba sobreexpresado ( $p < 0.05$ ) cuando se comparó con la expresión génica en las ratas normotensas (Figura 32). En esta misma dirección, los niveles de ARN mensajero de interleuquina 6 en aorta fueron mayores ( $p < 0.05$ ) en las ratas SHR que en las ratas WKY (Figura 33). A diferencia de lo que sucedía en el plasma donde no se pudieron detectar los niveles del TNF- $\alpha$ , en las aortas de las ratas espontáneamente hipertensas existía una sobreexpresión significativa ( $p < 0.05$ ) del ARN mensajero de

este parámetro respecto de los controles normotensos (Figura 34). Estos tres últimos resultados muestran que los niveles de presión arterial elevados están asociados a un aumento de la expresión génica de parámetros inflamatorios vasculares.

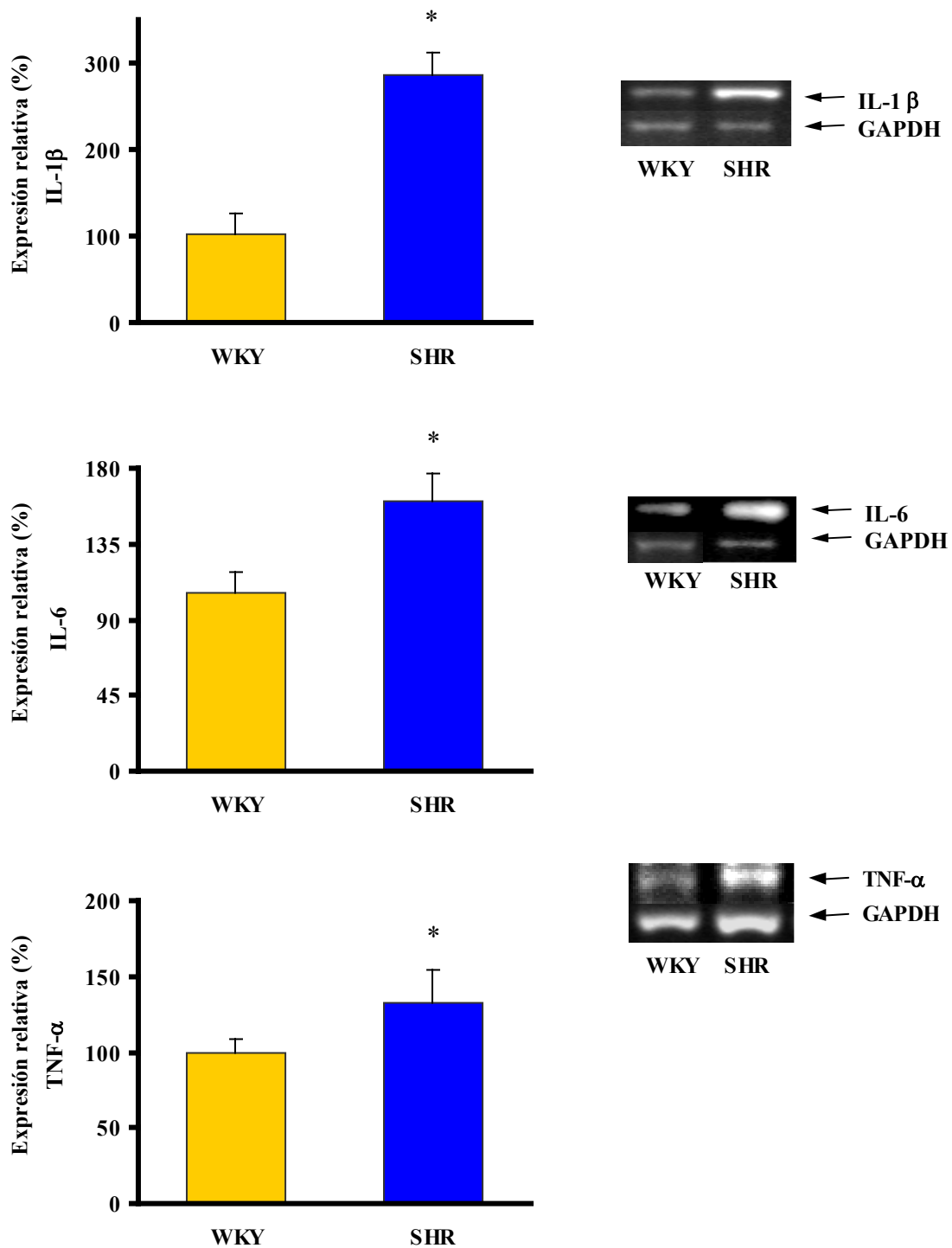


Figura 32, 33 y 34. Expresión relativa del ARN mensajero de la IL-1β (arriba), IL-6 (medio) y TNF-α (abajo) en aortas de ratas normotensas e hipertensas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY

### 4.1.3 Sistema NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B

La expresión del ARN mensajero de p105 (precursor de la subunidad p50 del factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B) fue significativamente mayor en las ratas SHR respecto a la de las ratas WKY (Figura 35), mientras que la expresión vascular del inhibidor del NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B (Figura 36), fue reducida de manera significativa. Por tanto, estos resultados sugieren que la hipertensión está asociada a cambios en el sistema NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B.

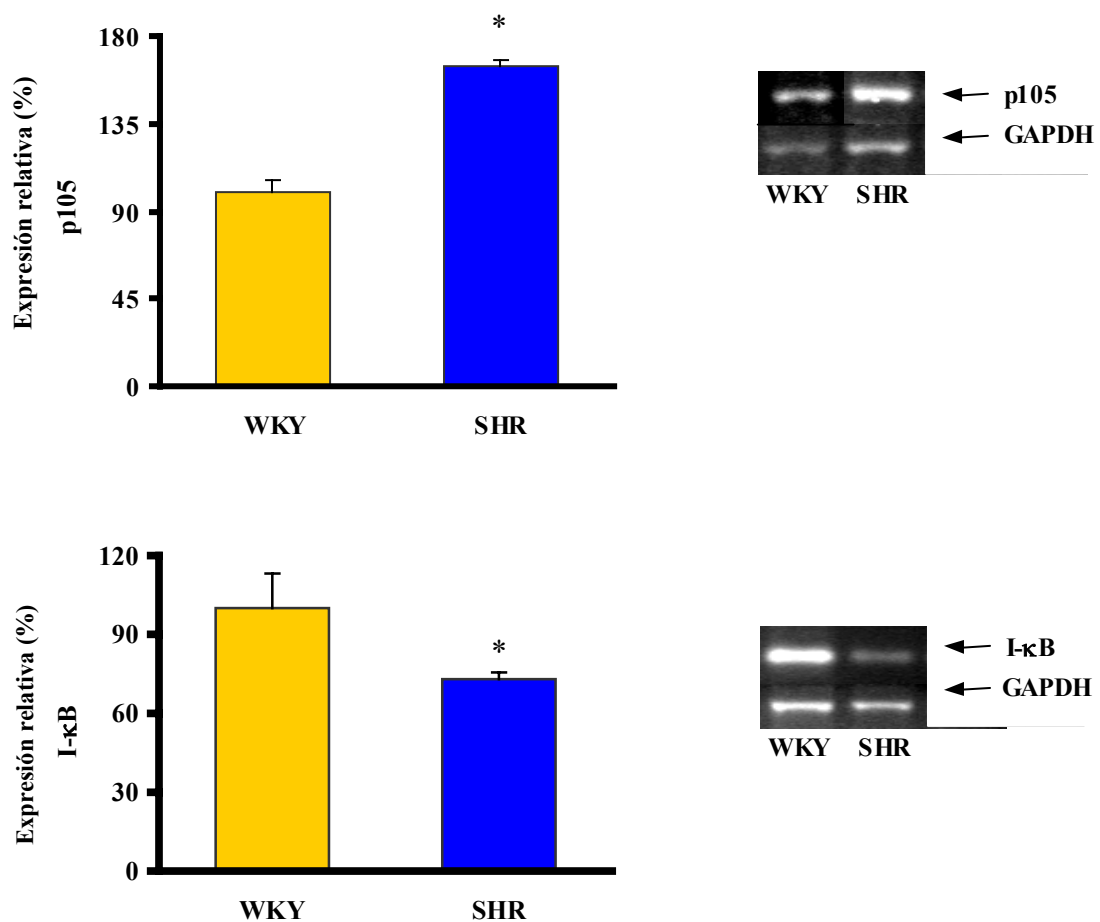


Figura 35 y 36. Expresión relativa del ARN mensajero del factor de transcripción nuclear, NF- $\kappa$ B (arriba), y de su inhibidor, I- $\kappa$ B (abajo) en aortas de ratas WKY y SHR. \*  $p < 0.05$  vs. WKY.

## 4.2. CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> SOBRE LA INFLAMACIÓN

### 4.2.1 Concentraciones Plasmáticas: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ y PCR

Las ratas espontáneamente hipertensas tratadas con Candesartán presentaron una disminución ( $p < 0.05$ ) en la concentración plasmática de la IL-1 $\beta$  cuando se compararon con los valores de las ratas sin tratamiento ( $37.3 \pm 2.1$  vs.  $58.3 \pm 10.4$  pg/mL; Figura 37). En esta misma dirección, el tratamiento crónico con Candesartán normalizó la concentración plasmática de la IL-6 en las ratas hipertensas ( $83.4 \pm 9.5$  pg/mL vs.  $134.3 \pm 10.1$  pg/mL; Figura 38).

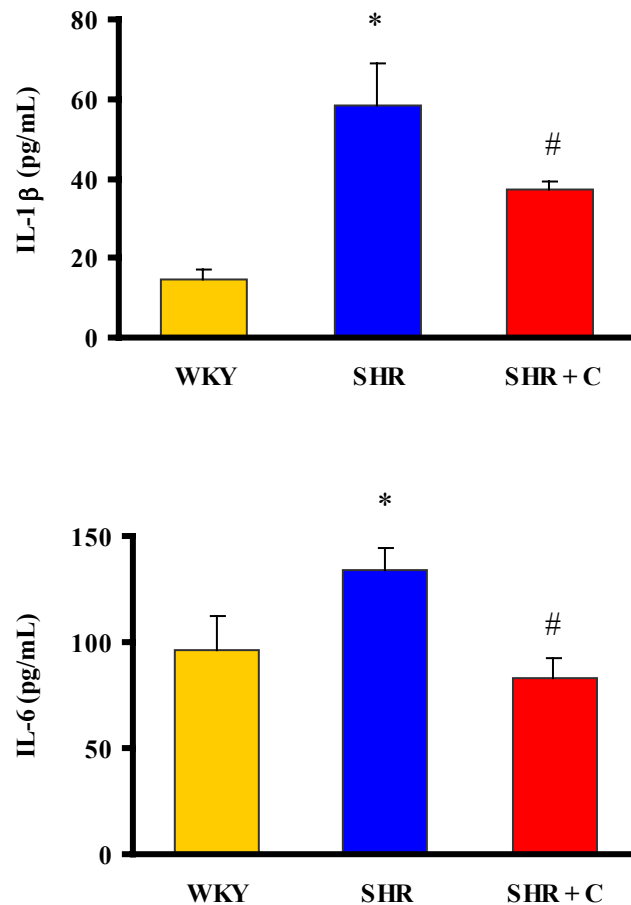
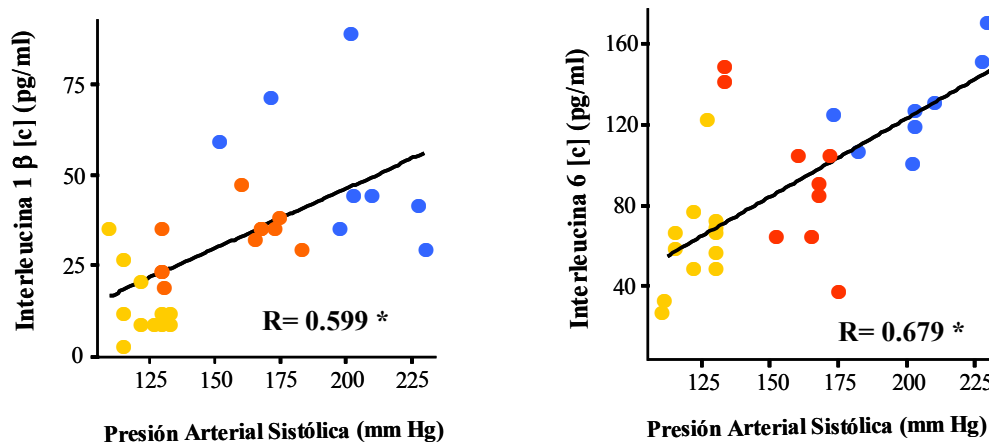


Figura 37 y 38. Efecto del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> sobre las concentraciones plasmáticas de Interleuquina 1 $\beta$  e IL-6 en las ratas WKY y SHR. \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR.

Al estudiar la correlación entre las concentraciones plasmáticas de ambas citoquinas y los valores de presión arterial de todos los grupos, se obtuvo una relación más lineal entre los factores obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.599 para la IL-1 $\beta$  y un 0.679 para la IL-6, respectivamente (Figura 39).



$$\text{Interleucina 1 B [c] (pg/ml)} = -19.79 + 0.33 * \text{PAS}$$

$$\text{Interleucina 6 [c] (pg/ml)} = -31.91 + 0.78 * \text{PAS}$$

Fig 39. Representación gráfica de las correlaciones entre los valores de las concentraciones plasmáticas de IL-1 $\beta$  e IL-6 respectivamente frente a los niveles de presión arterial de las ratas WKY, SHR y SHR+C. Debajo de cada gráfica se detalla la ecuación de la recta de regresión. \*  $p < 0.01$ .

Sin embargo, los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  de las ratas espontáneamente hipertensas tratadas con Candesartán tampoco se pudieron detectar, al igual que los otros grupos del estudio. Las ratas SHR tratadas con el antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> presentaron unos valores plasmáticos de IFN- $\gamma$  comparables a los de sus controles SHR ( $12.6 \pm 0.4$  vs.  $13.1 \pm 0.3$  pg/mL; Figura 40). Por último, el tratamiento crónico con Candesartán no modificó los niveles plasmáticos de la Proteína C Reactiva (Figura 41), siendo comparables los valores entre SHR con y sin tratamiento ( $0.661 \pm 0.029$  vs.  $0.739 \pm 0.050$  mg/mL) respectivamente.

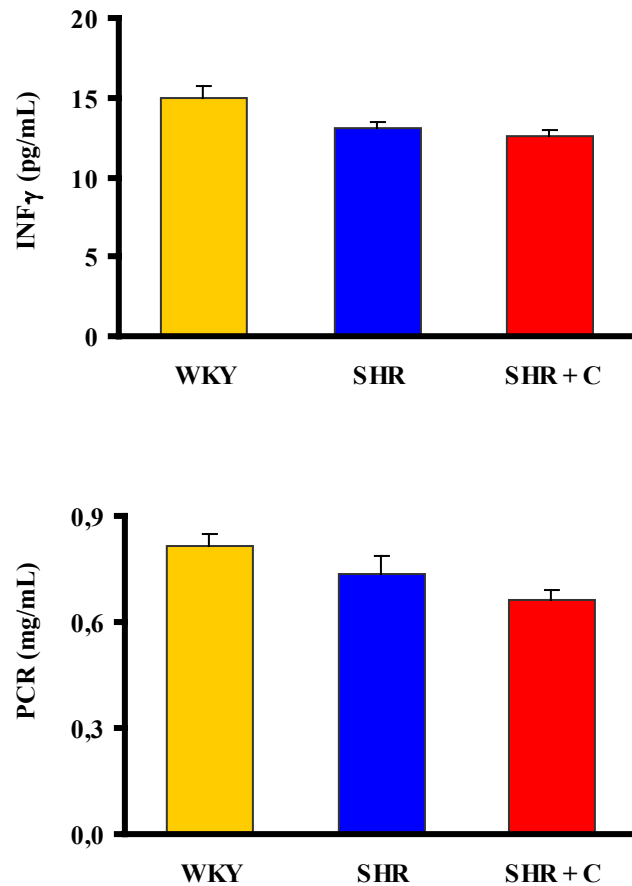


Figura 40 y 41. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la proteína C reactiva (arriba) e interferón- $\gamma$  (abajo) en ratas.

#### 4.2.2 Expresión génica de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ en aorta.

Las ratas hipertensas tratadas con Candesartán presentaron unos niveles de expresión aórtica del ARN mensajero de IL-1 $\beta$  significativamente menores que los de las ratas SHR no tratadas (Figura 42). Igualmente, el bloqueo crónico de los receptores  $AT_1$  de AII en las SHR redujo ( $p < 0.05$ ) los niveles aórticos del ARN mensajero de IL-6 respecto de los de las SHR sin tratar (Figura 43). Sin embargo, a pesar de esta disminución, no alcanzaron los niveles de expresión de las ratas normotensas. Respecto a la expresión del ARN mensajero del TNF- $\alpha$  en aorta, el tratamiento con Candesartán redujo significativamente la expresión del gen en ratas hipertensas cuando se comparó con las ratas sin tratamiento (Figura 44).

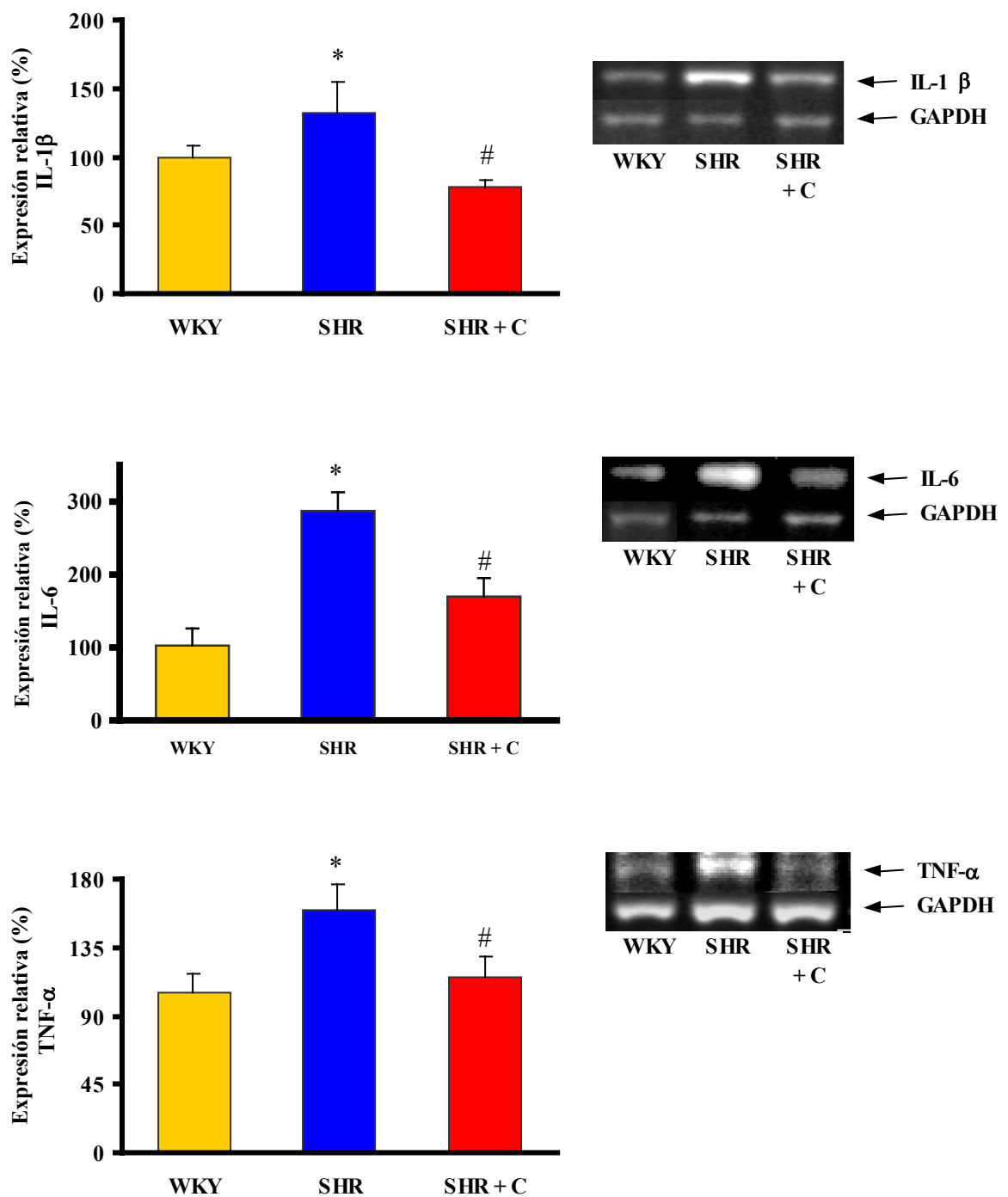


Figura 42, 43 y 44. Efecto del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> sobre la expresión relativa del ARN mensajero de la IL-1 $\beta$  (arriba), IL-6 (medio) y TNF- $\alpha$  (abajo) en aortas de ratas.

\*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

### 4.2.3 Sistema NFκB/IκB

Las ratas espontáneamente hipertensas tratadas con Candesartán redujeron significativamente ( $p < 0.05$ ) la expresión del ARN mensajero del precursor de la subunidad p50 del NFκB, p105 (Figura 45) respecto a sus controles no tratados. Por otro lado, el tratamiento crónico con candesartán aumentó ( $p < 0.05$ ) la expresión vascular del ARN mensajero del inhibidor del NFκB, el IκB, respecto a las ratas no tratadas (Figura 46). Lo que se deduce de estos datos de expresión génica en la aorta es que la AII a través de los receptores AT<sub>1</sub> podría participar en la regulación de los parámetros inflamatorios vasculares, inducida en parte, por el sistema NFκB/IκB.

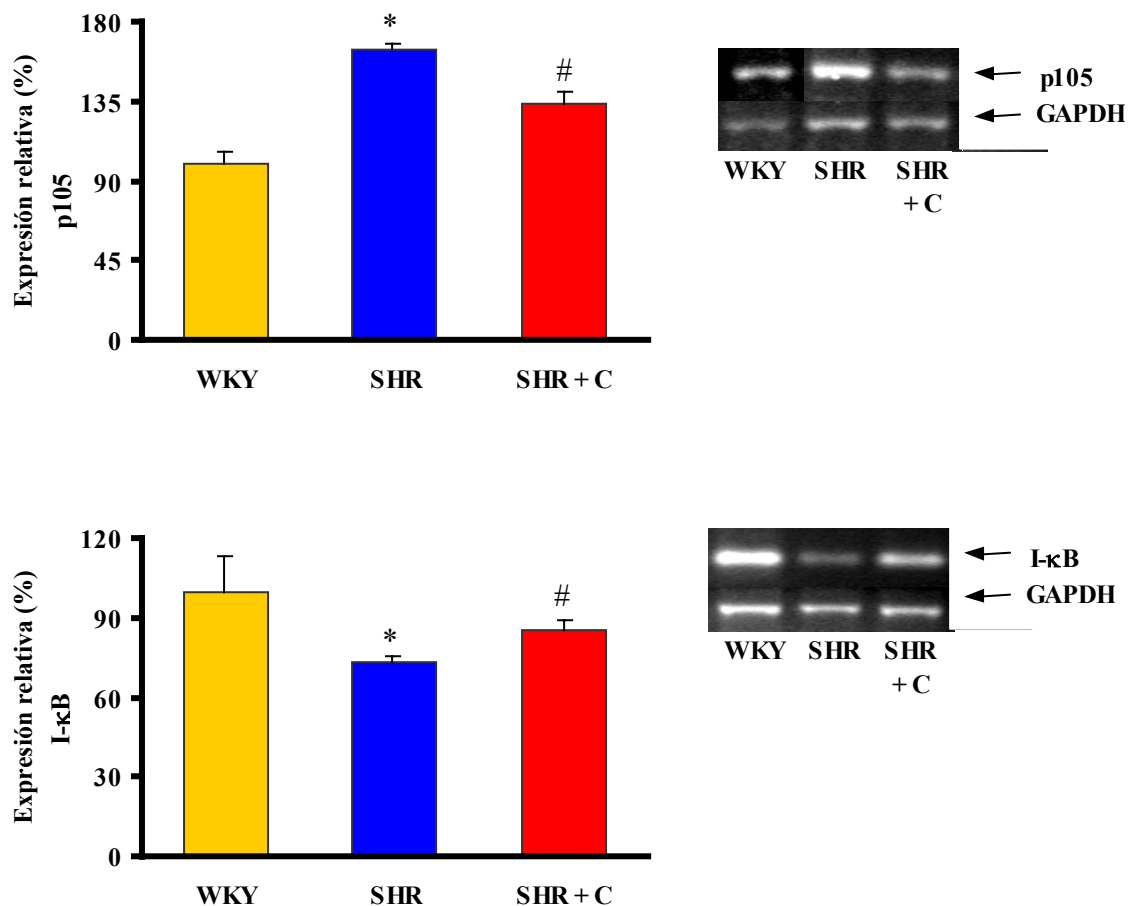


Figura 45 y 46. Efecto del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> sobre la expresión relativa del ARN mensajero del factor de transcripción nuclear, NF-κB (arriba), y de su inhibidor, I-κB (abajo) en aortas de ratas.

\*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR.

## 5. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA PARED DE LA AORTA: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub>

### 5.1 EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA PARED DE LA AORTA

#### 5.1.1. Morfometría de la aorta

En las ratas SHR, se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) del área de la media, área del vaso y área de la luz respectivamente, así como del cociente media/lumen (Figura 47; Tabla 4) al compararlos con las medidas de las ratas normotensas.

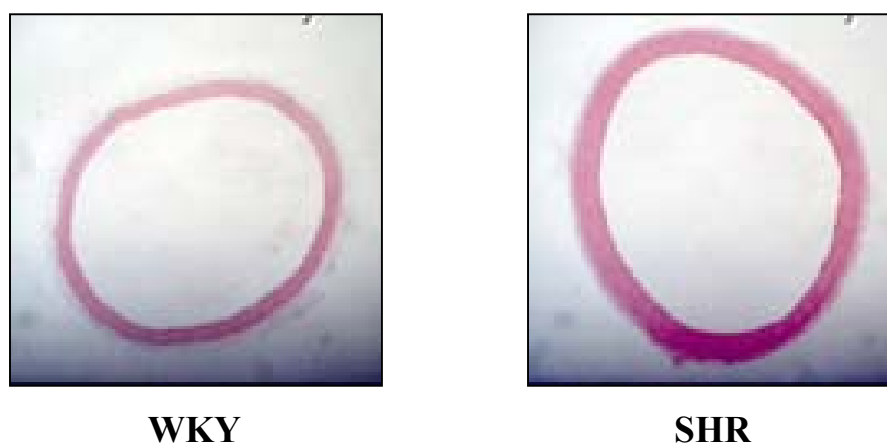


Figura 47. Microfotografías representativas (aumento original x 40) de secciones de aorta de ratas normotensas y ratas hipertensas.

Grupo	Área del Vaso (mm <sup>2</sup> )	Área de la Luz (mm <sup>2</sup> )	Área de la Media (mm <sup>2</sup> )	Cociente Media/Lumen
WKY	1.46 ± 0.09	1.96 ± 0.12	0.5 ± 0.04	0.25 ± 0.01
SHR	1.95 ± 0.10 *	2.83 ± 0.25 *	0.89 ± 0.08 *	0.31 ± 0.02 *

Tabla 4. Área del vaso, de la luz y de la media y cociente media/lumen en arterias de ratas normotensas e hipertensas. Los valores se expresaron como la media ± eem. \*  $p < 0.05$  vs. WKY.

### 5.1.2. Contenido de Colágeno en aorta

Las ratas SHR presentaron un contenido de colágeno en las aortas mayor ( $p < 0.05$ ) cuando se comparó con las ratas normotensas (Figuras 48 y 49). Como se observa en las fotos, los depósitos de colágeno, mostrados en color verde son más abundantes en la aorta de las ratas SHR que en la de WKY.

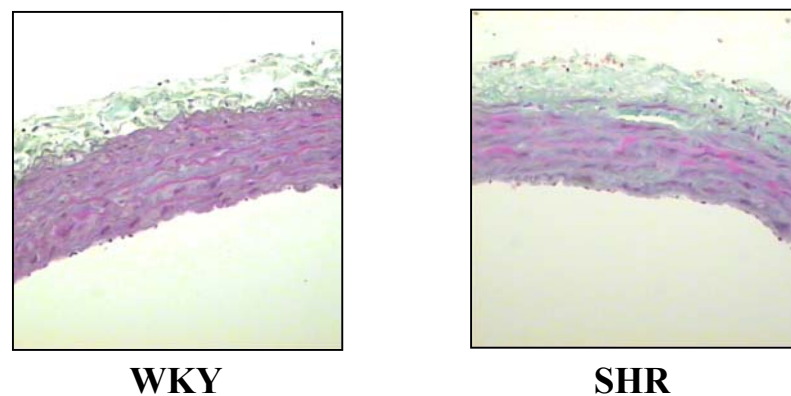


Figura 48. Microfotografías representativas del contenido de colágeno en secciones de aorta de ratas normotensas (WKY) y ratas hipertensas (SHR) procesadas con la tinción de Mason (aumento original x 80).

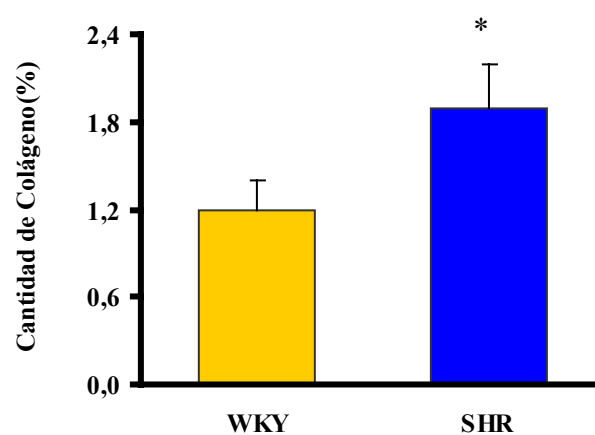


Figura 49. Cantidad de colágeno en porcentaje, en aortas de ratas normotensas e hipertensas.

\*  $p < 0.05$  vs. WKY

### 5.1.2. Expresión génica de CTGF en aorta

Las ratas espontáneamente hipertensas presentaron una mayor ( $p < 0.05$ ) expresión vascular del ARNm del CTGF cuando se compararon con los valores de las ratas normotensas (Figura 50).

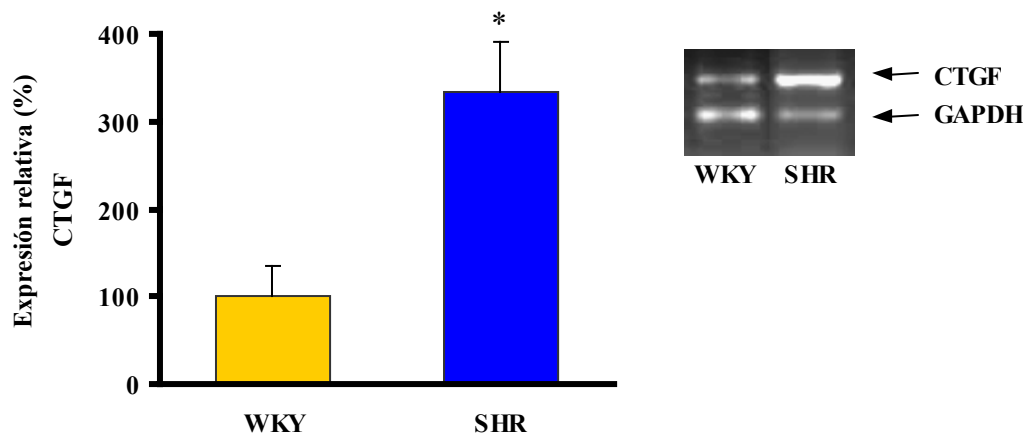


Figura 50. Expresión relativa del ARN mensajero del CTGF en aortas de ratas normotensas e hipertensas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY

### 5.1.3. Inmunohistoquímica de CTGF en aorta

Los cortes de aorta de las ratas WKY no presentaban tinción específica para el CTGF (Figura 51). Por el contrario, las ratas SHR mostraron una inmunotinción específica para el CTGF, más evidente en las células del músculo liso vascular.

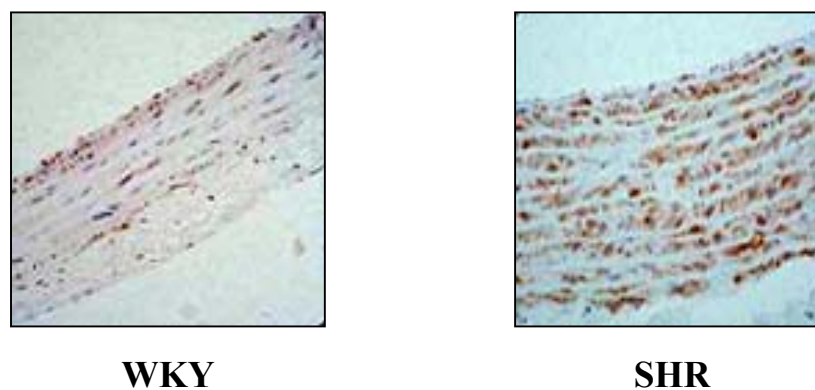


Figura 51. Microfotografías representativas de secciones de aorta de ratas normotensas (WKY) y ratas hipertensas (SHR) inmuno teñidas con el anticuerpo anti-CTGF (aumento original x 120).

## 5.2. CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA PARED DE LA AORTA

### 5.2.1. Estructura Vascular

El tratamiento crónico con Candesartán en ratas espontáneamente hipertensas redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) el área de la media y el cociente media/lumen (Figura 52; Tabla 5). Sin embargo, no se observaron cambios en las SHR tratadas ni en el área de la luz ni en el área del vaso. Estos datos sugieren el papel importante de la Angiotensina II en el engrosamiento de la media asociado a hipertensión.



Figura 52. Microfotografías representativas (aumento original x 40) de secciones de aorta de ratas WKY, SHR y SHR + C.

Grupo	Área del Vaso (mm <sup>2</sup> )	Área de la Luz (mm <sup>2</sup> )	Área de la Media (mm <sup>2</sup> )	Cociente Media/Lumen
WKY	1.46 ± 0.09	1.96 ± 0.12	0.5 ± 0.04	0.25 ± 0.01
SHR	1.95 ± 0.10 *	2.83 ± 0.25 *	0.89 ± 0.08 *	0.31 ± 0.02 *
SHR + C	1.95 ± 0.19 *	2.55 ± 0.13 * #	0.61 ± 0.03 * #	0.24 ± 0.02 * #

Tabla 5. Efecto del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> sobre el área del vaso, de la luz y de la media y el cociente media/lumen en arterias de rata. Los valores se expresaron como la media ± eem. \*  $p < 0.05$  vs. WKY.

### 5.2.2. Contenido de Colágeno en aorta

El tratamiento crónico con Candesartán en las ratas SHR provocó una reducción significativa del contenido de colágeno en aorta respecto de las ratas SHR sin tratar (Figuras 53 y 54).

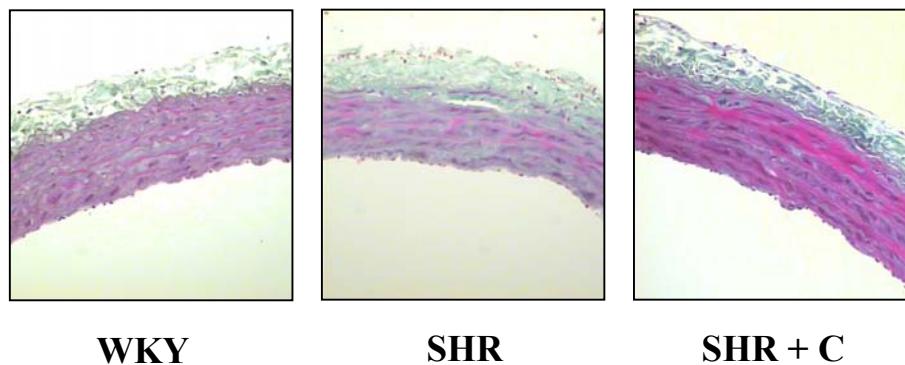


Figura 53. Microfotografías representativas del contenido de colágeno en secciones de aorta de ratas normotensas (WKY), ratas hipertensas (SHR) e hipertensas tratadas con candesartán (SHR+C) procesadas con la tinción de Mason (aumento original x 80).

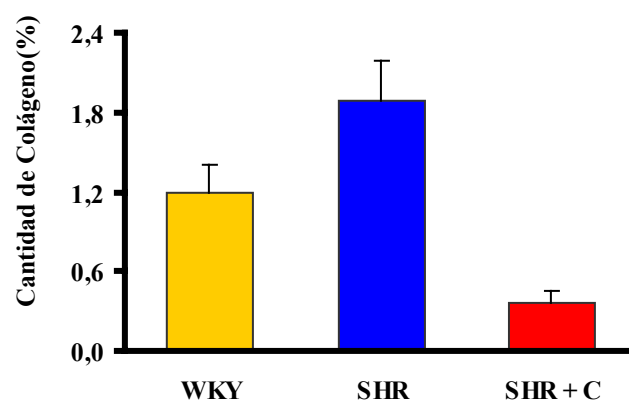


Figura 54. Porcentaje de la cantidad de colágeno analizado en las aortas de ratas normotensas (WKY), hipertensas (SHR) e hipertensas tratadas con candesartán (SHR+C).

\*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR.

### 5.2.2. Expresión génica de CTGF en aorta

La expresión del ARN mensajero del CTGF en los homogenizados de aorta de las ratas SHR tratadas con Candesartán fue menor ( $p < 0.05$ ) respecto de las SHR no tratadas (Figura 55). Estos resultados sugieren que la angiotensina II juega un papel importante en la regulación del CTGF en los animales hipertensos.

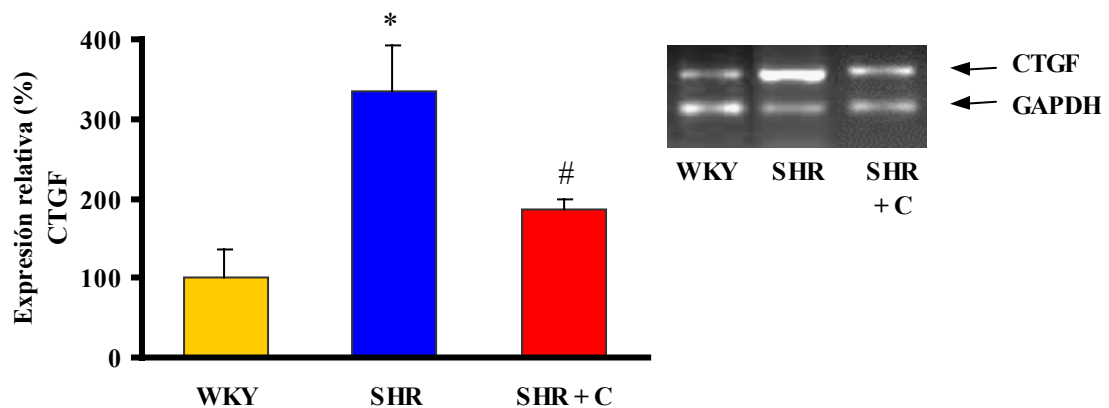


Figura 55. Efecto del bloqueo de los receptores  $AT_1$  sobre la expresión del ARN mensajero del Factor de Crecimiento Conectivo Tisular en las arterias de ratas. \*  $p < 0.05$  vs. WKY, #  $p < 0.05$  vs. SHR

### 5.2.3. Inmunohistoquímica de CTGF en aorta

El tratamiento crónico con Candesartán en las ratas SHR provocó una inmunotinción específica para el CTGF menor que la que tenían las ratas SHR sin tratar (Figura 56), lo que sugiere la participación de la angiotensina II en la regulación del CTGF vascular.



Figura 56. Microfotografías representativas de secciones de aorta inmuno teñidas con el anticuerpo anti-CTGF de ratas normotensas y ratas hipertensas tratadas o no con candesartán (aumento original x 120).

# DISCUSIÓN



Los resultados muestran que el bloqueo de los receptores de AT<sub>1</sub> con candesartán a la dosis de 2mg/Kg/día, en las ratas espontáneamente hipertensas produce una reducción importante de la presión arterial. Esta reducción, aunque no llegó a alcanzar los valores de las ratas normotensas, es capaz de producir unos efectos beneficiosos en cuanto a la estructura y función vascular, estrés oxidativo e inflamación tanto sistémica como vascular. Por tanto, se podría sugerir que el sistema renina angiotensina, y en particular la AII participaría mediante acciones celulares directas en las alteraciones estructurales, funcionales, oxidativas e inflamatorias vasculares asociadas a la hipertensión.

## **1. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN VASCULAR: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub>**

### **1.1. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN VASCULAR**

La hipertensión está asociada a un remodelado vascular. Así lo demuestra el estudio morfológico de las aortas de las ratas SHR que presentan cambios en la estructura vascular caracterizados por un aumento en el área del vaso, el área de la luz, el área de la media y un incremento en el cociente área de la media / área del lumen, respecto de las WKY. Estos resultados indican la presencia de un remodelado vascular caracterizado por la expansión hacia el exterior (outward expansion) en las SHR. El endotelio vascular, como se ha comentado en esta tesis, es sensible al estrés de cizalladura, induciendo vasodilatación cuando el flujo sanguíneo y la presión aumentan. Bajo condiciones normales, el tono basal de las arterias se reduce al aumentar la presión a través de este mecanismo dependiente de endotelio, y viceversa. Sin embargo, si la presión está elevada de manera crónica como ocurre en la hipertensión, la vasodilatación mantenida provocaría respuestas de crecimiento celular y por tanto se induciría un cambio fenotípico en las CMLV aumentando la hipertrofia, el crecimiento y el aumento de los depósitos de matriz extracelular. Estas alteraciones provocarían un engrosamiento de la pared vascular, un aumento de la luz del vaso y por tanto una expansión hacia afuera. De este modo, se podría pensar que dicho remodelado hacia

afuera se genera para mantener la luz del vaso por la incapacidad del mismo para normalizar el estrés tensional. Uno de los mecanismos implicados en esta alteración estructural es la activación de Rho, ya que se ha observado que contribuye en los procesos de hipertrofia y remodelado hacia afuera de la pared vascular dañada (Pearce et al., 2004). Como resultado final, las arterias alteran su función, disminuyendo la capacidad contráctil y/o relajante, y son menos elásticas, con la consiguiente pérdida de la capacidad de amortiguar el flujo sanguíneo pulsátil. Resumiendo, el remodelado hacia afuera tendría las siguientes características 1) podría ayudar a mantener la luz del vaso y restaurar la perfusión tisular, 2) no estaría vinculado directamente a la vasodilatación mediada por flujo, 3) estaría involucrado en la desdiferenciación transitoria y recambio de las CMLV y 4) está precedido por un aumento en la expresión de proteínas de la matriz extracelular (De Mey et al., 2005).

Como ya se ha comentado, la hipertensión produce un remodelado vascular caracterizado por un aumento de la producción de la matriz extracelular que va a inducir un engrosamiento de la media. El estrés tensional en las CMLV induce un aumento en la expresión de fibronectina y colágeno mediado por la activación del factor de transcripción nuclear AP-1 (Tamura et al., 2000). Además de estas proteínas, la producción vascular de CTGF está aumentada en modelos experimentales de hipertensión por infusión de AII (Oemar et al., 1997, Ruperez et al., 2003a). Se ha descrito que la regulación del CTGF está mediada, entre otros factores, por las fuerzas de estiramiento, de rozamiento y la presión tensional que componen el estrés mecánico (Riser et al., 2000). En este sentido, los resultados de este estudio muestran que en un modelo multifactorial de hipertensión arterial, existe un aumento en la expresión y en la producción vascular de CTGF así como un aumento de la producción de colágeno. Las SHR presentan una expresión vascular 3 veces mayor del ARNm del CTGF respecto a las WKY. Esta diferencia de expresión génica presenta un gran paralelismo con los ensayos de inmunohistoquímica, donde se observa una inmunotinción al CTGF superior en las secciones de aorta de las SHR respecto de las WKY. Este resultado sugeriría que el remodelado vascular observado en las ratas hipertensas estaría asociado a una mayor producción del agente profibrótico CTGF. Este resultado se asocia con un aumento de colágeno confirmando un aumento de la matriz extracelular en las SHR. Dichas alteraciones estructurales asociadas a hipertensión podrían estar ligadas a las

alteraciones observadas en la función vascular de las ratas SHR que se va a discutir a continuación.

Con respecto a los estudios de la función vascular, la elevación de las cifras de presión arterial va asociada a disfunción vascular, como sugieren los resultados de reactividad vascular obtenidos en los anillos aórticos de las SHR. Así, los resultados muestran que la vasoconstricción inducida por KCl es ligeramente menor en anillos aórticos de SHR que en los de las ratas WKY y que por tanto las fibras musculares de los anillos aórticos de las SHR presentan una ligera alteración de los mecanismos contráctiles independiente de endotelio, respecto de las WKY. Este resultado coincide con otros estudios, donde se ha descrito una vasoconstricción disminuida a KCl en SHR respecto a WKY, incluso en ratas SHR de 4 semanas de edad con unos niveles de presión arterial comparables a los de las WKY. Por tanto, esta disminución de la vasoconstricción a KCl en SHR podría tener un origen genético y no es consecuencia de la elevación de la presión arterial, ya que está presente antes de la aparición de la hipertensión (Gendron et al., 2004, Kung y Luscher, 1995). Al igual que la hipertensión, se ha observado que el envejecimiento reduce la vasoconstricción inducida por KCl tanto en las ratas hipertensas como en las normotensas (Kung y Luscher, 1995, Maeso et al., 1998). Debido a que la contracción a KCl es independiente de la activación de receptores, la reducción de esta respuesta indicaría que los mecanismos contráctiles de las CMLV están alterados en las SHR, lo que determina una menor eficacia de los mismos. El KCl produce una despolarización de la membrana de las células de músculo liso vascular (Fleming, 1987) aumentando la concentración de calcio intracelular. A partir de aquí, el calcio se une a la calmodulina activando la quinasa de la cadena ligera de miosina, que la va a fosforilar y promover la contracción del músculo liso vascular (Dzau, 1986). Se ha descrito que este tipo de contracción se debe principalmente a la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje localizados en la membrana, mientras que la liberación de calcio almacenado en los depósitos intracelulares no tiene mucha relevancia en este mecanismo (Karakı y Weiss, 1988). Por otro lado, los cambios en la estructura aórtica podrían explicar esta reducción en la vasoconstricción a KCl en SHR. La aorta de las SHR sufre un remodelado vascular que conduce a una vasoconstricción a KCl reducida *in vitro* y posiblemente a una rigidez vascular *in vivo* (Gendron et al., 2004).

Los resultados del trabajo muestran una respuesta vasoconstrictora heterogénea en las SHR. Así, la hipertensión se asocia a un aumento de la contracción dependiente de endotelio y un aumento de la respuesta a vasoconstrictores sistémicos como la AI o AII. Sin embargo, se observó una reducción de la vasoconstricción a FE en SHR.

La vasoconstricción dependiente de endotelio a la Ach + LNAME es mayor en los anillos aórticos de las SHR que en las WKY. El principal factor vasoconstrictor dependiente de endotelio es el TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>. Estudios realizados en aorta y en arterias de resistencia de ratas hipertensas, presentan resultados similares a los obtenidos en este estudio (Koga et al., 1989, Kung y Luscher, 1995). En experimentos realizados en anillos de aorta y en lecho mesentérico de ratas SHR se determinó que el EDCF era un derivado prostanoide de la COX, ya que la respuesta vasoconstrictora observada a altas dosis de Ach, se bloqueaba con indometacina (inhibidor de la síntesis de prostanoideos). Ensayos realizados en anillos de rata, también mostraron que la vasoconstricción a altas concentraciones de Ach se bloqueaba con el antagonista de los receptores de TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> (SQ29548), confirmando la naturaleza prostanoide del EDCF (Auch-Schwelk et al., 1992, Koga et al., 1989, Luscher and Vanhoutte, 1986c, Taddei y Vanhoutte, 1993, Yin et al., 1991). Además, en experimentos previos de nuestro grupo y que no se muestran aquí, no hemos observado ninguna diferencia en la vasoconstricción inducida por la ET-1 ni en la mediada por el análogo del TXA<sub>2</sub>, U-46619, en anillos de aorta, entre las SHR y las WKY. Por tanto, el aumento de la vasoconstricción a Ach + LNAME se debería a una liberación mayor de EDCF asociada a la hipertensión.

Los resultados del estudio muestran que la respuesta adrenérgica a FE en los anillos aórticos de los animales hipertensos es menor que en los animales normotensos. Sin embargo, en estudios previos hemos observado que la vasoconstricción a FE en anillos de aorta en SHR era mayor que en WKY (Cachofeiro et al., 1996, Rodrigo et al., 1997). Sin embargo, existen otros vasos como la carótida de ratas SHR-SP, donde se ha descrito que la respuesta a FE está disminuida en SHR respecto a WKY (Rahmani et al., 1999, Traub et al., 1995) sugiriendo una reducción de la sensibilidad de la FE a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos o una menor densidad de los mismos.

La FE es un agonista adrenérgico no selectivo que actúa sobre receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , tanto en el endotelio como en las CMLV. En el endotelio, ambos receptores producen liberación de NO que promueve la vaso relajación, sin embargo su efecto vasoconstrictor sobre las CMLV es mucho mas intenso, por lo que el resultado final es una vasoconstricción. La aparición del remodelado vascular asociado a la hipertensión podría explicar porque las ratas SHR presentan esta disminución en la respuesta a FE, ya que las CMLV cambiarían su fenotipo aumentando la hipertrofia, el crecimiento y el aumento de la matriz extracelular, y por tanto se vería reducida la funcionalidad y capacidad contráctil. Por otro lado, se ha sugerido que esta alteración de la respuesta a FE podría tener un origen genético, ya que hay estudios en los que se demuestra que la disminución de la contracción a FE en SHR respecto de las WKY es independiente de los niveles de presión arterial (Gendron et al., 2004).

A diferencia de lo que se observa con la respuesta adrenérgica, las SHR presentan una mayor respuesta tanto a la AI y AII. El aumento de la vasoconstricción en respuesta a la AI y AII que se observa en los anillos aórticos de SHR respecto a los de las WKY puede ser debido a una mayor sensibilidad y/o densidad de los receptores  $AT_1$ , así como a una mayor actividad de la ECA en la aorta. En este sentido, hay estudios en los que se ha observado que la respuesta vasoconstrictora inducida por el principal efector del sistema renina angiotensina, la AII, en SHR es mayor que en ratas normotensas. Por tanto, se podría sugerir que en la aorta de las ratas SHR habría una sobreexpresión de los receptores  $AT_1$  y que la AII participaría en el proceso de la disfunción vascular hipertensiva a través de estos receptores (Radhakrishnan and Sim 87-90). En los estudios realizados para evaluar la densidad de los receptores  $AT_1$ , se ha observado que en la aorta de rata hay una prevalencia mayor de los  $AT_1$  que de los  $AT_2$  y que en las SHR la densidad de los receptores  $AT_1$  es superior que en las WKY (Radhakrishnan and Sim, 1994, Song et al., 1994). Por otro lado, se han publicado trabajos en los que se demuestra que la actividad de la ECA en aorta de SHR es mayor que la de la rata WKY, lo que podría explicar también el aumento de la vasoconstricción a AI en los anillos aórticos de las SHR (Nakamura et al., 1988, Okunishi et al., 1991, Sim, 1990). En las venas cava y braquial de las ratas SHR también se ha descrito un aumento de la actividad de la ECA respecto a WKY; sin embargo, en las arterias pulmonar y hepática la actividad de la ECA fue similar tanto en

ratas hipertensas como en ratas normotensas. Por lo tanto este aumento no parece ser homogéneo en todos los lechos vasculares.

Las SHR presentan una relajación endotelio dependiente inducida por la Ach menor que las ratas normotensas confirmando una alteración de la función endotelial. La hipertensión está caracterizada por una disfunción endotelial que se manifiesta principalmente por una disminución de la relajación dependiente de endotelio (Cediel et al., 2003, Gibbons, 1997, Koga et al., 1989, Kung and Luscher, 1995, Miyamoto et al., 1998, Panza et al., 1995, Tominaga et al., 1994, Vazquez-Perez et al., 2001). Como ya hemos descrito, el endotelio es uno de los órganos diana de la hipertensión y debido a su localización anatómica, está expuesto a las fuerzas mecánicas del flujo sanguíneo. Por tanto, en las SHR, el aumento de presión arterial induce un aumento de fuerza de cizalladura en el endotelio vascular que va a provocar modificaciones estructurales como el remodelado vascular (anteriormente discutidas) y alteraciones funcionales que afectan a la producción, liberación y respuesta de los distintos factores vasoactivos (Luscher, 1990). La reducción de la relajación a Ach es consecuencia principalmente de una disminución en la disponibilidad de NO (Cediel et al., 2003, Gibbons, 1997, Koga et al., 1989, Kung and Luscher, 1995, Miyamoto et al., 1998, Panza et al., 1995, Vazquez-Perez et al., 2001). Existen dos causas principales que podrían contribuir a la disminución de la disponibilidad de NO. En primer lugar una reducción en la expresión génica de la enzima oxido nítrico sintasa endotelial (NOSe), en la expresión proteica o bien en la actividad enzimática. La segunda es un aumento en la inactivación del NO por el  $O_2^-$ . Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran niveles similares de expresión génica vascular de la NOSe tanto en WKY como en SHR. Sin embargo, se han descrito todas las combinaciones posibles (aumento, disminución o no modificación) para la expresión o actividad enzimática vascular de la NOSe en SHR respecto a las WKY (Alexander et al., 1999, Lou et al., 2001, Miyamoto et al., 1998, Moreno et al., 2002, Yoshiyama et al., 1999), lo que indicaría la compleja regulación de esta enzima, con distintos grados de activación según las condiciones experimentales. Por otro lado, se ha observado que en las SHR hay una mayor expresión génica de la p22phox lo que podría reflejar un aumento del  $O_2^-$  producido, en su mayor parte, por la enzima vascular oxidasa de nicotinamín adenín dinucleótido / fosfato de nicotinamín adenín dinucleótido (NADH/NADPH), tal y como se ha descrito en trabajos previos (Chen et al., 2004, Hamilton et al., 2001, Luscher, 1990, Miyamoto et al., 1998,

Nakazono et al., 1991, Zalba et al., 2001). Por tanto, en este caso, se podría sugerir que la reducción de la relajación dependiente de endotelio en las SHR, se debería a una menor biodisponibilidad de NO, pero no por una disminución en la expresión o una posible reducción de la actividad de la NOSe, sino por una mayor producción de  $O_2^-$  que inactivaría al NO degradándolo.

Alternativamente, existen otros mecanismos, como la capacidad de las células endoteliales para sintetizar y liberar factores vasoconstrictores, que va a contribuir al deterioro de la función endotelial. En este sentido, ensayos de función vascular SHR sugieren que la reducción en la respuesta vasodilatadora a Ach podría ser debida a la liberación de prostanoides con efecto vasoconstrictor que reducirían la respuesta del músculo liso a los factores relajantes derivados de endotelio. Si tenemos en cuenta los resultados, uno de los mecanismos posibles, implicados en la disminución de la relajación a Ach podría ser el aumento de los EDCF, tal y como se observa en SHR que presentan una mayor contracción endotelio dependiente a Ach+LNAME respecto de las WKY. Como consecuencia, el aumento de prostanoides vasoconstrictores va a favorecer el desarrollo y mantenimiento de la disfunción endotelial asociada a hipertensión en ratas.

Para comprobar que la disminución de la vasodilatación inducida por la Ach se debe a una disfunción endotelial, y no a una alteración de la respuesta del músculo liso al NO, se estudia la respuesta vasodilatadora inducida por un dador exógeno de NO como el NPS. Los resultados del trabajo muestran una respuesta similar SNP en los anillos aórticos de las SHR y de las WKY. Este resultado coincide con estudios previos en los que no se han observado cambios en la respuesta a nitrovasodilatadores en ratas hipertensas (Akiba et al., 1995, Nigro et al., 1989, Novosel et al., 1994, Tominaga et al., 1994, Wuorela et al., 1994). Por lo tanto, en las SHR, el aumento de los niveles de presión arterial afecta únicamente a la función endotelial.

Finalmente, la relajación inducida por el agonista de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, isoproterenol, es menor en los anillos aórticos de las ratas hipertensas respecto a las ratas normotensas, indicando una posible reducción en la respuesta mediada por los receptores  $\beta$ -AR en la aorta de SHR. En estudios previos de nuestro grupo, se han observado resultados similares en la arteria coronaria de SHR.

Los principales componentes que subyacen a la respuesta a isoproterenol son el NO y el EDHF, respectivamente (Vazquez-Perez et al., 2001). En trabajos de otros autores se observan los mismos resultados en arteria torácica mientras que en la aorta abdominal no observan diferencias en la relajación a isoproterenol (Cheng and Shibata, 1981). Recientemente se ha descrito que esta disminución de la respuesta a isoproterenol no se debe a una reducción de los siguientes factores: la expresión de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, las proteínas  $G_\alpha$ , la actividad AC o la proteína-quinasa, respectivamente. Sin embargo, se ha descrito que en aortas de ratas viejas, la disminución de la relajación mediada por los receptores  $\beta$  adrenérgicos podría estar provocada por una reducción en la expresión de la caveolina-1 y una reducción de la unión de GRK-2 (Proteína quinasa de los receptores acoplados a proteína G). La caveolina se encarga, entre otras funciones, del ensamblaje de los  $\beta$ -AR con la GRK y otras proteínas señalizadoras. Como resultado, se produce un incremento en la fracción libre de GRK-2 que podría fosforilar y por tanto, desensibilizar a los receptores  $\beta$  adrenérgicos. Sin embargo, a pesar de esta observación en estudios de envejecimiento, no existe ninguna evidencia sobre este mecanismo en aorta de SHR (Schutzer et al., 2005). Por tanto, se podría suponer que los niveles elevados de presión arterial disminuirían la respuesta  $\beta$  adrenérgica a través de una posible reducción de EDHF y NO.

## **1.2. CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN VASCULAR**

El tratamiento con candesartán reduce el área de la media, de la luz y el cociente área de la media / área del lumen en las aortas de las SHR; sin embargo, estos parámetros no se normalizaron. En este sentido, estudios realizados en pacientes con una hipertensión moderada, se ha demostrado que el tratamiento prolongado con ARA II corrige la estructura alterada de las arterias de resistencia (Bennai et al., 1999, Schiffrin et al., 2000). En concreto, la AII tiene una acción reguladora de crecimiento dual sobre las CMLV. Por un lado es capaz de inducir hipertrofia mientras que por otro lado puede inhibir la síntesis de ADN estimulada por mitógenos. Las acciones de la AII con un efecto hipertrófico sobre las CMLV están asociadas a una serie de señalizadores intracelulares entre los que destacan la tirosin quinasa, MAPK, PKC o la

activación de protooncogenes (Touyz y Schiffrin, 2000). La AII, a través de la unión de los receptores AT<sub>1</sub> activaría la PKC dependiente de fosfolipasas cuyo resultado sería la activación de factores de transcripción como el proto oncogen c-fos, que es un factor involucrado en la proliferación y crecimiento celular. Alternativamente, de puede activar la ruta de las JAK y de los factores de transcripción STAT (Horvath and Darnell, 1997), que generaría una expresión temprana de factores relacionados con el crecimiento. Este mecanismo se ha descrito como el mecanismo principal que subyace al remodelado vascular inducido por la hipertensión a través de la AII (Dostal et al., 1997). Adicionalmente, la AII es capaz de activar a las MAPK y factores de transcripción como c-fos, c-jun y c-myc, implicados en el crecimiento celular, apoptosis y diferenciación celular (Berk, 2000). Por otro lado, la AII induce un aumento de la expresión del TGFβ<sub>1</sub>, el PDGF, el bFGF o el EGF, a través al menos de manera parcial de la activación de ERK. Así, las proteínas ERK activadas, inducen un aumento de la actividad del factor de transcripción AP-1, responsable de la transcripción del TGFβ<sub>1</sub> entre otros factores (Gibbons et al., 1992, Hamaguchi et al., 1999). Por tanto, los mecanismos que subyacen a los efectos beneficiosos del bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> en cuanto a la estructura vascular en SHR, implicarían el bloqueo de las vías intracelulares mediadas por la AII anteriormente descritas.

Los resultados del trabajo indican que el tratamiento con antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> en SHR reduce de manera significativa tanto la expresión génica vascular del CTGF como su producción, así como el contenido vascular de colágeno respecto de las ratas SHR sin tratar. Por tanto, se podría considerar al CTGF como un mediador de la fibrosis vascular causada por la AII. El TGFβ<sub>1</sub>, como ya se ha mencionado, es un inductor de la expresión del CTGF, que regula los procesos de proliferación y apoptosis, migración y fibrosis de las CMLV. En ratas hipertensas por infusión con AII, se ha observado un aumento de la producción de CTGF, así como proteínas de la matriz extracelular tales como fibronectina, colágeno tipo 1 y laminina. Dicha inducción del CTGF en estas ratas se produce antes de la producción de matriz extracelular (Ruperez et al., 2003). En este sentido, al igual que los resultados, se ha descrito una reducción en la acumulación de colágeno en las aortas de las SHR tratadas con un ARAII (Benetos et al., 1997). Asimismo, en arterias humanas con lesiones ateroscleróticas, se observaron niveles elevados de expresión del RNAm de CTGF y de

proteínas de matriz extracelular en las CMLV además de un proceso fibrótico (Oemar et al., 1997). Se ha descrito que la unión de la AII a los receptores AT<sub>1</sub> induce la activación de proteínas quinasas como la PKC, PKT y MAPK, que a través del factor de transcripción AP-1 regulará de manera parcial la síntesis de fibronectina en CMLV y en fibroblastos (Ruiz-Ortega y Egido, 1997, Tamura et al., 1998). Se han descrito otros mecanismos a través de los cuales se aumenta la producción de CTGF. En concreto, la activación de la NADPH oxidasa a través de AII (como se discutirá más adelante) genera una producción de ERO que están implicadas en la síntesis de CTGF. Estudios in vitro han demostrado que la administración de antioxidantes bloquean la producción de CTGF en CMLV (Ruperez, 2005). Todas estas modificaciones y alteraciones mediadas por la AII, favorecen el desarrollo de la aterosclerosis, siendo uno de los factores de riesgo los niveles elevados de presión arterial. La estimulación de la migración y proliferación de las células musculares lisas hacia la íntima, favorece tanto el proceso aterosclerótico como el cambio de fenotipo contráctil a sintético, lo que determina la producción de colágeno, elastina y proteoglicanos (Pratt y Dzau, 1993). Además de los factores esenciales para el desarrollo del remodelado vascular como el estrés hemodinámico, la AII, las ERO (como se describirá más adelante) junto con una disponibilidad de NO reducida (Abe y Berck, 1998, Kidd, 1997, Owens, 1987, Rosendorff, 1996), habría que tener en cuenta la importante participación del CTGF en el proceso fibrótico asociado a hipertensión.

Respecto a los experimentos de la función vascular, la respuesta contráctil inducida por KCl en anillos aórticos de las SHR tratadas con candesartán durante 10 semanas es mayor que en los animales no tratados y se normaliza con la de los animales normotensos. Este aumento de la contracción a KCl podría ser una consecuencia del efecto beneficioso de candesartán sobre la estructura vascular. Como se ha descrito anteriormente, el tratamiento con ARAII reduce el área de la media y de lumen así como del cociente media/lumen en las ratas SHR. Como resultado, se mejoraría la maquinaria contráctil de las CMLV de las SHR tratadas y por tanto presentarían una mayor respuesta a KCl con respecto de las ratas no tratadas. Sin embargo, estudios previos en SHR tratados con otros ARAII mostraron que la vasoconstricción inducida por KCl en anillos aórticos no se modificaba (Maeso et al., 1998) y dicho efecto era debido a que la concentración intracelular de calcio no se modificaba en las células musculares lisas (Ko et al., 1992). No obstante, y como se ha mencionado anteriormente

está bien establecido que la AII aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y se une a la calmodulina activando la kinasa de la cadena ligera de miosina, que la va a fosforilar y promover la contracción del músculo liso vascular (Dzau, 1986). Independientemente del mecanismo molecular, la normalización de la vasoconstricción inducida por KCl en estos animales se podría atribuir a que tienen una estructura vascular muy parecida a la de los animales normotensos.

La contracción dependiente de endotelio inducida por la Ach+LNAME en las ratas SHR tratadas con candesartán es menor que la de las ratas SHR no tratadas. Estudios funcionales en anillos de aorta y arteria coronaria, de ratas SHR tratadas con ARAII han descrito resultados similares en cuanto a la reducción en la contracción endotelio-dependiente, lo que sugiere la participación de la AII en la fisiopatología de la función vascular (Luscher y Vanhoutte, 1986, Vazquez-Perez et al., 2001). Este mismo efecto se ha descrito en arterias de resistencia de ratas SHR, donde el bloqueo de los receptores  $\text{AT}_1$  de AII anula la contracción dependiente de endotelio a la Ach (Li et al., 1998). Además, estudios en ratas con hipertensión inducida por la administración crónica de AII, muestran un incremento de la respuesta a Ach+LNAME en aorta (d'Uscio et al., 1997). Debido a que la AII es capaz de estimular la formación de  $\text{TXA}_2$  en las células endoteliales (Manabe et al., 1989, Wilcox y Welch, 1990), el bloqueo de los receptores  $\text{AT}_1$  puede reducir esta respuesta que depende de la producción de este factor. En base a esto, una disminución de la liberación de  $\text{TXA}_2$ , podría ser uno de los mecanismos que participan en esta reducción de la vasoconstricción a Ach+LNAME observada en SHR tratadas con candesartán, ya que se ha descrito que la inhibición crónica de las acciones de la AII disminuyen la liberación de  $\text{TXA}_2$  en las SHR (Auch-Schwelk et al., 1992, Koga et al., 1989, Luscher y Vanhoutte, 1986, Taddei y Vanhoutte, 1993). Otro mecanismo implicado en la reducción de la contracción a Ach+LNAME, podría ser la reducción de las cifras de PA en las SHR tratadas con candesartán. Está bien establecido que el estrés hemodinámico de la pared arterial es un estímulo para la liberación de  $\text{TXA}_2$  y  $\text{PGH}_2$ , por lo que la reducción de la presión arterial y por tanto el estrés hemodinámico, podría conducir a una disminución de la liberación de estos factores vasoconstrictores endoteliales y por consiguiente, una menor vasoconstricción a Ach+LNAME. Las alteraciones estructurales del endotelio que tienen lugar en la hipertensión, también podrían modificar su capacidad para sintetizar estos compuestos conduciendo a una estimulación de su producción, así las

acciones del tratamiento sobre la pared vascular como la reducción del área de la media también podrían estar participando en este efecto. Resumiendo, la disminución de la contracción dependiente de endotelio a Ach+LNAME en ratas hipertensas tratadas con candesartán, podría ser debido a varios mecanismos entre los que se encuentran la disminución de la PA, la mejora de la estructura vascular y/o la reducción de la liberación de TXA<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub>; en todos ellos juega un papel central la AII a través de los receptores AT<sub>1</sub>.

El bloqueo de los receptores tipo 1 de AII normaliza la contracción a FE en las SHR. Esta mejora podría ser en parte debida a los mecanismos mencionados previamente por la Ach+LNAME. Sin embargo, en la literatura hay una gran heterogeneidad de resultados respecto al tratamiento con ARAII y la respuesta a FE. Así por ejemplo, en estudios previos se ha descrito que el tratamiento crónico con ARAII en ratas hipertensas adultas, no modifica la vasoconstricción a FE en anillos de aorta (Rodrigo et al., 1997) o por el contrario, la reduce (Cachofeiro et al., 1996, Rodrigo et al., 1997). Esta diversidad de respuestas podría ser debido a una distinta expresión o distinta sensibilidad de los receptores alfa adrenérgicos hacia la fenilefrina en este modelo experimental de hipertensión multifactorial.

El tratamiento con candesartán en las ratas hipertensas normaliza la contracción a la AI; sin embargo la respuesta vasoconstrictora inducida por la AII no se modifica con el tratamiento. En cualquier caso, la incubación de los anillos con AI y AII produce una respuesta contráctil similar, lo que indicaría por un lado una posible reducción de la actividad de la ECA y por tanto una menor producción de AII endógena, o por otro lado una menor densidad de receptores AT<sub>1</sub>. Sin embargo, la contracción a AII tanto en SHR con tratamiento como en SHR sin tratar fue similar, lo que indicaría que no habría tal reducción de receptores AT<sub>1</sub>, y que probablemente el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> “*in vitro*” no es tan eficaz como “*in vivo*” y por eso la respuesta es similar. Además, el hecho de que esta vasoconstricción no se normalice, podría ser debido a que, mientras el antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> se administra “*in vivo*”, los experimentos de reactividad vascular se realizan “*in vitro*” y lo más probable es que al realizar los lavados de los anillos, las uniones entre el antagonista y el receptor se rompan y el fármaco quede libre. Es decir, que el bloqueo crónico con ARAII no se mantenga “*in vitro*”. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, hay autores que sugieren

que el bloqueo de los receptores  $AT_1$  podría afectar además a la actividad de la ECA, reduciendo así la producción de AII y minimizando sus efectos deletéreos. En este sentido, se ha observado una reducción de la actividad de la ECA en el pulmón y aorta en animales hipertensos por infusión de AII o por coartación aórtica tratados con un ARAII (Goetz and Holtz, 1999, Metsarinne et al., 1996).

Por otro lado, los resultados del estudio muestran una mayor relajación endotelio dependiente a la Ach en anillos de aorta de las ratas SHR tratadas con candesartán respecto de las SHR no tratadas. En este sentido, en trabajos previos en ratas se ha descrito que tanto la hipertensión como el envejecimiento van asociadas a una relajación a Ach disminuida que se corrige cuando se tratan las ratas viejas e hipertensas con antagonistas de los receptores de AII tipo 1 (Maeso et al., 1998, Rodrigo et al., 1997). El aumento en la disponibilidad del NO es el mecanismo principal sugerido para mejorar la disfunción endotelial con el tratamiento crónico con ARAII como se ha descrito en pacientes hipertensos y en diversos modelos de hipertensión (Bosc et al., 2001, Brosnan et al., 2002, Ghiadoni et al., 2000, Maeso et al., 1998, Rizzoni et al., 1998, Rodrigo et al., 1997, Schiffrin et al., 2000). Los resultados del estudio confirman esta idea ya que el bloqueo de los receptores  $AT_1$  en las SHR, aumenta la expresión vascular del ARNm de la NOSe. En estudios previos se ha demostrado que candesartán es capaz de estimular la expresión del ARNm y de la proteína de la NOSe en el ventrículo izquierdo de ratas normotensas, ratas hipertensas por infusión con AII, ratas Dahl sensibles a la sal, ratas hipertensas Goldblatt y ratas propensas a ictus SHR-SP (Bennai et al., 1999, Brosnan et al., 2002, Higashi et al., 2000, Kobayashi et al., 2001, Kobayashi et al., 2001, Olson et al., 1997). Por tanto, la disfunción endotelial hipertensiva estaría caracterizada por una reducción de la relajación a Ach debido principalmente a una posible disminución en la disponibilidad de NO como consecuencia de un aumento de los  $O_2^-$  tal y como se observa en las SHR. Además, la angiotensina II, el principal efector del SRA, jugaría un papel importante en el desarrollo de la disfunción vascular debido a que el bloqueo de los receptores  $AT_1$  previene tales complicaciones.

Otro mecanismo teóricamente implicado en la mejora de la función endotelial producida por candesartán podría ser la disminución de la contracción dependiente de endotelio. Esta sugerencia se basa en el hecho de que en estudios previos de

tratamientos con ARAII muestran una reducción en la contracción endotelio-dependiente en anillos de aorta y de arteria coronaria (Luscher and Vanhoutte 344-48; Vazquez-Perez et al. 539-45). Podría proponerse que la reducción de la contracción endotelio-dependiente producida por candesartán mejoraría la función endotelial ya que el tratamiento reduce la contracción a Ach en presencia del inhibidor de la NOSe, L-NAME en SHR.

El bloqueo crónico de los receptores AT<sub>1</sub> en las ratas SHR mejora la respuesta vasodilatadora a NPS respecto de las ratas SHR no tratadas. En la curva dosis-respuesta se observa un desplazamiento de la respuesta hacia la izquierda de la gráfica, lo que indica que el tratamiento con candesartán aunque no modifica la máxima respuesta a NPS, aumenta la sensibilidad. Una posible explicación de este resultado sería debido al efecto beneficioso de candesartán en la estructura del vaso observada en SHR, que podría mejorar la capacidad vasodilatadora de las CMLV (Owens, 1987, Rosendorff, 1996). Aún así hay una cierta discrepancia en los resultados, ya que en experimentos anteriores tanto de nuestro grupo de trabajo como en otros grupos, no existen diferencias entre las ratas hipertensas tratadas con un IECA, con un ARAII o con un antagonista de los receptores de aldosterona y las ratas hipertensas sin tratar (Cediel et al., 2003, las Heras et al., 1999, Maeso et al., 1998, Maeso et al., 2000, Rodrigo et al., 1997, Sanz-Rosa et al., 2005, Vazquez-Perez et al., 2001). Igualmente, en pacientes hipertensos tratados con candesartán también se observa una respuesta similar a SNP respecto de los hipertensos sin tratamiento antihipertensivo (Ghiadoni et al., 2000). Aunque no existe una explicación clara, se podría sugerir que el aumento de la sensibilidad a SNP en las SHR tratadas con candesartán podría ser debido bien al propio fármaco, o a un mayor efecto beneficioso experimentado con candesartán sobre la reducción del área de la media, anteriormente discutido.

La vasorelajación inducida por el agonista  $\beta$ -adrenérgico, isoproterenol, es mayor en los anillos aórticos de las ratas SHR tratadas con candesartán que en SHR no tratadas. Esta mejora en la vasorelajación corresponde tanto a una respuesta máxima superior como a una mayor sensibilidad a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Como se ha descrito en cardiomiocitos, los receptores AT<sub>1</sub> y los receptores  $\beta$ -AR, ambos receptores acoplados a proteína G, pueden formar heterodímeros y cuando se bloquean los

receptores AT<sub>1</sub> se puede inhibir la señalización a través de los receptores β-AR. Sin embargo, en la aorta no existe evidencia alguna de este mecanismo pero tal y como se observa en los resultados, podría existir alguna relación a la inversa entre ambos receptores en la aorta cuyo resultado fuese el de potenciar la respuesta a isoproterenol mientras se bloquean los receptores AT<sub>1</sub> (Barki-Harrington et al., 2003).

## **2. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub>**

### **2.1. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO**

Los resultados del estudio muestran que las SHR respecto de las WKY presentan un aumento en la expresión de la NADPH oxidasa vascular y de los niveles hepáticos de MDA; una reducción en la actividad de la GPx y un aumento de la GRed hepática, así como una disminución del GSH y un aumento del GSSG que se refleja en una disminución de la relación GSH/GSSG hepática. Estos resultados indican que la hipertensión está asociada a un aumento del estrés oxidativo y a una alteración del estado redox sistémico.

Las ratas SHR presentan una expresión vascular del ARNm de la p22phox mayor que las ratas normotensas, sugiriendo un aumento en la producción aórtica de aniones superóxido, siendo uno de los mecanismos que subyacen al aumento del estrés oxidativo. Como se comentó anteriormente, la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  en las SHR, aumenta la degradación del NO generándose peroxinitrito ( $\text{OONO}^\cdot$ ), que participa en la peroxidación lipídica, la nitrosación de proteínas, la alteración de los ácidos nucleicos y la disfunción endotelial (Munzel et al., 1997, Nakazono et al., 1991, Radi et al., 1991). Además, como se ha mencionado anteriormente, el aumento de la NAD(P)H oxidasa así como un aumento de la producción de los aniones superóxido contribuyen de manera importante a la inactivación del NO y al desarrollo de la disfunción endotelial en hipertensión (Munzel et al., 1999, Zalba et al., 2001).

Las ratas SHR presentan unos niveles hepáticos de MDA mayores que las WKY, lo que indicaría la estimulación de la peroxidación lipídica enzimática en SHR. Este

hecho respalda la idea del aumento de la producción de ERO así como un aumento en el estrés oxidativo asociada a hipertensión (Brosnan et al., 2002). En este sentido, hemos observado como en SHR y en ratas con hepatotoxicidad experimental los niveles plasmáticos de MDA son superiores a los de las ratas controles (Sanz-Rosa et al., 2005, Sodergren et al., 2001). El MDA también puede ser evaluado en plasma y aunque es menos sensible, los resultados que se obtienen son similares a los hepáticos. De hecho se ha propuesto al MDA como marcador biológico del daño oxidativo, ya que se encuentran niveles plasmáticos elevados en diferentes situaciones patológicas como Diabetes Mellitus, aterosclerosis, artritis reumatoide, fumadores o pacientes con VIH (Aghdassi y Allard, 2000, Requena et al., 1996). Una situación similar ha sido propuesta para los 8-isoprostanos como indicador de la peroxidación lipídica no enzimática, ya que como se observa en la hipertensión, la enfermedad renovascular, la aterosclerosis o la enfermedad arterial coronaria, hay un aumento de los niveles plasmáticos de 8-isoprostanos (Minuz et al., 2002, Vassalle et al., 2003). Además, en ratas hipertensas por infusión de AII y en un modelo de rata dependiente de AII como es la rata con un clip en la arteria renal (2K,1C), se muestran niveles plasmáticos elevados de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> respecto a los controles respectivos (Chabrashvili et al., 2003, Welch et al., 2003). Sin embargo, los resultados no muestran diferencias entre los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> plasmáticos de las ratas normotensas e hipertensas. En este sentido, se muestran cifras similares de los 8-isoprostanos plasmáticos en pacientes diabéticos e hipertensos (Sato et al., 2003). Además, se ha descrito que los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> plasmáticos tampoco se modifican tras la administración de antioxidantes como la vitamina E (Sodergren et al., 2001, Souvignet et al., 2000). Estos resultados sugieren que la peroxidación lipídica no enzimática, no está asociada a un aumento de los valores de presión arterial en ratas, incluso en una situación donde se observa un aumento del estrés oxidativo. Por consiguiente, los resultados indican que, bajo estas condiciones experimentales, únicamente los niveles hepáticos y plasmáticos de MDA parecen ser buenos marcadores del estrés oxidativo en ratas, mientras que los niveles de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> plasmáticos no parecen serlo debido a la heterogeneidad de los resultados.

El aumento de la expresión de la NADPH oxidasa así como una mayor concentración de MDA hepático en las SHR confirma el aumento del estrés oxidativo y la alteración del estado redox sistémico. De hecho, las ratas SHR muestran una

actividad de la glutathion peroxidasa hepática reducida, indicando que la hipertensión se asocia no sólo a un incremento en la producción vascular del anión superóxido (tal y como se ha descrito y que más adelante se discutirá), sino con una defensa antioxidante hepática deteriorada que podría estar reflejada en un aumento del estrés oxidativo sistémico (Carbonell et al., 2000, Suzuki et al., 2000). En efecto, la actividad reducida de la GPx hepática de las ratas SHR podría ser la responsable directa del aumento de la disponibilidad de especies reactivas de oxígeno ya que esta enzima cataliza la transformación de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y los lipoperóxidos a sus correspondientes alcoholes (Halliwell and Gutteridge, 1995, Yu, 1994). En trabajos previos se ha demostrado que una actividad GPx hepática deficiente es un agravante para la disfunción endotelial en ratones con hiperhomocisteinemia y por tanto podría sentar las bases del desarrollo de la disfunción endotelial a través de un posible mecanismo oxidativo dependiente de peróxidos (Dayal et al., 2002). Se ha descrito, tanto en modelos de hipertensión como en pacientes humanos, una actividad de la GPx reducida, además de otras enzimas involucradas en el metabolismo de los radicales libres como la superóxido dismutasa y la catalasa, respectivamente (Bobillier-Chaumont et al., 2003, Cediél et al., 2003, Fadillioglu et al., 2002, Kitts et al., 1998, Redon et al., 2003, Ulker et al., 2003). Estos resultados indicarían que hay una degradación menor de las ERO que podría participar en el estrés oxidativo asociado a hipertensión. Por el contrario, las ratas espontáneamente hipertensas presentan un aumento de la enzima GRed hepática respecto de las ratas normotensas. En estudios anteriores se han observado resultados similares a los de este trabajo, y por tanto se podría sugerir que este aumento de la actividad de la GRed podría deberse a un efecto compensador del exceso de glutathion oxidado (GSSG) en las SHR (Kitts et al., 1998).

Los resultados muestran además, que las ratas SHR presentan una disminución en el cociente entre el glutathion reducido y oxidado GSH/GSSG respecto de las ratas normotensas, y unos valores de GSH menores y de GSSG mayores que los de las ratas normotensas, sugiriendo que el estado redox hepático o la maquinaria que regula el estrés oxidativo hepático está más activo en las ratas hipertensas que en las normotensas. Estudios previos en diferentes modelos de hipertensión así como en pacientes hipertensos han mostrado resultados similares (Bayorh et al., 2003, Cediél et al., 2003, Redon et al., 2003). El GSH se considera, como ya hemos comentado

previamente, el agente antioxidante sistémico más importante. Su producción es prácticamente hepática pero se exporta al torrente sanguíneo donde actúa como el principal agente antioxidante endógeno (Halliwell and Gutteridge, 1995, Kaplowitz et al., 1985, Kidd, 1997, Yu, 1994). El GSH es capaz de reducir los peróxidos, debido a que actúa como sustrato de la GPx. Como resultado, es oxidado a GSSG, el cual vuelve a reducirse a GSH por la acción de la Gred. De ahí que el principal regulador del estado redox celular sea el glutatión. Además, de la reducción hepática de GSH, se ha descrito que en SHR, la cantidad de GSH producido por las CMLV, es menor respecto de las WKY, lo que indicaría una reducción en la defensa antioxidante vascular asociada a hipertensión (Hector y Pena, 2005, Wu y Juurlink, 2001). Por tanto, un menor contenido en el glutatión reducido hepático en SHR podría contribuir al aumento en el estrés oxidativo local y sistémico y por consiguiente, una menor disponibilidad de NO y la aparición de disfunción endotelial.

Estos resultados sugieren, tal y como se ha indicado en distintas situaciones patológicas experimentales, que las alteraciones en el sistema redox hepático así como la consiguiente disminución de la defensa antioxidante como refleja el cociente GSH/GSSG podría contribuir al aumento del estrés oxidativo sistémico el cual podría alterar la disponibilidad del NO endotelial (Demling et al., 1994, Fava et al., 2002, Kidd, 1997, Pinzani y Marra, 2001, Tsukahara et al., 2000).

## **2.2. CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO**

Los resultados del estudio la tesis muestran que el tratamiento con candesartán en ratas SHR reduce la expresión vascular de la NADPH oxidasa y la producción de MDA, aumenta la relación GSH/GSSG, disminuye el Glutatión oxidado y aumenta el glutatión reducido respecto de las ratas SHR sin tratar. Esta situación, producida por el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> podría contribuir al control sistémico y local del estrés oxidativo y por consiguiente al aumento de la disponibilidad de NO y a la mejora de la disfunción endotelial observada en las SHR.

La expresión vascular del ARNm de p22phox es menor en las ratas SHR tratadas con candesartán respecto de las SHR sin tratar. En ratas hipertensas por infusión con AII, se ha observado un aumento de la expresión de la p22phox y un aumento de la actividad de la NADPH oxidasa que era revertido en ratas tratadas con un antagonista de los receptores de AT<sub>1</sub> (Fukui et al., 1997, Rajagopalan et al., 1996). De hecho, se ha descrito que la AII a través de sus receptores AT<sub>1</sub>, activa la NADPH oxidasa en CMLV y en endotelio (Griendling et al., 1994, Pagano et al., 1998, Ushio-Fukai et al., 1996). La NADPH oxidasa se considera como la principal fuente de 'O<sub>2</sub><sup>-</sup> en los vasos (Munzel et al., 1999, Zalba et al., 2001), por tanto se podría pensar que candesartán reduciría la disponibilidad aórtica de 'O<sub>2</sub><sup>-</sup> a través de la reducción de la expresión de p22phox vascular. De esta manera, la mejora de la disfunción endotelial descrita en las SHR tratadas con candesartán, podría estar mediada, al menos en parte, por la reducción de la producción 'O<sub>2</sub><sup>-</sup> vascular y por tanto por una mayor biodisponibilidad de NO (Brosnan et al., 2002, Zalba et al., 2001). El mecanismo que subyace a este proceso estaría mediado por la AII a través de los receptores AT<sub>1</sub>. Adicionalmente, la mejora de la función endotelial podría ser debido a la mejora de la estructura vascular ocasionada por la reducción de los productos derivados de la NADPH oxidasa como el 'O<sub>2</sub><sup>-</sup> o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se ha descrito que la AII, a través del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce un efecto hipertrófico en las CMLV en el que estarían implicadas las rutas intracelulares de las MAPK (p38, ERK 1 y 2, JNK) o las JAK/STAT (Frank et al., 2000, Schieffer et al., 2000, Viedt et al., 2000). Por tanto se podría asignar un papel fisiopatológico a la AII a través de los receptores AT<sub>1</sub> induciría la síntesis de ERO y alteraría la estructura y función vascular y como veremos más adelante, induciría la síntesis de parámetros inflamatorios.

El tratamiento con candesartán en SHR reduce los niveles hepáticos de MDA lo que refleja una disminución en la peroxidación lipídica enzimática. En este sentido, se ha descrito que en pacientes hipertensos tratados con candesartán durante 12 semanas a dosis baja redujo la producción de MDA en monocitos (Sato et al., 2003). Por otro lado, en ratas hipertensas mediante infusión con AII o bien la rata con un clip en la arteria renal (2K,1C) que es un modelo dependiente de AII, se ha observado que los niveles plasmáticos de MDA se reducen con el tratamiento con candesartán (Chabrashvili et al., 2003, Welch et al., 2003). Estos resultados sugieren que en hipertensión la AII, a través de los receptores AT<sub>1</sub> induce un aumento de aniones superóxido que van a provocar el aumento de la peroxidación lipídica enzimática asociado a hipertensión. Por el

contrario, los valores plasmáticos de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> no variaron en las SHR tratadas con candesartán respecto a sus controles, indicando que en este modelo experimental, dicho marcador no es de utilidad para evaluar la peroxidación lipídica. Sin embargo, existe en la literatura resultados similares y opuestos al obtenido en este trabajo. Así en ratas hipertensas por infusión de AII tratadas con candesartán, presentan unos niveles plasmáticos de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> reducidos respecto a las SHR sin tratar. Por el contrario, ni en pacientes diabéticos, ni en hipertensos, el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> fue capaz de reducir los niveles plasmáticos de 8-isoprostanos (Sato et al., 2003). Esto podría deberse a que los niveles plasmáticos de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> no refleja lo que sucede a nivel tisular, donde los niveles podrían estar modificados.

El bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> no modifica la actividad enzimática ni de la GRed, ni de la GPx en las SHR, lo que sugiere que los cambios producidos por la hipertensión sobre estas enzimas, son en parte, independientes de AII. Pero si analizamos los resultados obtenidos por otros grupos observamos una gran heterogeneidad en los mismos. Así, el tratamiento con un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> en ratas SHR aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes GPx, catalasa y SOD en hígado, riñón y cerebro (Hector y Pena, 2005), mientras que en los corazones de ratas normotensas con tratamiento crónico de ARAII e IECA no se han descrito cambios en la actividad enzimática de la SOD, GPx y catalasa, respectivamente (Costa et al., 2002). Una situación similar se ha descrito en ratas con insuficiencia renal, en la que ni candesartán ni enalapril modificaron las actividades de la GPx, la SOD y la catalasa (Sugimoto et al., 1999). Por tanto, se podría sugerir que, bajo estas condiciones experimentales, el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> en las SHR no parece estar implicado en la estimulación de enzimas antioxidantes, aunque desempeñe un papel protector en el estrés oxidativo a través de la reducción de la NADPH oxidasa.

Las SHR tratadas con candesartán tienen unos niveles hepáticos de GSH mayores y unos niveles hepáticos de GSSG son menores respecto de las SHR sin tratar. Esta normalización de los niveles hepáticos de glutathion va a reflejarse en un aumento de la relación GSH/GSSG, indicando que el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> en SHR mejora el estado redox hepático aumentando la defensa antioxidante. Resultados similares se han observado en trabajos de otros grupos, donde han estudiado el estado

redox hepático en SHR tratadas con un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> encontrando un aumento de los niveles de GSH respecto de las SHR sin tratar (Hector y Pena, 2005). A parte la restauración de la defensa antioxidante, un aumento de los niveles de GSH inducen una mejoría en la función endotelial; en este sentido, se ha demostrado que la infusión de GSH en la arteria coronaria humana mejoró la respuesta a Ach (Kugiyama et al., 1998).

Por tanto, los resultados del estudio permiten asignar un papel fisiopatológico a la AII en relación a las alteraciones oxidativas asociadas con la hipertensión no sólo a nivel vascular sino sobre la defensa hepática antioxidante. Asimismo, se podría considerar la hipótesis de que los efectos de candesartán sobre el estrés oxidativo se deben a dos mecanismos que actúan en la misma dirección. El primero, la reducción de la p22phox en aorta y por consiguiente la reducción de la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  y una reducción hepática de los niveles de MDA, y el segundo, un efecto sobre la defensa antioxidante hepática como demuestra el aumento de la relación GSH/GSSG. Estos mecanismos inducen un aumento de la defensa hepática antioxidante y una disminución del proceso oxidativo sistémico y vascular como efectos beneficiosos del tratamiento con candesartán.

Resumiendo, los resultados sugieren que la hipertensión no está asociada únicamente a una elevación del estrés oxidativo vascular, sino también con alteraciones en el sistema redox hepático, donde la angiotensina II está claramente involucrada. Si consideramos la importancia que tiene el hígado como órgano regulador del balance redox sistémico y de la importancia del GSH hepático, se podría considerar que la mejora del estado antioxidante hepático, junto con la reducción de la expresión vascular de p22phox producida por candesartán en las SHR, podría contribuir a mejorar la función endotelial en estas ratas. Los resultados también demuestran el papel regulador de la AII a través de los receptores tipo 1 sobre las alteraciones del estatus redox.

### **3. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA INFLAMACIÓN: CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub>**

#### **3.1. EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN SOBRE LA INFLAMACIÓN**

Los resultados del estudio muestran un aumento de la expresión de citoquinas (IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) en la aorta de las ratas espontáneamente hipertensas lo que sugiere la presencia de un proceso inflamatorio en la pared vascular. El aumento de la expresión génica de estas citoquinas vasculares, se acompaña de una elevación de los niveles plasmáticos de la IL-6 y la IL-1 $\beta$ . Además este proceso inflamatorio parece estar mediado por un aumento de la expresión del NF $\kappa$ -B y una reducción de la de su inhibidor I $\kappa$ -B.

Los niveles de presión arterial se asocian con un aumento de la expresión del RNAm de los marcadores inflamatorios IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en la aorta de las SHR. Se ha observado con anterioridad un aumento de otros marcadores de inflamación como ICAM, VCAM, MCP-1 e IL-6 en los vasos de las ratas hipertensas (Gonzalez et al., 2000, Haller et al., 1997, Luvara et al., 1998, Tummala et al., 1999). Por tanto, se sugiere que la hipertensión puede inducir un proceso inflamatorio en la pared vascular en ratas que contribuiría de manera importante en la progresión del daño vascular asociado a hipertensión y que podría desencadenar el desarrollo aterosclerótico (Blake Ridker, 2001).

El aumento de la expresión génica de estas citoquinas vasculares, se acompaña de una elevación de los niveles plasmáticos de la IL-6 y la IL-1 $\beta$ , indicando que las concentraciones plasmáticas de estas interleuquinas, al menos en estas condiciones experimentales, son un reflejo de la producción vascular. Así, se podría proponer que los niveles plasmáticos de IL-6 e IL-1 $\beta$  podrían ser utilizados como marcadores de la producción vascular de estas citoquinas en las SHR. Por el contrario, este no parece ser el caso de los niveles plasmáticos del TNF- $\alpha$ , que no son un reflejo de la elevada expresión génica vascular en las SHR. Esta divergencia entre los niveles plasmáticos y vasculares del TNF- $\alpha$  podría ser debida a los diferentes orígenes de los niveles circulantes, ya que, a parte de la pared vascular, puede estar producido por una gran

variedad de fuentes extravasculares (Ahima y Flier, 2000). Igualmente, no se encontraron diferencias en la concentración plasmática del TNF- $\alpha$  entre pacientes con hipertensión esencial y sujetos normotensos (Burger y Dayer, 2002, Peeters et al., 2001), sugiriendo que la hipertensión no se asocia a cambios en los niveles circulantes de TNF- $\alpha$ . El aumento de los niveles plasmáticos de IL-6 y de IL-1 $\beta$  en las SHR respecto a las WKY, indica la correlación positiva entre estos marcadores de inflamación y los niveles de presión arterial. Además, al introducir el grupo de SHR tratadas con candesartán en el estudio de correlación bivariada (que se discutirá más adelante), el valor correspondiente al coeficiente de correlación aumenta con respecto al estudio realizado únicamente con el grupo de las WKY y de las SHR. El hecho de que aumente la correlación es lógico teniendo en cuenta el paralelismo existente entre los datos de la PAS y los de las citoquinas de todos los grupos, ya que cuando la PAS aumenta, la concentración plasmática de IL-1 $\beta$  e IL-6 también aumenta y viceversa. En este sentido, se ha descrito que en pacientes hipertensos también se ha observado un aumento de estas citoquinas plasmáticas (Chae et al., 2001, Dalekos et al., 1996, Dalekos et al., 1997, Fernandez-Real et al., 2001), lo que sugiere que la hipertensión se asocia a un proceso inflamatorio sistémico y local a nivel vascular

Los mecanismos que subyacen a la estimulación de los mediadores inflamatorios no están bien consensuados, aunque los cambios en las fuerzas hemodinámicas así como los factores humorales producidos por la hipertensión, podrían participar en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, cuando existe una situación de disfunción endotelial, la pared vascular promueve como hemos visto, la proliferación de CMLV, depósito de matriz extracelular, oxidación de lipoproteínas, activación de plaquetas, proceso inflamatorio y formación de trombo (Liao, 1998). A través de estos procesos, la disfunción endotelial favorece las complicaciones cardiovasculares de la hipertensión. Pero hay que decir que este proceso es recíproco y que la disfunción vascular no sólo favorece el proceso inflamatorio, sino que la respuesta inflamatoria está asociada a alteraciones funcionales del endotelio. Así, se ha observado que la infusión por vía intravenosa aguda de TNF- $\alpha$  en ratas reducía la respuesta a Ach en anillos de aorta, indicando que el proceso inflamatorio agudo modifica la función endotelial (Wang et al., 1994). En estudios clínicos también se ha observado una situación similar, ya que la infusión aguda en una vena superficial de la mano de pacientes sanos, tanto de TNF- $\alpha$

como de IL-1, produce una respuesta inflamatoria aguda local que se asocia a una alteración de la relajación dependiente de endotelio inducida por bradiquinina. Dicha alteración se mantuvo por más tiempo al infundir ambas citoquinas a la vez (Bhagat y Vallance, 1997). Esta reciprocidad entre proceso inflamatorio y disfunción endotelial, podría aparecer también entre inflamación e hipertensión. La hipertensión se asocia a un proceso inflamatorio y los resultados del estudio lo confirman, pero ¿podría ocurrir el proceso inverso? Existen indicios de que la inflamación podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la hipertensión, tal y como se demuestra en varios estudios clínicos. En un subestudio del Physician's Health Study realizado en hombres aparentemente sanos, se observó una asociación gradual entre los niveles de PAS, PAM, PAD y presión de pulso con los niveles circulantes de IL-6 e ICAM-1 (Chae et al., 2001). En el Women's Health Study realizado en mujeres postmenopáusicas con niveles normales de PA se observó que los niveles de PCR plasmática se asociaban a un mayor riesgo de desarrollar hipertensión, ya que después de 7 años de seguimiento los niveles de PCR al inicio del estudio, eran mayores en las mujeres que desarrollaron hipertensión que en las que no la desarrollaron (Sesso et al., 2003).

Sin embargo, en los resultados del estudio no se ha observado ninguna diferencia en los valores plasmáticos de PCR entre las SHR y las WKY. Por tanto, se podría pensar que en rata, este parámetro no sería un buen marcador del proceso inflamatorio. Por el contrario, en estudios clínicos está bien establecido que los niveles de proteína C reactiva no sólo es un buen marcador sino que además es predictor de eventos cardiovasculares tal y como ha sido demostrado en numerosos estudios. En cuanto al IFN- $\gamma$ , citoquina producida principalmente por los macrófagos, tampoco se han encontrado diferencias entre SHR y WKY. Se ha descrito que el IFN- $\gamma$ , al igual que MCSF para granulocitos o el TNF- $\alpha$ , participan en la activación de los macrófagos que juegan un papel importante en la iniciación, mantenimiento y desarrollo del proceso inflamatorio (Fujiwara y Kobayashi, 2005). Sin embargo, pese a que la hipertensión está asociada como se ha descrito, a un proceso inflamatorio, no se han observado diferencias en este parámetro valorado en plasma, lo que podría sugerir que el IFN- $\gamma$  actuaría principalmente de manera local y no a nivel sistémico. En cualquier caso, este parámetro tampoco sería útil como marcador del proceso inflamatorio asociado a la hipertensión en estas condiciones experimentales.

El factor de transcripción NFκB y su inhibidor, juegan un papel central en la respuesta inflamatoria ya que estimula numerosos mediadores de inflamación así como otros factores implicados en la progresión y complicaciones de la aterosclerosis como metaloproteinasas y PAI-1 (Kutuk y Basaga, 2003, Monaco y Paleolog, 2004, Newby, 2005, Saklatvala et al., 2003). Numerosos estudios han demostrado la participación del NFκB en el proceso inflamatorio cardiaco, renal y vascular presente en diversos modelos de hipertensión no genética a través de su capacidad de activar gran cantidad de genes pro-inflamatorios (Gonzalez et al., 2000, Muller et al., 2000, Phillips and Kagiya, 2002). Los resultados del trabajo muestran que en ratas hipertensas existe un aumento de mediadores inflamatorios asociado a una mayor expresión génica vascular del p105 (precursor de la subunidad p50 del NFκB) respecto a las ratas normotensas. Además, las SHR tienen una menor expresión del IκB, que inhibe la traslación del NFκB hacia el núcleo y por tanto su activación. Por tanto, la hipertensión en las ratas, estimula el proceso inflamatorio circulante y vascular afectando a los dos componentes del sistema NFκB/IκB. Estos resultados y otros previos apoyarían el papel central de las citoquinas y el sistema NFκB/IκB en las alteraciones vasculares asociadas a hipertensión (Fiebeler et al., 2001, Gonzalez et al., 2000, Muller et al., 2000, Sanz-Rosa et al., 2005, Tummala et al., 1999). Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, la hipertensión está asociada a un aumento del estrés oxidativo que podría participar en la activación del sistema NFκB/IκB, ya que las especies reactivas de oxígeno a través de la ruta de las proteínas tirosínquinasas como las Src y posteriormente las rutas de las treonínquinasas PKA, PKC y la de Ha-Ras y Raf-1 inducen la activación del NFκB (Cascales, 1999) y por tanto la activación transcripcional de múltiples genes incluyendo los relacionados con la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, los cambios en la expresión del sistema NFκB/IκB observados en las ratas SHR, podrían ser los responsables del aumento de la expresión génica de las interleuquinas vasculares IL-6, IL-1β y TNF-α, debido al aumento de los niveles vasculares del NFκB y la disminución de la expresión vascular del IκB, y que determinaría una mayor activación del sistema.

### 3.2. CONSECUENCIAS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES AT<sub>1</sub> SOBRE LA INFLAMACIÓN

El tratamiento con candesartán en las ratas SHR reduce la concentración plasmática de las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-6. Asimismo, disminuye la expresión vascular de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . Esta disminución va acompañada de una reducción en la expresión del ARNm del NF $\kappa$ B así como un aumento en la expresión de su inhibidor I $\kappa$ B.

Los resultados del estudio muestran que el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> en SHR redujo la expresión vascular de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . Por consiguiente, se podría sugerir que la AII, a través de los receptores AT<sub>1</sub>, participaría en el proceso inflamatorio vascular asociado a hipertensión en SHR. Estudios en biopsias de ventrículo izquierdo de pacientes con angina inestable, sometidos a cirugía cardiovascular y previamente tratados con un ARAII, han demostrado que el bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> reduce la expresión génica de IL-6 y TNF- $\alpha$ , respectivamente. Lo que sugiere que la AII estaría implicada en la regulación de la producción de algunas citoquinas inflamatorias asociadas a la hipertensión y aterosclerosis (Neri Serneri et al., 2004). La AII se considera como un agente proinflamatorio ya que promueve la activación de distintos factores de transcripción que modulan algunos mediadores inflamatorios (Han et al., 1999, Luvara et al., 1998, Muller et al., 2000, Tummala et al., 1999). La participación de la angiotensina II en el proceso inflamatorio asociado a hipertensión ha sido confirmado en distintos estudios clínicos y experimentales (Brasier et al., 2002, Phillips y Kagiyama, 2002). En este sentido, se ha observado una reducción de la concentración plasmática de la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 y la molécula de adhesión a células vasculares tipo 1 en pacientes hipertensos tratados con ARAII. Dicho efecto no se produce con los diuréticos, a pesar de que reducen los niveles de presión arterial (Rahman et al., 2002). De manera similar, el tratamiento con inhibidores de la ECA o ARAII en ratas hipertensas por LNAME, reducen la expresión vascular de IL-6, MCP-1, MCSF, ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente (Gonzalez et al., 2000, Luvara et al., 1998).

Se ha descrito que en los procesos inflamatorios se activan varias vías de señalización intracelular como la de las JNK así como transductores de señal y

activadores transcripcionales como las STAT. Como ya se ha mencionado, el  $\text{O}_2^-$  es capaz de activar esta ruta de señalización y según los resultados del estudio, la AII estimula la producción de  $\text{O}_2^-$  a través del sistema NADPH oxidasa. A su vez, la AII activa la ruta de las JNK/STAT a través de los receptores  $\text{AT}_1$  e induce la síntesis y liberación de IL-6. Estudios en CMLV de rata se ha observado que la activación de esta ruta a través de AII, requiere la presencia de  $\text{O}_2^-$  generados por la NADPH oxidasa, que activarían la ruta de las JNK/STAT que está involucrada en la síntesis de IL-6 inducida por AII. Por tanto, los efectos inflamatorios inducidos por la AII son dependientes de  $\text{O}_2^-$  (Schieffer et al., 2000). Estudios previos han demostrado que el NF $\kappa$ B también está involucrado en la transcripción de la IL-6 in vitro a través de la AII y que los sitios de unión a ADN con las STAT, se localizan junto a otros sitios de unión para otros factores de transcripción. Por tanto sería posible que no uno sólo, sino la combinación de varios factores de transcripción regularan la síntesis y por tanto la expresión génica de la IL-6 inducida por la AII (Han et al., 1999). Respecto a la IL-1 $\beta$ , se ha descrito que podría estar mediada por varios factores de transcripción como el C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein), AP-1 y el NF $\kappa$ B. En cualquier caso las citoquinas inflamatorias como la IL-6, el IL-1 $\beta$  o el TNF- $\alpha$ , van a inducir la activación de las JNK y p38 a través de las MEKK y las MAPK. Como resultado, la respuesta inflamatoria se va a amplificar al estar aumentada por las propias citoquinas, los  $\text{O}_2^-$  y la AII (Hagemann y Blank, 2001). Así, quedaría establecida la importancia de la AII en la regulación del proceso inflamatorio sistémico y vascular asociado a hipertensión, factor de riesgo primario para el desarrollo de la aterosclerosis que se considera un proceso inflamatorio crónico. En este proceso, la AII favorece su progresión mediante la atracción de monocitos aumentando la expresión de moléculas quimiotácticas como la MCP-1 (Hayek et al., 1999, Williams et al., 1995). Además, favorece la adhesión de leucocitos al endotelio al inducir la expresión de moléculas de adhesión como la selectina P, ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales. En cuanto a la acción de la AII sobre los macrófagos, se ha observado que estimula la diferenciación de los monocitos a macrófagos y aumenta la expresión de receptores para las LDL oxidadas (receptores basurero o scavenger), CD36 y LOX-1, facilitando la formación de las células espumosas, siendo éste un mecanismo importante en el rápido desarrollo de la aterosclerosis en pacientes hipertensos (Keidar et al., 1995).

El hecho de que la disminución de la PAS inducida por el tratamiento con candesartán en SHR, vaya acompañada de una reducción de las concentraciones plasmáticas de IL-1 $\beta$  e IL-6, así como de una disminución en la expresión vascular de las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , respecto de las SHR sin tratar, podría ser debida, en parte, a una reducción del estrés mecánico. De todas maneras, merece la pena resaltar que candesartán casi normaliza los mediadores inflamatorios mientras que los niveles de presión arterial permanecen aún 35 mm de Hg. por encima de los valores de las ratas normotensas sugiriendo, como ya se ha mencionado, la participación de la AII en el proceso inflamatorio vascular asociado a HTA. Además, en un estudio realizado por nuestro grupo se ha observado que la reducción de los niveles de presión arterial en SHR tratadas con una triple terapia compuesta por hidralazina, hidroclorotiazida y reserpina HHR, se asocia a una reducción en los parámetros inflamatorios. Sin embargo, aunque este tratamiento alcanza una disminución de los niveles de PAS similar al tratamiento con candesartán, el tratamiento con HHR disminuye ligeramente la concentración plasmática de IL-1 $\beta$  e IL-6 así como la expresión vascular de estas interleuquinas (Sanz-Rosa et al., 2005). Por tanto, no sólo el aumento del estrés hemodinámico producido por la hipertensión sino también la activación del sistema renina angiotensina, son mecanismos que participarían en el proceso inflamatorio vascular asociado a hipertensión en SHR.

Las ratas SHR tratadas con candesartán, además de presentar una reducción de las citoquinas inflamatorias, muestran una reducción en la expresión vascular del p105, precursor de la subunidad p50 del NF $\kappa$ B, y un aumento en los niveles de ARNm del I $\kappa$ B. Por tanto, se podría sugerir que la AII podría estimular mediadores inflamatorios en las ratas hipertensas activando el sistema NF $\kappa$ B, aumentando su expresión génica y reduciendo la de su inhibidor. El I $\kappa$ B, como ya se ha descrito, secuestra al NF $\kappa$ B en el citoplasma inhibiendo su translocación al núcleo y por tanto inhibiendo su actividad. Diversos estudios han demostrado que el NF $\kappa$ B regula también la acción proinflamatoria de la AII en otros modelos de hipertensión en ratas. En este sentido, se ha demostrado que el tratamiento con IECA reduce la expresión de diversos mediadores inflamatorios en la aorta de ratas hipertensas inducida por la inhibición de la NOS con LNAME. Esta reducción se acompaña de una menor actividad del NF $\kappa$ B (Bosc et al., 2001). En el apartado anterior se ha mencionado que el aumento del estrés oxidativo

asociado a hipertensión, podría activar el sistema NFκB/IκB. Aunque nuestros resultados no pueden confirmar la participación del  $\text{O}_2^-$  vascular, se podría sugerir que el aumento de los  $\text{O}_2^-$ , inducido por la AII, estaría implicado en la activación del NFκB. Asimismo, la mejora del proceso inflamatorio renal y vascular se consigue con la inhibición del NFκB en las ratas hipertensas por infusión de angiotensina II (Muller et al., 2000). Anteriormente se ha descrito que la AII induce la producción vascular de MCP-1 y favorece la adhesión de leucocitos al endotelio al inducir la expresión de moléculas de adhesión como la selectina P, ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales. Se ha observado en monocitos humanos tratados con un antagonista de los receptores  $\text{AT}_1$ , que estos efectos estarían mediados por la activación del NFκB y por una disminución del inhibidor de este (Kranzhofer et al., 1999). Finalmente, hay que indicar que aparte del sistema NFκB / IκB, otros factores de transcripción podrían estar implicado en la acción antiinflamatoria de candesartán debido a que la casi normalización de los mediadores inflamatorios fue acompañada solo por una mejora parcial en los cambios de expresión del sistema NFκB / IκB inducidos por la hipertensión.

Analizando los mecanismos por los cuales la AII induce la expresión de los genes inflamatorios, se puede observar que la AII comparte entre otras, la ruta de señalización típica inducida por citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  (Brasier et al., 2000, Li y Brasier, 1996) a través de la activación del sistema NFκB / IκB que va a controlar la expresión de una amplia gama de citoquinas, factores de crecimiento y genes de supervivencia celular, como hemos mencionado anteriormente. La AII tiene acciones pleiotrópicas en múltiples puntos de la ruta de activación del NFκB en las CMLV. Es decir, la AII no sólo induce la translocación del NFκB secuestrado en el citoplasma hacia el núcleo, o induce la proteólisis del protooncogen c-Rel, sino que como vemos en los resultados del estudio induce la expresión del propio NFκB y reduce la expresión del IκB. También se ha observado que la activación del NFκB parece estar en un nivel inferior respecto de la activación de la NADPH oxidasa, ya que se ha descrito que los tratamientos antioxidantes interfieren en su activación a través de la AII. En múltiples estudios se ha observado que al inhibir la actividad del NFκB a través de fármacos que bloquean a distintos niveles el SRA, se inhibe la expresión de VCAM-1, MCP-1 o la IL-6 inducida por AII (Han et al., 1999, Hernandez-Presa et al.,

1997, Tummala et al., 1999), lo que demuestra la gran importancia que presenta el NFκB como modulador final de las rutas de señalización de citoquinas inducidas por la acción de la AII. Además el NFκB puede ser inducido por los efectos de la peroxidación lipídica, agentes infecciosos o citoquinas como la IL-1β o el TNF-α. Como se ha descrito, tanto la hipertensión como la AII son activadores del sistema NFκB/IκB que va a inducir el proceso de inflamación en el vaso, la adhesión celular y finalmente la progresión del proceso aterosclerótico. Por tanto, se podría concluir que la hipertensión es un factor de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis cuyo puente de unión sería el sistema NFκB/IκB.

Resumiendo, los resultados muestran que en ratas, la hipertensión se asocia a un proceso inflamatorio sistémico y vascular, que podría ser uno de los posibles mecanismos por los que los niveles elevados de presión arterial pueden inducir el desarrollo de aterosclerosis. Es importante mencionar el gran paralelismo observado entre la expresión vascular de IL-6 e IL-1β, y los niveles circulantes. Este aspecto podría sugerir la utilidad de la medida plasmática de estas citoquinas para valorar el proceso inflamatorio vascular asociado a hipertensión. Además de la participación de los cambios hemodinámicos inducidos por la hipertensión, la AII podría estar implicada en la estimulación de los mediadores inflamatorios, mediante una sobreexpresión del NFκB y una reducción en la expresión de su inhibidor IκB en las arterias de las ratas hipertensas. La reducción de los parámetros inflamatorios debido al bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> parece ser debido, al menos en parte, a la prevención de estos cambios en la expresión del ARNm del sistema NFκB/IκB.

**PERSPECTIVAS:**

Los resultados de este trabajo muestran la interrelación existente entre el remodelado arterial, la disfunción vascular, el estrés oxidativo y la inflamación, tanto sistémico como vascular en un modelo experimental de hipertensión multifactorial. Los niveles elevados de PA y la AII, participan en el desarrollo de todas estas alteraciones. La progresión de dichas alteraciones no sucede de manera aislada sino que estos procesos parecen desarrollarse de manera integrada y se correlacionan entre sí, tal y como se ha descrito anteriormente. Además del estrés hemodinámico producido por la hipertensión, la AII juega un papel central en las alteraciones de la estructura y la función vascular por lo que favorece el remodelado vascular y la disfunción endotelial. Asimismo, la AII modifica el estado redox celular debido al aumento de los  $\cdot\text{O}_2^-$  y a la disminución de la defensa antioxidante que finalmente favorece el proceso inflamatorio aumentando la síntesis de citoquinas. Por otro lado, parece existir un nexo común entre las alteraciones observadas, el sistema NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B. Su activación sería responsable del deterioro funcional y estructural del vaso, así como la inflamación vascular y el aumento del estrés oxidativo. Por tanto, los resultados del presente estudio sugieren una vez más la importancia de la AII en las complicaciones vasculares de la HTA, considerándola un nexo entre la hipertensión y el proceso aterosclerótico a través del desarrollo de la disfunción endotelial, el estrés oxidativo y la inflamación vascular.



# RESUMEN



1. La hipertensión en ratas (SHR) está asociada a las siguientes alteraciones:
  - Un aumento del área de la aorta, de la media y de la luz vascular, así como del cociente media/lumen en la aorta de SHR. Estas alteraciones estructurales van acompañadas de un aumento de la expresión vascular y producción proteica del factor profibrótico CTGF y producción de colágeno.
  - Una disfunción vascular caracterizada por la disminución de la relajación endotelio dependiente a Ach, una disminución de la relajación a isoproterenol, un aumento de la contracción a AI y a AII, un aumento de la vasoconstricción dependiente de endotelio a Ach+LNAME y una disminución de la contracción a KCl y FE. No se modifica la respuesta a NPS, ni la expresión vascular del ARNm de eNOS, sin embargo la expresión de p22phox aumenta indicando un aumento de estrés oxidativo vascular.
  - Una disminución del GSH, y un aumento del GSSG, así como una reducción del cociente GSH/GSSG. Disminución de la actividad de enzima antioxidante GPx y aumento de la actividad de GRed, indicando una reducción de la defensa antioxidante. Además se asocia a un aumento de los niveles hepáticos de MDA sugiriendo un aumento del estrés oxidativo hepático, así como del estado redox sistémico.
  - Un aumento de las citoquinas inflamatorias plasmáticas IL-1 $\beta$  e IL-6, así como un aumento de la expresión del ARNm de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en aorta, indicando la presencia de un proceso inflamatorio sistémico y vascular. No se modifica la PCR o el INF- $\gamma$ .
  - Un aumento en la expresión génica del p105 (precursor de la subunidad p50 del NF $\kappa$ B) así como una reducción de su inhibidor I $\kappa$ B, lo que sugiere que el sistema NF $\kappa$ B / I $\kappa$ B estaría implicado en la regulación de las citoquinas inflamatorias.
  
2. El tratamiento con candesartán (2mg/Kg/día) durante 10 semanas en las ratas espontáneamente hipertensas produce:
  - Una reducción los niveles de presión arterial pero no se normalizan.

- Una disminución del área de la media, de la luz vascular y del cociente media/lumen en la aorta de SHR. Esta mejora en las alteraciones estructurales van acompañadas de una reducción de la expresión del ARNm así como de la producción proteica del CTGF en la aorta de las SHR. Asimismo, la producción de colágeno disminuye.
- Previene la disfunción vascular observada en SHR debido a que aumenta la vasorelajación dependiente de endotelio, aumento en la expresión vascular de la NOSe, disminuye la expresión vascular del ARNm de p22phox sugiriendo una mayor biodisponibilidad de NO y una menor producción de  $O_2^-$  en la aorta. Aumenta la relajación a isoproterenol, mientras que la contracción a AI disminuye y a AII no se modifica; disminuye la vasoconstricción dependiente de endotelio a Ach+LNAME y aumenta la contracción a KCl y FE. No se modifica la respuesta a NPS.
- Un aumento del GSH, y disminución del GSSG, y por tanto un aumento del cociente GSH/GSSG, sugiriendo una restauración de la defensa antioxidante. La actividad de enzima antioxidante GPx y de GRed no se modifica. Sin embargo, se reduce el MDA sugiriendo un menor estrés oxidativo hepático.
- Una reducción en los parámetros inflamatorios plasmáticos IL-1 $\beta$  e IL-6 y una normalización de la expresión génica vascular de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ .
- Una disminución de la expresión génica del p105 (precursor de la subunidad p50 del NF $\kappa$ B) así como un aumento de los niveles de ARNm de su inhibidor I $\kappa$ B.

# CONCLUSIONES



Las conclusiones principales del presente trabajo son:

1. El factor profibrótico CTGF participa en las alteraciones vascular asociadas a la hipertensión arterial en SHR.
2. Este modelo experimental de hipertensión multifactorial en ratas se asocia a alteraciones del estado redox hepático que pueden participar en las alteraciones funcionales vasculares observadas.
3. Las alteraciones de la expresión génica del sistema NFκB / IκB participan en el proceso inflamatorio vascular asociado a hipertensión en SHR.
4. La angiotensina II, actuando a través de los receptores AT<sub>1</sub>, es responsable en gran medida, de las alteraciones anteriormente mencionadas asociadas al modelo de hipertensión animal.



# **BIBLIOGRAFÍA**



Sodium, potassium, body mass, alcohol and blood pressure: the INTERSALT Study. The INTERSALT Co-operative Research Group. *J Hypertens Suppl* 1988; (6): S584-S586.

2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 2003; (21): 1011-1053.

Abbas A, Gorelik G, Carhini L A, Scicli A G. Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated hypotensive responses in anesthetized rats. *Hypertension* 1997; (30): 217-221.

Abe J L, Berck B. Reactive Oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Med* 1998; (8): 59-64.

Aghdassi E, Allard J P. Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic Biol Med* 2000; (28): 880-886.

Ahima R S, Flier J S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2000; (11): 327-332.

Akiba Y, Yamaguchi N, Amano H, Fujii T, Fujimoto K, Suzuki T, Kawashima K. Role of nitric oxide in the control of blood pressure in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1995; (22): S142-S143.

Alderton W K, Cooper C E, Knowles R G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; (357): 593-615.

Alexander M Y, Brosnan M J, Hamilton C A, Downie P, Devlin A M, Dowell F, Martin W, Prentice H M, O'Brien T, Dominiczak A F. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves nitric oxide-dependent endothelial function in a hypertensive rat model. *Cardiovascular Research* 1999; (43): 798-807.

Altieri R J, Kiritsyroy J A, Catravas J D. Acetylcholine-Induced Contractions in Isolated Rabbit Pulmonary-Arteries - Role of Thromboxane-A<sub>2</sub>. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1986; (236): 535-541.

Anderson G H, Streeten D H P, Dalakos T G. Pressor-Response to 1-Sar-8-Ala-Angiotensiniii (Saralasin) in Hypertensive Subjects. *Circulation Research* 1977; (40): 243-250.

Andrade F H. Reactive Oxigen species and skeletal muscle function. In: Free radicals in exercise and aging. (Ed.Radak Z). *HUMAN KINETICS*, 2000; 117-148.

Anggard E E, Botting R M, Vane J R. Endothelins. *Blood Vessels* 1990; (27): 269-281.

Arakawa K. Pressure, platelets, and plaque: the central role of angiotensin II in cardiovascular pathology. Introduction. *Am J Cardiol* 2001; (87): 1C-2C.

Auch-Schwelk W, Katusic Z S, Vanhoutte P M. Nitric oxide inactivates endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension* 1992; (19): 442-445.

Badimón L, Martínez-González J. Alteraciones funcionales del endotelio en la aterosclerosis. In: Lesión endotelial en la patología vascular. (Ed. Lahera V). Madrid: SCM, 2001; 127-149.

Bailie M D, Crosslan K, Hook J B. Natriuretic effect of furosemide after inhibition of prostaglandin synthetase. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; (199): 469-476.

Bandaletova T, Brouet I, Bartsch H, Sugimura T, Esumi H, Ohshima H. Immunohistochemical Localization of An Inducible Form of Nitric-Oxide Synthase in Various Organs of Rats Treated with Propionibacterium-Acnes and Lipopolysaccharide. *Apmis* 1993; (101): 330-336.

Barajas L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 1979; (237): F333-F343.

Barki-Harrington L, Luttrell L M, Rockman H A. Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation* 2003a; (108): 1611-1618.

Baylis C, Vallance P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine--what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; (7): 59-62.

Bayorh M A, Ganafa A A, Socci R R, Eatman D, Silvestrov N, Abukhalaf I K. Effect of losartan on oxidative stress-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens* 2003; (16): 387-392.

Benetos A, Levy B I, Lacolley P, Taillard F, Duriez M, Safar M E. Role of angiotensin II and bradykinin on aortic collagen following converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; (17): 3196-3201.

Benjamin N, Calver A, Collier J, Robinson B, Vallance P, Webb D. Measuring forearm blood flow and interpreting the responses to drugs and mediators. *Hypertension* 1995; (25): 918-923.

Bennai F, Morsing P, Paliege A, Ketteler M, Mayer B, Tapp R, Bachmann S. Normalizing the expression of nitric oxide synthase by low-dose AT(1) receptor antagonism parallels improved vascular morphology in hypertensive rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 1999; (10): S104-S115.

Berk B C. Protein kinases that mediate redox-sensitive signal transduction. In: *Oxidative Stress and vascular disease*. (Ed. Keaney FJ). Massachusetts: 2000; 335-348.

Berk B C, Corson M A. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 1997; (80): 607-616.

Best L C, Martin T J, Russell R G, Preston F E. Prostacyclin increases cyclic AMP levels and adenylate cyclase activity in platelets. *Nature* 1977; (267): 850-852.

Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 1997; (96): 3042-3047.

Biedermann B C. Vascular endothelium: Checkpoint for inflammation and immunity. *News in Physiological Sciences* 2001; (16): 84-88.

Blair-West J R, Reid I A, Ganong W F. Stimulation of angiotensinogen release by raised blood angiotensin concentration in the dog. *Clin Sci Mol Med* 1974; (46): 665-669.

Blake G J, Ridker P M. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circulation Research* 2001; (89): 763-771.

Blann A D, Dobrotova M, Kubisz P, McCollum C N. von Willebrand factor, soluble P-selectin, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1995; (74): 626-630.

Blann A D, McCollum C N. Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1994; (72): 151-154.

Bobillier-Chaumont S, Nicod L, Richert L, Berthelot A. Antioxidant status in the liver of hypertensive and metallothionein-deficient mice. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; (81): 929-936.

Bosc L V G, Kurnjek M L, Muller A, Terragno N A, Basso N. Effect of chronic angiotensin II inhibition on the nitric oxide synthase in the normal rat during aging. *Journal of Hypertension* 2001; (19): 1403-1409.

Brasier A R, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge M S. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 2000; (212): 155-169.

Brasier A R, Recinos A, Eledrisi M S. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2002; (22): 1257-1266.

Brede M, Hein L. Transgenic mouse models of angiotensin receptor subtype function in the cardiovascular system. *Regul Pept* 2001; (96): 125-132.

Bredt D S. Targeting nitric oxide to its targets. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; (211): 41-48.

Bredt D S. Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research* 1999; (31): 577-596.

Brosnan M J, Hamilton C A, Graham D, Lygate C A, Jardine E, Dominiczak A F. Irbesartan lowers superoxide levels and increases nitric oxide bioavailability in blood vessels from spontaneously hypertensive stroke-prone rats. *Journal of Hypertension* 2002; (20): 281-286.

Brosnihan K B, Li P, Ferrario C M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 1996; (27): 523-528.

Brown N J, Agirbasli M A, Williams G H, Litchfield W R, Vaughan D E. Effect of activation and inhibition of the renin-angiotensin system on plasma PAI-1. *Hypertension* 1998; (32): 965-971.

Burger D, Dayer J M. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2002; (966): 464-473.

Bush E, Maeda N, Kuziel W A, Dawson T C, Wilcox J N, DeLeon H, Taylor W R. CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 2000; (36): 360-363.

Cachofeiro V, Maeso R, Munoz-Garcia R, Lahera V. The potential role of nitric oxide in angiotensin II-receptor blockade. *Blood Press Suppl* 1996; (2): 29-35.

Cachofeiro V, Maeso R, Rodrigo E, Navarro J, Ruliope L M, Lahera V. Nitric-Oxide and Prostaglandins in the Prolonged Effects of Losartan and Ramipril in Hypertension. *Hypertension* 1995; (26): 236-243.

Cachofeiro V, Sanz-Rosa D, De Las Heras N, Cediél E, Miana M, Lahera V. Inflamación, disfunción endotelial e hipertensión arterial. *Hipertensión* 2004; (21): 347-354.

Carbonell L F, Nadal J A, Llanos C, Hernandez I, Nava E, Diaz J. Depletion of liver glutathione potentiates the oxidative stress and decreases nitric oxide synthesis in a rat endotoxin shock model. *Critical Care Medicine* 2000; (28): 2002-2006.

Cascales M. *Estrés Oxidativo. Envejecimiento y Enfermedad*. Madrid 1999a.

Castellion A W, Fulton R W. *Pre-Clinical Pharmacology of Saralasin*. *Kidney International* 1979; (15): S11-S19.

Cediél E, Sanz-Rosa D, Oubina M P, De Las H N, Gonzalez Pacheco F R, Vegazo O, Jimenez J, Cachofeiro V, Lahera V. Effect of AT1 receptor blockade on hepatic redox status in SHR: possible relevance for endothelial function? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; (285): R674-R681.

Celermajer D S, Sorensen K E, Gooch V M, Spiegelhalter D J, Miller O I, Sullivan I D, Lloyd J K, Deanfield J E. Noninvasive Detection of Endothelial Dysfunction in Children and Adults at Risk of Atherosclerosis. *Lancet* 1992; (340): 1111-1115.

Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch W J, Wilcox C S. Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; (285): R117-R124.

Chae C U, Lee R T, Rifai N, Ridker P M. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 2001; (38): 399-403.

Chen N Y, Hu S J, Dong H T. [Expression of NOS III mRNA in different tissues of spontaneously hypertensive rats using RNA array.]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2004; (33): 443-448.

Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir E G, Lambeth J D. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001; (269): 131-140.

Cheng J B, Shibata S. Vascular relaxation in the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1981; (3): 1126-1140.

Chobanian A V, Bakris G L, Black H R, Cushman W C, Green L A, Izzo J L, Jr., Jones D W, Materson B J, Oparil S, Wright J T, Jr., Roccella E J. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 2003; (289): 2560-2571.

Chomczynski P. A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of Rna, Dna and Proteins from Cell and Tissue Samples. *Biotechniques* 1993; (15): 532-&.

Cogan M G, Xie M H, Liu F Y, Wong P C, Timmermans P B M W. Effects of Dup 753 on Proximal Nephron and Renal Transport. *American Journal of Hypertension* 1991; (4): S315-S320.

Cohen R A, Shepherd J T, Vanhoutte P M. Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 1983; (221): 273-274.

Cohen R A, Vanhoutte P M. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995; (92): 3337-3349.

Coloccini R. Endotelina: ¿una nueva frontera en Hipertensión Arterial? 2003.  
Ref Type: Internet Communication

Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte P M. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1996; (119): 959-964.

Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der L B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli G C, Joch H, Volpe M, Luscher T F. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 2003; (107): 1017-1023.

Costa L E, La Padula P, Lores-Arnaiz S, D'Amico G, Boveris A, Kurnjek M L, Basso N. Long-term angiotensin II inhibition increases mitochondrial nitric oxide synthase and not antioxidant enzyme activities in rat heart. *J Hypertens* 2002; (20): 2487-2494.

d'Uscio L V, Moreau P, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher T F. Effects of chronic ETA-receptor blockade in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 1997; (29): 435-441.

Dahan I, Issaeva I, Gorzalczy Y, Sigal N, Hirshberg M, Pick E. Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking". *J Biol Chem* 2002; (277): 8421-8432.

Dahlof B, Devereux R B, Kjeldsen S E, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm L H, Nieminen M S, Omvik P, Oparil S, Wedel H. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002; (359): 995-1003.

Dalekos G N, Elisaf M, Bairaktari E, Tsolas O, Siamopoulos K C. Increased serum levels of interleukin-1beta in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? *J Lab Clin Med* 1997; (129): 300-308.

Dalekos G N, Elisaf M S, Papagalanis N, Tzallas C, Siamopoulos K C. Elevated interleukin-1 beta in the circulation of patients with essential hypertension before any drug therapy: a pilot study. *Eur J Clin Invest* 1996; (26): 936-939.

Dart A M, Chin-Dusting J P F. Lipids and the endothelium. *Cardiovascular Research* 1999; (43): 308-322.

Dayal S, Brown K L, Weydert C J, Oberley L W, Arning E, Bottiglieri T, Faraci F M, Lentz S R. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes to endothelial dysfunction in hyperhomocysteinemic mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2002; (22): A29-A30.

de Gasparo M, Catt K J, Inagami T, Wright J W, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; (52): 415-472.

de Gasparo M, Levens N. Does blockade of angiotensin II receptors offer clinical benefits over inhibition of angiotensin-converting enzyme? *Pharmacol Toxicol* 1998; (82): 257-271.

De Mey J G, Schiffers P M, Hilgers R H, Sanders M M. Toward functional genomics of flow-induced outward remodeling of resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; (288): H1022-H1027.

Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Kreuzer J, Park J K, Theuer J, Juepner A, Gulba D C, Mackman N, Haller H, Luft F C. AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation* 2000; (101): 2382-2387.

DelliPizzi A M, Hilchey S D, Bell-Quilley C P. Natriuretic action of angiotensin(1-7). *Br J Pharmacol* 1994; (111): 1-3.

Demling R, Lalonde C, Picard L, Blanchard J. Changes in Lung and Systemic Oxidant and Antioxidant Activity After Smoke-Inhalation. *Shock* 1994; (1): 101-107.

Desaulles E, Miesch F, Schwartz J. Evidence for Participation of Beta-1-Adrenoceptors in Isoprenaline-Induced Renin Release from Rat-Kidney Slices Invitro. *British Journal of Pharmacology* 1978; (63): 421-425.

Dostal D E, Hunt R A, Kule C E, Bhat G J, Karoor V, McWhinney C D, Baker K M. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol* 1997; (29): 2893-2902.

Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process* 2002; (959): 66-81.

Dubey R K, Overbeck H W. Culture of rat mesenteric arteriolar smooth muscle cells: effects of platelet-derived growth factor, angiotensin, and nitric oxide on growth. *Cell Tissue Res* 1994; (275): 133-141.

Dusi S, Donini M, Lissandrini D, Mazzi P, Bianca V D, Rossi F. Mechanisms of expression of NADPH oxidase components in human cultured monocytes: role of cytokines and transcriptional regulators involved. *Eur J Immunol* 2001; (31): 929-938.

Dzau V, Braunwald E. Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement. *Am Heart J* 1991; (121): 1244-1263.

Dzau V J. Significance of the Vascular Renin-Angiotensin Pathway. *Hypertension* 1986; (8): 553-559.

Dzau V J, Sasamura H, Hein L. Heterogeneity of Angiotensin Synthetic Pathways and Receptor Subtypes - Physiological and Pharmacological Implications. *Journal of Hypertension* 1993a; (11): S13-S18.

Dzau V J, Sasamura H, Hein L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J Hypertens Suppl* 1993b; (11): S13-S18.

Fadillioglu E, Erdogan H, Polat A, Emre M H. Renal antioxidant status in rats with hypertension induced by N sup omega nitro-L-arginine methyl ester. *Kidney Blood Press Res* 2002; (25): 211-216.

Fava D, Cassone-Faldetta M, Laurenti O, De Luca O, Ghiselli A, De Mattia G. Gliclazide improves anti-oxidant status and nitric oxide-mediated vasodilation in Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* 2002; (19): 752-757.

Fei H H, Berliner J A, Parhami F, Drake T A. Regulation of Endothelial-Cell Tissue Factor Expression by Minimally Oxidized Ldl and Lipopolysaccharide. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993; (13): 1711-1717.

Fernandez-Botran R, Chilton P M, Ma Y. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease and therapy. *Adv Immunol* 1996; (63): 269-336.

Fernandez-Real J M, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; (86): 1154-1159.

Ferrini M G, Magee T R, Vernet D, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid N F. Penile neuronal nitric oxide synthase and its regulatory proteins are present in hypothalamic and spinal cord regions involved in the control of penile erection. *Journal of Comparative Neurology* 2003; (458): 46-61.

Fiebeler A, Schmidt F, Muller D N, Park J K, Dechend R, Bieringer M, Shagdarsuren E, Breu V, Haller H, Luft F C. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappab activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* 2001; (37): 787-793.

- Filella X, Zarco M A. Citocinas: del laboratorio a la clínica. *Medicina Clínica* 1999; (113): 56-57.
- Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; (284): R1-12.
- Fleming W W. Membrane potential and vascular smooth muscle sensitivity. A minireview. *Blood Vessels* 1987; (24): 108-112.
- Frank G D, Eguchi S, Yamakawa T, Tanaka S, Inagami T, Motley E D. Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology* 2000; (141): 3120-3126.
- Frank P G, Woodman S E, Park D S, Lisanti M P. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; (23): 1161-1168.
- Fu M, Zhang J, Zhu X, Myles D E, Willson T M, Liu X, Chen Y E. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with Smad3. *J Biol Chem* 2001; (276): 45888-45894.
- Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M. Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1992; (70): 660-669.
- Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; (4): 281-286.
- Fukuhara M, Geary R L, Diz D I, Gallagher P E, Wilson J A, Glazier S S, Dean R H, Ferrario C M. Angiotensin-converting enzyme expression in human carotid artery atherosclerosis. *Hypertension* 2000; (35): 353-359.
- Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen J B, Capers Q, Taylor W R, Harrison D G, de Leon H, Wilcox J N, Griendling K K. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 1997; (80): 45-51.
- Furchgott R F, Vanhoutte P M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; (3): 2007-2018.
- Furchgott R F, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; (288): 373-376.
- Garcia d M, Gomez-Morales M, Cortes V, Aguayo M L, Gigosos R L, Lardelli P, Navas A, Aneiros J, Aguilar D. Mononuclear cell subsets in IgM mesangial proliferative glomerulonephritis. A comparative study with minimal change nephrotic syndrome and immunonegative mesangial proliferative glomerulonephritis. *Nephron* 1993; (65): 215-221.
- Gehr G, Braun T, Lesslauer W. Cytokines, receptors and inhibitors. *Clin Invest* 1992; (70): 64-69.

Gendron G, Gobeil F, Jr., Morin J, D'Orleans-Juste P, Regoli D. Contractile responses of aortae from WKY and SHR to vasoconstrictors. *Clin Exp Hypertens* 2004; (26): 511-523.

Ghiadoni L, Virdis A, Magagna A, Taddei S, Salvetti A. Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension. *Hypertension* 2000; (35): 501-506.

Gibbons G H. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: A new therapeutic target. *American Journal of Cardiology* 1997; (79): 3-8.

Gibbons G H, Pratt R E, Dzau V J. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992; (90): 456-461.

Gluais P, Edwards G, Weston A H, Falck J R, Vanhoutte P M, Feletou M. Role of SK(Ca) and IK(Ca) in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery. *Br J Pharmacol* 2005; (144): 477-485.

Goetz R M, Holtz J. Enhanced angiotensin-converting enzyme activity and impaired endothelium-dependent vasodilation in aortae from hypertensive rats: evidence for a causal link. *Clin Sci (Lond)* 1999; (97): 165-174.

Gonzalez W, Fontaine V, Pueyo M E, Laquay N, Messika-Zeitoun D, Philippe M, Arnal J F, Jacob M P, Michel J B. Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals. *Hypertension* 2000; (36): 103-109.

Gow A J, Ischiropoulos H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *Journal of Cellular Physiology* 2001; (187): 277-282.

Griendling K K, Minieri C A, Ollerenshaw J D, Alexander R W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; (74): 1141-1148.

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

Gurr E. *Biological staining methods*. England 1973.

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, Physiology, and Molecular-Biology of Renin Secretion. *Physiological Reviews* 1990; (70): 1067-1116.

Hagemann C, Blank J L. The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* 2001; (13): 863-875.

Hall J E. Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. *Am J Physiol* 1986a; (250): R960-R972.

Hall J E. Regulation of glomerular filtration rate and sodium excretion by angiotensin II. *Fed Proc* 1986b; (45): 1431-1437.

Hall J E, Guyton A C, Smith M J, Jr., Coleman T G. Long-term regulation of arterial pressure, glomerular filtration and renal sodium reabsorption by angiotensin II in dogs. *Clin Sci (Lond)* 1980; (59 Suppl 6): 87s-90s.

Haller H, Park J K, Dragun D, Lippoldt A, Luft F C. Leukocyte infiltration and ICAM-1 expression in two-kidney one-clip hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 1997; (12): 899-903.

Halliwell B, Gutteridge J M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995; (18): 125-126.

Hamaguchi A, Kim S, Izumi Y, Zhan Y, Yamanaka S, Iwao H. Contribution of extracellular signal-regulated kinase to angiotensin II-induced transforming growth factor-beta1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999; (34): 126-131.

Hamilton C A, Brosnan M J, McIntyre M, Graham D, Dominiczak A F. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001a; (37): 529-534.

Hamilton M L, Van Remmen H, Drake J A, Yang H, Guo Z M, Kewitt K, Walter C A, Richardson A. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001b; (98): 10469-10474.

Han Y, Runge M S, Brasier A R. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* 1999; (84): 695-703.

Handa R K, Ferrario C M, Strandhoy J W. Renal actions of angiotensin-(1-7): in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol* 1996; (270): F141-F147.

Harrison D G, Galis Z, Parthasarathy S, Griendling K K. Oxidative Stress and Hypertension. In: *Hypertension Primer*. (Eds. Izzo J, Black H). Dallas: 1999; Second edition: 271-273.

Hayek T, Attias J, Coleman R, Brodsky S, Smith J, Breslow J L, Keidar S. The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovasc Res* 1999; (44): 579-587.

Haynes W G, Webb D J. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens* 1998; (16): 1081-1098.

Heagerty A M. Angiotensin II: vasoconstrictor or growth factor? *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; (18 Suppl 2): S14-S19.

Hector P A, Pena C. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. *Regul Pept* 2005; (128): 1-5.

Heltianu C, Costache G, Gafencu A, Diaconu M, Bodeanu M, Cristea C, Azibi K, Poenaru L, Simionescu M. Relationship of eNOS gene variants to diseases that have in common an endothelial cell dysfunction. *J Cell Mol Med* 2005; (9): 135-142.

Henrion D, Kubis N, Levy B I. Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension* 2001; (38): 1150-1157.

Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997; (95): 1532-1541.

Herrmann H C, Dzau V J. The feedback regulation of angiotensinogen production by components of the renin-angiotensin system. *Circ Res* 1983; (52): 328-334.

Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab N A, Goppelt-Struebe M. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 2001; (12): 1853-1861.

Higashi T, Kobayashi N, Hara K, Sjrataki H, Matsuoka H. Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on nitric oxide synthase expression and myocardial remodelling in Goldblatt hypertensive rats. *J Cardiovas Pharmacol* 2000; (35): 571.

Hilchey S D, Bell-Quilley C P. Association between the natriuretic action of angiotensin-(1-7) and selective stimulation of renal prostaglandin I<sub>2</sub> release. *Hypertension* 1995; (25): 1238-1244.

Holvoet P, Collen D. Thrombosis and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 1997; (8): 320-328.

Horvath C M, Darnell J E. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 1997; (9): 233-239.

Husain A. The chymase-angiotensin system in humans. *J Hypertens* 1993; (11): 1155-1159.

Hussain S N A, EIDwairi Q, AbdulHussain M N, Sakkal D. Expression of nitric oxide synthase isoforms in normal ventilatory and limb muscles. *Journal of Applied Physiology* 1997; (83): 348-353.

Inoue I, Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, Komoda T, Katayama S. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 2001; (50): 3-11.

Jaffe E. Physiologic functions of normal endothelial cells. In: *Vascular Medicine. A text book of vascular biology and diseases.* (Eds. Loscalzo J, Creager M, Dzau V). Boston: Little, Brown and Company, 1996; 3-46.

Janssen L J. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; (280): L1067-L1082.

Ji L L, Hollander J. Antioxidant defense: effects of aging and exercise. In: Free radicals in exercise and aging. (Ed. Radak Z). *HUMAN KINETICS*, 2000; 117-148.

Jones S A, O'Donnell V B, Wood J D, Broughton J P, Hughes E J, Jones O T. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; (271): H1626-H1634.

Julius S, Kjeldsen S E, Weber M, Brunner H R, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes G T, Mitchell L, Plat F, Schork A, Smith B, Zanchetti A. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* 2004; (363): 2022-2031.

Kakar S S, Sellers J C, Devor D C, Musgrove L C, Neill J D. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; (183): 1090-1096.

Kanagy N L, Pawloski C M, Fink G D. Role of Aldosterone in Angiotensin-II-Induced Hypertension in Rats. *American Journal of Physiology* 1990; (259): R102-R109.

Kanaide H, Ichiki T, Nishimura J, Hirano K. Cellular mechanism of vasoconstriction induced by angiotensin II: it remains to be determined. *Circ Res* 2003; (93): 1015-1017.

Kaplowitz N, Aw T Y, Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; (25): 715-744.

Karaki H, Weiss G B. Calcium release in smooth muscle. *Life Sci* 1988; (42): 111-122.

Kato T, Iwama Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T. Prostaglandin H<sub>2</sub> may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 1990; (15): 475-481.

Katusic Z S, Cosentino F. Nitric-Oxide Synthase - from Molecular-Biology to Cerebrovascular Physiology. *News in Physiological Sciences* 1994; (9): 64-67.

Keeton T K, Campbell W B. The Pharmacologic Alteration of Renin Release. *Pharmacological Reviews* 1980; (32): 81-227.

Keidar S, Gilhar A, Kaplan M, Brook J G, Aviram M. Enhanced degradation of high density lipoprotein by peritoneal macrophages from nude mice is attenuated by interleukin-1. *Artery* 1993; (20): 268-279.

Keidar S, Kaplan M, Hoffman A, Aviram M. Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1995; (115): 201-215.

Kerins D M, Hao Q, Vaughan D E. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest* 1995; (96): 2515-2520.

- Kidd P M. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alt Med Rev* 1997; (2): 155-176.
- Kinlay S, Selwyn A P. Effects of statins on inflammation in patients with acute and chronic coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2003; (91): 9B-13B.
- Kitts D D, Yuan Y V, Godin D V. Plasma and lipoprotein lipid composition and hepatic antioxidant status in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; (76): 202-209.
- Ko Y, Gorg A, Appenheimer M, Wieczorek A J, Dusing R, Vetter H, Sachinidis A. Losartan inhibits the angiotensin II-induced stimulation of the phosphoinositide signalling system in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1992; (227): 215-219.
- Kobayashi N, Mori Y, Nakano S, Tsubokou Y, Kobayashi T, Shirataki H, Matsuoka H. TCV-116 stimulates eNOS and caveolin-1 expression and improves coronary microvascular remodeling in normotensive and angiotensin II-induced hypertensive rats. *Atherosclerosis* 2001a; (158): 359-368.
- Kobayashi N, Nishikimi T, Horinaka S, Ishimitsu T, Matsuoka H. Effects of TCV-116 on expression of NOS and adrenomedullin in failing heart of Dahl salt-sensitive rats. *Atherosclerosis* 2001b; (156): 255-265.
- Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y, Fujishima M. Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension* 1989; (14): 542-548.
- Komatsu S, Panes J, Russell J M, Anderson D C, Muzykantov V R, Miyasaka M, Granger D N. Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension* 1997; (29): 683-689.
- Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin Stimulates C-Fos and C-Myc Expression and Proliferation of Vascular Smooth-Muscle Cells. *Febs Letters* 1988; (238): 249-252.
- Kon V, Badr K F. Biological actions and pathophysiologic significance of endothelin in the kidney. *Kidney Int* 1991; (40): 1-12.
- Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; (257): 826-828.
- Kugiyama K, Ohgushi M, Motoyama T, Hirashima O, Soejima H, Misumi K, Yoshimura M, Ogawa H, Sugiyama S, Yasue H. Intracoronary infusion of reduced glutathione improves endothelial vasomotor response to acetylcholine in human coronary circulation. *Circulation* 1998; (97): 2299-2301.
- Kung C F, Luscher T F. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension* 1995; (25): 194-200.

Kutuk O, Basaga H. Inflammation meets oxidation: NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2003; (9): 549-557.

Lahera V, Navarro-Cid J, De Las H N, Vazquez-Perez S, Cediel E, Cachofeiro V. Sistema Renina Angiotensina. In: *Tratado de endocrinología básica y clínica*. (Ed. Jesús Tresguerres Fernández). Madrid: 2000; Síntesis: 1368-1384.

Laragh J H, Baer L, Brunner H R, Buhler F R, Sealey J E, Vaughan E D, Jr. Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease. *Am J Med* 1972; (52): 633-652.

las Heras N, Aragoncillo P, Maeso R, Vazquez-Perez S, Navarro-Cid J, DeGasparo M, Mann J, Ruilope L M, Cachofeiro V, Lahera V. AT(1) receptor antagonism reduces endothelial dysfunction and intimal thickening in atherosclerotic rabbits. *Hypertension* 1999; (34): 969-975.

Leask A, Holmes A, Black C M, Abraham D J. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 2003; (278): 13008-13015.

Levin E R. Endothelins. *N Engl J Med* 1995; (333): 356-363.

Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 2002; (7): 132-147.

Li J, Brasier A R. Angiotensinogen gene activation by angiotensin II is mediated by the rel A (nuclear factor-kappaB p65) transcription factor: one mechanism for the renin angiotensin system positive feedback loop in hepatocytes. *Mol Endocrinol* 1996; (10): 252-264.

Li J M, Shah A M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; (287): R1014-R1030.

Li P, Ferrario C M, Brosnihan K B. Losartan inhibits thromboxane A2-induced platelet aggregation and vascular constriction in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; (32): 198-205.

Liao J K. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998; (44): 1799-1808.

Lithell H, Hansson L, Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B, Trenkwalder P, Zanchetti A. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens* 2003; (21): 875-886.

Lopez-Jaramillo P, Gonzalez M C, Palmer R M, Moncada S. The crucial role of physiological Ca<sup>2+</sup> concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol* 1990; (101): 489-493.

Lou Y K, Wen C, Li M, Adams D J, Wang M X, Yang F, Morris B J, Whitworth J A. Decreased renal expression of nitric oxide synthase isoforms in adrenocorticotropin-induced and corticosterone-induced hypertension. *Hypertension* 2001; (37): 1164-1170.

Lowenstein C J, Alley E W, Raval P, Snowman A M, Snyder S H, Russell S W, Murphy W J. Macrophage Nitric-Oxide Synthase Gene - 2 Upstream Regions Mediate Induction by Interferon-Gamma and Lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; (90): 9730-9734.

Luque M. Hipertensión y Arteriosclerosis. Momento Médico Iberoamericano, Madrid 2004.

Luscher T F. The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension* 1990; (15): 482-485.

Luscher T F, Vanhoutte P M. Endothelium-Dependent Contractions to Acetylcholine in the Aorta of the Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension* 1986b; (8): 344-348.

Luvara G, Pueyo M E, Philippe M, Mandet C, Savoie F, Henrion D, Michel J B. Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; (18): 1408-1416.

Maeso R, Aragoncillo P, Navarro-Cid J, Ruilope L M, Diaz C, Hernandez G, Lahera V, Cachofeiro V. Effect of atorvastatin on endothelium-dependent constrictor factors in dyslipidemic rabbits. *Gen Pharmacol* 2000; (34): 263-272.

Maeso R, Rodrigo E, Munoz-Garcia R, Navarro-Cid J, Ruilope L M, Cachofeiro V, Lahera V. Chronic treatment with losartan ameliorates vascular dysfunction induced by aging in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 1998; (16): 665-672.

Manabe K, Shirahase H, Usui H, Kurahashi K, Fujiwara M. Endothelium-dependent contractions induced by angiotensin I and angiotensin II in canine cerebral artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1989b; (251): 317-320.

Martin-Sanz P, Hortelano S, Callejas N A, Goren N, Casado M, Zeini M, Bosca L. Nitric oxide in liver inflammation and regeneration. *Metab Brain Dis* 2002; (17): 325-334.

Marumo T, Schini-Kerth V B, Brandes R P, Busse R. Glucocorticoids inhibit superoxide anion production and p22 phox mRNA expression in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 1998; (32): 1083-1088.

Matsuo M, Kaneko K. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: *Free Radicals in Exercise and Aging*. (Ed. Radak Z). Human Kinetics, 2000a; 1-33.

Matsushita H, Lee K H, Tsao P S. Cyclic strain induces reactive oxygen species production via an endothelial NAD(P)H oxidase. *J Cell Biochem Suppl* 2001; (Suppl 36): 99-106.

May M J, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998; (19): 80-88.

McKay L I, Cidlowski J A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999; (20): 435-459.

Meier B, Cross A R, Hancock J T, Kaup F J, Jones O T. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J* 1991; (275 ( Pt 1)): 241-245.

Metsarinne K P, Helin K H, Saijonmaa O, Stewen P, Sirvio M L, Fyhrquist F Y. Tissue-specific regulation of angiotensin-converting enzyme by angiotensin II and losartan in the rat. *Blood Press* 1996; (5): 363-370.

Mezzano S A, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001; (38): 635-638.

Minuz P, Patrignani P, Gaino S, Degan M, Menapace L, Tommasoli R, Seta F, Capone M L, Tacconelli S, Palatresi S, Bencini C, Del Vecchio C, Mansueto G, Arosio E, Santonastaso C L, Lechi A, Morganti A, Patrono C. Increased oxidative stress and platelet activation in patients with hypertension and renovascular disease. *Circulation* 2002; (106): 2800-2805.

Mitchell J A, de Nucci G, Warner T D, Vane J R. Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol* 1992; (105): 485-489.

Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; (32): 3-8.

Mohazzab K M, Wolin M S. Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO<sub>2</sub> sensor. *Am J Physiol* 1994; (267): L823-L831.

Mombouli J V, Illiano S, Nagao T, Scott-Burden T, Vanhoutte P M. Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1992; (71): 137-144.

Mombouli J V, Vanhoutte P M. Endothelial dysfunction: From physiology to therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999; (31): 61-74.

Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res* 2004; (61): 671-682.

Moncada S, Erusalimsky J D. Opinion - Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002; (3): 214-220.

Moreno C, Lopez A, Llinas M T, Rodriguez F, Lopez-Farre Nava A, Salazar F J. Changes in NOS activity and protein expression during acute and prolonged angiotensin II administration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; (282): R31-R37.

Moriguchi A, Tallant E A, Matsumura K, Reilly T M, Walton H, Ganten D, Ferrario C M. Opposing actions of angiotensin-(1-7) and angiotensin II in the brain of transgenic hypertensive rats. *Hypertension* 1995; (25): 1260-1265.

Morrow J D, Awad J A, Kato T, Takahashi K, Badr K F, Roberts L J, Burk R F. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1992; (90): 2502-2507.

Muller D N, Dechend R, Mervaala E M, Park J K, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft F C. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000a; (35): 193-201.

Mulrow P J. Hypertension. A worldwide epidemic. In: *Hypertension Primer*. (Eds. Izzo J, Black H). Dallas: 1999; Second edition: 271-273.

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

Munzel T, Heitzer T, Harrison D G. The physiology and pathophysiology of the nitric oxide superoxide system. *Herz* 1997; (22): 158-172.

Munzel T, Hink U, Heitzer T, Meinertz T. Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone. *Heart in Stress* 1999; (874): 386-400.

Murad F, Webb R. Nitric Oxide. In: *Hypertension primer: The essentials of high blood pressure*. (Eds. Izzo J, Black H). Baltimore: 1999; 44-46.

Murphy M E, Brayden J E. Apamin-sensitive K<sup>+</sup> channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *J Physiol* 1995; (489 ( Pt 3)): 723-734.

Nakamura Y, Nakamura K, Matsukura T, Nakamura K. Vascular angiotensin converting enzyme activity in spontaneously hypertensive rats and its inhibition with cilazapril. *J Hypertens* 1988; (6): 105-110.

Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does Superoxide Underlie the Pathogenesis of Hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991b; (88): 10045-10048.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; (79): 1193-1226.

Neri Serneri G G, Boddi M, Modesti P A, Coppo M, Cecioni I, Toscano T, Papa M L, Bandinelli M, Lisi G F, Chiavarelli M. Cardiac angiotensin II participates in coronary microvessel inflammation of unstable angina and strengthens the immunomediated component. *Circ Res* 2004; (94): 1630-1637.

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

Neyses L, Nouskas J, Luyken J, Fronhoffs S, Oberdorf S, Pfeifer U, Williams R S, Sukhatme V P, Vetter H. Induction of Immediate-Early Genes by Angiotensin-II and Endothelin-1 in Adult-Rat Cardiomyocytes. *Journal of Hypertension* 1993; (11): 927-934.

Nigro D, Fortes Z B, Carvalho M H, Scivoletto R. Chronic but not acute treatment with hydralazine reverses the decreased endothelium-dependent responses in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A* 1989; (11): 573-586.

Nishida K, Harrison D G, Navas J P, Fisher A A, Dockery S P, Uematsu M, Nerem R M, Alexander R W, Murphy T J. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992; (90): 2092-2096.

Novosel D, Lang M G, Noll G, Luscher T F. Endothelial dysfunction in aorta of the spontaneously hypertensive, stroke-prone rat: effects of therapy with verapamil and trandolapril alone and in combination. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; (24): 979-985.

Oemar B S, Luscher T F. Connective tissue growth factor. Friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; (17): 1483-1489.

Oemar B S, Werner A, Garnier J M, Do D D, Godoy N, Nauck M, Marz W, Rupp J, Pech M, Luscher T F. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* 1997; (95): 831-839.

Oh-ishi S, Heinecke J W, Ookawara T, Miyazaki H, Haga S, Radak Z, Kizaki T, Ohno H. Role of lipid and lipoprotein oxidation. In: *Free Radicals in Exercise and Aging*. (Ed. Radak Z). Human Kinetics, 2000; 212-257.

Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Tsutumi Y, Shibasaki Y, Iwasaka T, Inada M. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation* 1997; (96): 3954-3962.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; (27): 282-293.

Okunishi H, Kawamoto T, Kurobe Y, Oka Y, Ishii K, Tanaka T, Miyazaki M. Pathogenetic role of vascular angiotensin-converting enzyme in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991; (18): 649-659.

Olson S C, Dowds T A, Pino P A, Barry M T, BurkeWolin T. ANG II stimulates endothelial nitric oxide synthase expression in bovine pulmonary artery endothelium. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 1997; (17): L315-L321.

Osei S Y, Ahima R S, Minkes R K, Weaver J P, Khosla M C, Kadowitz P J. Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol* 1993; (234): 35-42.

Oubina M P, De Las H N, Vazquez-Perez S, Cediél E, Sanz-Rosa D, Ruilope L M, Cachofeiro V, Lahera V. Valsartan improves fibrinolytic balance in atherosclerotic rabbits. *J Hypertens* 2002; (20): 303-310.

Owens G K. Influence of Blood-Pressure on Development of Aortic Medial Smooth-Muscle Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 1987; (9): 178-187.

Pagano P J, Chanock S J, Siwik D A, Colucci W S, Clark J K. Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension* 1998; (32): 331-337.

Palmer R M, Ashton D S, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; (333): 664-666.

Pals D T, Masucci F D, Sipos F, Denning G S. Specific Competitive Antagonist of Vascular Action of Angiotensin-II. *Circulation Research* 1971; (29): 664-&.

Panza J A, Garcia C E, Kilcoyne C M, Quyyumi A A, Cannon R O. Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients with Essential-Hypertension - Evidence That Nitric-Oxide Abnormality Is Not Localized to A Single Signal-Transduction Pathway. *Circulation* 1995; (91): 1732-1738.

Pearce J D, Li J, Edwards M S, English W P, Geary R L. Differential effects of Rho-kinase inhibition on artery wall mass and remodeling. *J Vasc Surg* 2004; (39): 223-228.

Pearson J D. Endothelial cell function and thrombosis. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 1999; (12): 329-341.

Peeters A C, Netea M G, Janssen M C, Kullberg B J, Van der Meer J W, Thien T. Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *Eur J Clin Invest* 2001; (31): 31-36.

Pfeffer M A, Swedberg K, Granger C B, Held P, McMurray J J V, Michelson E L, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 2003; (362): 759-766.

Phillips M I. Functions of Angiotensin in the Central-Nervous-System. *Annual Review of Physiology* 1987; (49): 413-435.

Phillips M I, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; (3): 569-577.

Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease* 2001; (21): 397-416.

Pithon-Curi T C, Levada A C, Lopes L R, Doi S Q, Curi R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. *Clin Sci (Lond)* 2002; (103): 403-408.

- Porsti I, Bara A T, Busse R, Hecker M. Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol* 1994; (111): 652-654.
- Pratt R E, Dzau V J. Thropic effects of angiotensin on blood vessels and heart. In: *Renin Angiotensin System*. (Eds. Robertson JIS, Nicholas G). New York: Raven Press, 1993; 1993: 1-7.
- Radak Z, Goto S. Oxidative modification of proteins and DNA. In: *Free Radicals in Exercise and Aging*. (Ed. Radak Z). Human Kinetics, 2000; 178-209.
- Radhakrishnan R, Sim M K. Enhanced pressor response to angiotensin III in spontaneously hypertensive rats: effects of losartan. *Eur J Pharmacol* 1994; (259): 87-90.
- Radi R, Beckman J S, Bush K M, Freeman B A. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls - the Cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric-Oxide. *Journal of Biological Chemistry* 1991; (266): 4244-4250.
- Rahman S T, Lauten W B, Khan Q A, Navalkar S, Parthasarathy S, Khan B V. Effects of eprosartan versus hydrochlorothiazide on markers of vascular oxidation and inflammation and blood pressure (renin-angiotensin system antagonists, oxidation, and inflammation). *Am J Cardiol* 2002; (89): 686-690.
- Rahmani M A, DeGray G, David V, Ampy F R, Jones L. Comparison of calcium import as a function of contraction in the aortic smooth muscle of Sprague-Dawley, Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Front Biosci* 1999; (4): D408-D415.
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman B A, Griending K K, Harrison D G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation - Contribution to alterations of vasomotor tone. *Journal of Clinical Investigation* 1996; (97): 1916-1923.
- Redon J, Oliva M R, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez G T. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 2003; (41): 1096-1101.
- Reilly M P, Lawson J A, FitzGerald G A. Eicosanoids and isoeicosanoids: indices of cellular function and oxidant stress. *J Nutr* 1998; (128): 434S-438S.
- Reiter R J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; (56): 359-384.
- Requena J R, Fu M X, Ahmed M U, Jenkins A J, Lyons T J, Thorpe S R. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant* 1996; (11 Suppl 5): 48-53.
- Rhaleb N E, Rouissi N, Nantel F, D'Orleans-Juste P, Regoli D. DuP 753 is a specific antagonist for the angiotensin receptor. *Hypertension* 1991; (17): 480-484.
- Ridker P M. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003; (107): 363-369.

Riser B L, Cortes P, Yee J. Modelling the effects of vascular stress in mesangial cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; (9): 43-47.

Rizzoni D, Porteri E, Bettoni G, Piccoli A, Castellano M, Muiesan M L, Pasini G, Guelfi D, Rosei E A. Effects of candesartan cilexetil and enalapril on structural alterations and endothelial function in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1998; (32): 798-806.

Rodrigo E, Maeso R, MunozGarcia R, NavarroCid J, Ruilope L M, Cachofeiro V, Lahera V. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: Consequences of chronic treatment with losartan or captopril. *Journal of Hypertension* 1997; (15): 613-618.

Roestenberg P, van Nieuwenhoven F A, Wieten L, Boer P, Diekman T, Tiller A M, Wiersinga W M, Oliver N, Usinger W, Weitz S, Schlingemann R O, Goldschmeding R. Connective tissue growth factor is increased in plasma of type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care* 2004; (27): 1164-1170.

Romero J C, Knox F G. Mechanisms underlying pressure-related natriuresis: the role of the renin-angiotensin and prostaglandin systems. State of the art lecture. *Hypertension* 1988; (11): 724-738.

Romero J C, Lahera V, Salom M G, Biondi M L. Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol* 1992; (2): 1371-1387.

Rosendorff C. The renin-angiotensin system and vascular hypertrophy. *Journal of the American College of Cardiology* 1996; (28): 803-812.

Rosenthal J H, Pfeifle B, Michailov M L, Pschorr J, Jacob I C, Dahlheim H. Investigations of components of the renin-angiotensin system in rat vascular tissue. *Hypertension* 1984; (6): 383-390.

Ross R. Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol* 1993; (143): 987-1002.

Rubanyi G M. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med* 1988; (4): 107-120.

Rubanyi G M, Vanhoutte P M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; (250): H822-H827.

Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int* 1997; (52): 1497-1510.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. *Nephrol Dial Transplant* 2001; (16 Suppl 1): 27-33.

Ruperez M. Mecanismos moleculares implicados en el daño vascular y renal causado por la angiotensina II. Modulación terapéutica. 2005. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Bioquímica. Tesis

Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio L M, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation* 2003; (108): 1499-1505.

Ruperez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, Lorenzo O, Mezzano S, Plaza J J, Egido J. Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am J Pathol* 2003; (163): 1937-1947.

Safar M E, London G M, Asmar R, Frohlich E D. Recent advances on large arteries in hypertension. *Hypertension* 1998; (32): 156-161.

Saklatvala J, Dean J, Clark A. Control of the expression of inflammatory response genes. *Biochem Soc Symp* 2003;95-106.

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

Samani N J, Swales J D, Brammar W J. Expression of the renin gene in extra-renal tissues of the rat. *Biochem J* 1988; (253): 907-910.

Sanz-Rosa D, Cediel E, De Las Heras N, Miana M, Balfagon G, Lahera V, Cachofeiro V. Participation of aldosterone in the vascular inflammatory response of spontaneously hypertensive rats: role of the NFkappaB/IkappaB system. *J Hypertens* 2005; (23): 1167-1172.

Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediel E, De Las HN, Aragoncillo P, Balfagon G, Cachofeiro V, Lahera V. Eplerenone reduces oxidative stress and enhances eNOS in SHR: vascular functional and structural consequences. *Antioxid.Redox.Signal*.2005 Sep-Oct;7(9-10):1294-301.

Sanz-Rosa D, Oubina M P, Cediel E, las Heras N, Vegazo O, Jimenez J, Lahera V, Cachofeiro V. Effect of AT(1) receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappa B/I kappa B system. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2005; (288): H111-H115.

Sato N, Kase H, Kato T, Kasai K. [Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist on oxidative stress markers in type 2 diabetic patients with hypertension]. *Nippon Rinsho* 2003; (61): 1245-1249.

Sato N, Kokame K, Miyata T, Kato H. Lysophosphatidylcholine decreases the synthesis of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Haemost* 1998; (79): 217-221.

Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ Res* 2000; (87): 1195-1201.

Schiffrin E L. State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension* 1999; (34): 876-881.

Schiffrin E L, Deng L Y. Comparison of Effects of Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibition and Beta-Blockade for 2 Years on Function of Small Arteries from Hypertensive Patients. *Hypertension* 1995; (25): 699-703.

Schiffrin E L, Park J B, Intengan H D, Touyz R M. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* 2000; (101): 1653-1659.

Schmidt-Ott K M, Kagiya S, Phillips M I. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept* 2000; (93): 65-77.

Schutzer W E, Reed J F, Mader S L. Decline in caveolin-1 expression and scaffolding of G protein receptor kinase-2 with age in Fischer 344 aortic vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; (288): H2457-H2464.

Scottburden T, Vanhoutte P M. The Endothelium As A Regulator of Vascular Smooth-Muscle Proliferation. *Circulation* 1993; (87): 51-55.

Sealey J E, Laragh J H. *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management.* Raven Press Ltd, New York 1990.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; (46): 705-716.

Seno T, Inoue N, Gao D, Okuda M, Sumi Y, Matsui K, Yamada S, Hirata K I, Kawashima S, Tawa R, Imajoh-Ohmi S, Sakurai H, Yokoyama M. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb Res* 2001; (103): 399-409.

Sesso H D, Buring J E, Rifai N, Blake G J, Gaziano J M, Ridker P M. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 2003; (290): 2945-2951.

Sever P S, Poulter N R. A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. *J Hypertens Suppl* 1989; (7): S9-12.

Sheng H, Gagne G D, Matsumoto T, Miller M F, Forstermann U, Murad F. Nitric oxide synthase in bovine superior cervical ganglion. *J Neurochem* 1993; (61): 1120-1126.

Shigenaga M K, Hagen T M, Ames B N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; (91): 10771-10778.

Sim M K. Angiotensin converting enzyme in the endothelium and smooth muscle cum adventitia of the normo- and hypertensive rat aorta. *Clin Exp Hypertens A* 1990; (12): 1107-1113.

Sodergren E, Cederberg J, Vessby B, Basu S. Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats. *Eur J Nutr* 2001; (40): 10-16.

Song K, Kurobe Y, Kanehara H, Okunishi H, Wada T, Inada Y, Nishikawa K, Miyazaki M. Quantitative localization of angiotensin II receptor subtypes in spontaneously hypertensive rats. *Blood Press Suppl* 1994; (5): 21-26.

Souvignet C, Cracowski J L, Stanke-Labesque F, Bessard G. Are isoprostanes a clinical marker for antioxidant drug investigation? *Fundam Clin Pharmacol* 2000; (14): 1-10.

Spielman W S, Thompson C I. A proposed role for adenosine in the regulation of renal hemodynamics and renin release. *Am J Physiol* 1982; (242): F423-F435.

Stadtman E R. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; (257): 1220-1224.

Strawn W B, Chappell M C, Dean R H, Kivlighn S, Ferrario C M. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 2000; (101): 1586-1593.

Sugimoto K, Tsuruoka S, Matsushita K, Fujimura A. Effects of candesartan cilexetil on oxidative state and renal function in 5/6 nephrectomized rats. *J Hum Hypertens* 1999; (13 Suppl 1): S63-S70.

Sun Y, Weber K T. Cells expressing angiotensin II receptors in fibrous tissue of rat heart. *Cardiovasc Res* 1996; (31): 518-525.

Suzuki M, Fukuhara K, Unno M, Htwe T, Takeuchi H, Kakita T, Matsuno S. Correlation between plasma and hepatic phosphatidylcholine hydroperoxide, energy charge, and total glutathione content in ischemia reperfusion injury of rat liver. *Hepato-Gastroenterology* 2000; (47): 1082-1089.

Taddei S, Vanhoutte P M. Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension* 1993; (21): 9-15.

Tamura K, Chen Y E, Lopez-Illasaca M, Daviet L, Tamura N, Ishigami T, Akishita M, Takasaki I, Tokita Y, Pratt R E, Horiuchi M, Dzau V J, Umemura S. Molecular mechanism of fibronectin gene activation by cyclic stretch in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; (275): 34619-34627.

Tamura K, Nyui N, Tamura N, Fujita T, Kihara M, Toya Y, Takasaki I, Takagi N, Ishii M, Oda K, Horiuchi M, Umemura S. Mechanism of angiotensin II-mediated regulation of fibronectin gene in rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998; (273): 26487-26496.

Taniyama Y, Griendling K K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; (42): 1075-1081.

Thomas W G, Brandenburger Y, Autelitano D J, Pham T, Qian H, Hannan R D. Adenoviral-directed expression of the type 1A angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Circ Res* 2002; (90): 135-142.

Thybo N K, Stephens N, Cooper A, Aalkjaer C, Heagerty A M, Mulvany M J. Effect of Antihypertensive Treatment on Small Arteries of Patients with Previously Untreated Essential-Hypertension. *Hypertension* 1995; (25): 474-481.

Timmermans P B, Wong P C, Chiu A T, Herblin W F. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1991; (12): 55-62.

Timmermans P B, Wong P C, Chiu A T, Herblin W F, Benfield P, Carini D J, Lee R J, Wexler R R, Saye J A, Smith R D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; (45): 205-251.

Tominaga M, Fujii K, Abe I, Takata Y, Kobayashi K, Fujishima M. Hypertension and ageing impair acetylcholine-induced vasodilation in rats. *J Hypertens* 1994; (12): 259-268.

Touyz R M, Schiffrin E L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000; (52): 639-672.

Traub O, Lloyd M C, Webb R C. Long-term effects of brief antihypertensive treatment on systolic blood pressure and vascular reactivity in young genetically hypertensive rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995; (9): 421-429.

Troen B R. The biology of aging. *Mt Sinai J Med* 2003; (70): 3-22.

Tsukahara H, Hiraoka M, Kobata R, Hata I, Ohshima Y, Jiang M Z, Noiri E, Mayumi M. Increased oxidative stress in rats with chronic nitric oxide depletion: measurement of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion. *Redox Report* 2000; (5): 23-28.

Tummala P E, Chen X L, Sundell C L, Laursen J B, Hammes C P, Alexander R W, Harrison D G, Medford R M. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature - A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999b; (100): 1223-1229.

Ulker S, McMaster D, McKeown P P, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res* 2003; (59): 488-500.

Ushio-Fukai M, Griendling K K, Akers M, Lyons P R, Alexander R W. Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem* 1998; (273): 19772-19777.

Ushio-Fukai M, Zafari A M, Fukui T, Ishizaka N, Griendling K K. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; (271): 23317-23321.

Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Macri G, Ferrari R. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 2003; (420): 255-261.

Vander A J. Effect of Catecholamines and Renal Nerves on Renin Secretion in Anesthetized Dogs. *American Journal of Physiology* 1965; (209): 659-&.

Vanhoutte P M. How to assess endothelial function in human blood vessels. *J Hypertens* 1999; (17): 1047-1058.

Vassalle C, Botto N, Andreassi M G, Berti S, Biagini A. Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2003; (14): 213-218.

Vazquez-Perez S, Navarro-Cid J, las Heras N, Cediel E, Sanz-Rosa D, Ruilope L M, Cachofeiro V, Lahera V. Relevance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the effects of hypertension on rat coronary relaxations. *Journal of Hypertension* 2001; (19): 539-545.

Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer H I, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; (20): 940-948.

Wagner R C, Chen S C. Transcapillary transport of solute by the endothelial vesicular system: evidence from thin serial section analysis. *Microvasc Res* 1991; (42): 139-150.

Waldman H M, Alter I, Kot P A, Rose J C, Ramwell P W. Effect of lung transit on systemic depressor responses to arachidonic acid and prostacyclin in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; (204): 289-293.

Waltenberger J. Modulation of growth factor action - Implications for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulation* 1997; (96): 4083-4094.

Wang P, Ba Z F, Chaudry I H. Administration of tumor necrosis factor-alpha in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 1994; (266): H2535-H2541.

Wang X, Lu M, Gao Y, Papapetropoulos A, Sessa W C, Wang W. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in principal cell of collecting duct. *Am J Physiol* 1998; (275): F395-F399.

Welch W J, Mendonca M, Aslam S, Wilcox C S. Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the postclipped 2K,1C kidney. *Hypertension* 2003; (41): 692-696.

Whelton P K. Epidemiology of hypertension. *Lancet* 1994; (344): 101-106.

Wilcox C S, Welch W J. Thromboxane mediation of the pressor response to infused angiotensin II. *Am J Hypertens* 1990; (3): 242-249.

Williams B, Baker A Q, Gallacher B, Lodwick D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995; (25): 913-917.

Williams S P, Dorn G W, Rapoport R M. Prostaglandin I<sub>2</sub> mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1994; (267): H796-H803.

Wise H. Multiple signalling options for prostacyclin. *Acta Pharmacol Sin* 2003; (24): 625-630.

Wolff D J, Datto G A. Identification and characterization of a calmodulin-dependent nitric oxide synthase from GH3 pituitary cells. *Biochem J* 1992; (285 ( Pt 1)): 201-206.

- Wu K K, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med* 1996; (47): 315-331.
- Wu L, Juurlink B H. The impaired glutathione system and its up-regulation by sulforaphane in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2001; (19): 1819-1825.
- Wuorela H, Arvola P, Kahonen M, Vapaatalo H, Porsti I. Arterial smooth muscle responses in adult and moderately aged spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Toxicol* 1994; (74): 167-173.
- Yamori Y. Neural and non-neural mechanisms in spontaneous hypertension. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1976; (3): 431s-434s.
- Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem Pharmacol* 1989; (38): 1877-1883.
- Yin K, Chu Z M, Beilin L J. Blood pressure and vascular reactivity changes in spontaneously hypertensive rats fed fish oil. *Br J Pharmacol* 1991; (102): 991-997.
- Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, Suganami T, Yahata K, Fujinaga Y, Tanaka I, Nakao K. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; (282): F933-F942.
- Yoshiyama M, Takeuchi K, Omura T, Kim S, Yamagishi H, Toda I, Teragaki M, Akioka K, Iwao H, Yoshikawa J. Effects of candesartan and cilazapril on rats with myocardial infarction assessed by echocardiography. *Hypertension* 1999; (33): 961-968.
- Yu B P. Cellular Defenses Against Damage from Reactive Oxygen Species. *Physiological Reviews* 1994; (74): 139-162.
- Zalba G, Beaumont F J, San Jose G, Fortuno A, Fortuno M A, Diez J. Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrology Dialysis Transplantation* 2001; (16): 2-5.
- Zalba G, Jose G S, Moreno M U, Fortuno M A, Fortuno A, Beaumont F J, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension - Role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2001; (38): 1395-1399.
- Zaman M A, Oparil S, Calhoun D A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* 2002; (1): 621-636.
- Zhang J H, Hanesworth J M, Sardinia M F, Alt J A, Wright J W, Harding J W. Structural analysis of angiotensin IV receptor (AT4) from selected bovine tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; (289): 1075-1083.