

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Avances en la regresión del remodelado vascular hipertensivo
con un bloqueante multicanal. Estudio experimental en ratas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Muñoz Valverde

DIRIGIDA POR

María Begoña Quintana Villamandos

Emilio Delgado Baeza

María Jesús Delgado Martos

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Avances en la regresión del remodelado vascular hipertensivo con un bloqueante multicanal.
Estudio experimental en ratas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Muñoz Valverde

DIRECTORES

Dra. María Begoña Quintana Villamandos

Dr. Emilio Delgado Baeza

Dra. María Jesús Delgado Martos

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina



Avances en la regresión del remodelado vascular hipertensivo con un bloqueante multicanal. Estudio experimental en ratas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

David Muñoz Valverde

DIRECTORES

Dra. María Begoña Quintana Villamandos

Dr. Emilio Delgado Baeza

Dra. María Jesús Delgado Martos

Programa de Doctorado de Investigación Biomédica

Este trabajo ha sido realizado gracias al Proyecto de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III (*FIS PI16/02069*) y los Fondos FEDER.

A las personas y los animales que han hecho posible este trabajo,

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

Después de muchos vaivenes, de horas en el laboratorio, de charlas de epistemología repetidas y todas diferentes, de cafés motivacionales, incluso pareciendo mentira, este trabajo de tesis ve la luz. Sí, estaba al final del túnel. Y la mayor parte ha sido gracias a mis directores de tesis.

Gracias Begoña. Los dos sabemos que sin tu perseverancia y cabezonería no habría escrito esta tesis. Eres la mejor directora que podría haber tenido nunca. Siempre envidiaré tu capacidad de trabajo y tu dedicación completa a la ciencia. ¿Vida?, ¿qué vida? Gracias por confiar en mí.

Gracias Chus. Siempre una palabra de ánimo a tiempo, una experiencia que compartir y una solución rápida a los problemas.

Emilio, de corazón y con el mayor cariño que se puede decir esta palabra, GRACIAS. Gracias por despertarme allá por el año 2005, gracias por matricularme en Jarvard (con J), gracias por darme collejas y palmadas, gracias por el fútbol, la política y la religión. Gracias por empujarme. Gracias por todo.

Este momento de mi vida tampoco habría llegado sin una persona que ha sido y es mi segunda madre, mi maestra, mi referencia en un día a día que poca gente conoce y mi amiga. Gracias Carmina. Por tu apoyo, tu empuje, tu capacidad de trabajo, tus consejos, tu confianza en mí y tu cariño.

No quiero dejar pasar la oportunidad para agradecer sus aportaciones en este trabajo al grupo de investigación dirigido por la Prof. Silvia Arribas, del Departamento de Fisiología de la UAM. Su ayuda ha sido imprescindible en el desarrollo de este proyecto.

Gracias también al grupo de investigación del Prof. Rainer H. Böger, de la Universidad de Hamburgo-Eppendorf, referente en el estudio de biomarcadores de riesgo cardiovascular. Su colaboración incondicional, mediante la medición de dichos biomarcadores, ha permitido dar explicación a los resultados del presente trabajo.

Gracias a Manolo, a Santi, a Miguel y a todas las personas que, en algún momento, han cuidado de mis ratitas.

Gracias a mis padres, por todo.

Gracias a mis hijos, Marta y Gonzalo. Gracias por vuestra comprensión y por vuestra confianza en mí. Cuando pensaba tirar la toalla (sólo pasó un par de veces) era en vosotros en quién pensaba para no rendirme y no dejar de esforzarme.

Gracias María. Gracias por estar a mi lado y por enseñarme a sentir. Gracias por apoyarme de forma incondicional. Te quiero.

Y por último, y de forma muy especial, gracias a mis compañeras en este viaje. Gracias a quienes más han sufrido la realización de esta tesis. Gracias a quienes es imposible agradecer como se merecen todo lo que han hecho por mí y por la ciencia. Creo haberlo hecho de la mejor forma y con el mayor respeto. Si no es así, lo siento de corazón. Gracias ratitas SHR y WKY. Gracias por todo.

ÍNDICE

Resumen	19
Abstract	25
Lista de Abreviaturas	31
1. Introducción	35
1.1 EL PROBLEMA CLÍNICO: LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL	37
1.2 REMODELADO VASCULAR	40
1.2.1 Estructura y propiedades mecánicas de la pared arterial	40
1.2.2 Definición, fisiopatología y tipos de remodelado vascular	42
1.2.3 Evolución clínica del remodelado vascular	51
1.2.4 Tratamiento del remodelado vascular	53
1.3 DRONEDARONA	60
1.3.1 Farmacología Básica	61
1.3.2 Efectos pleiotrópicos de la dronedarona	63
1.3.3 Evidencia clínica del uso de la dronedarona	65
1.4 LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA COMO MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL	67
1.5. JUSTIFICACIÓN	70

2. Hipótesis y Objetivos	73
2.1. HIPÓTESIS	75
2.2. OBJETIVOS	75
3. Material y Métodos	77
3.1. PROTOCOLO DEL ESTUDIO	79
3.1.1. Aspectos éticos y legales	79
3.1.2. Diseño del estudio	79
3.2. MATERIAL	80
3.2.1. Animal de experimentación	80
3.2.2. Fármacos	82
3.2.3. Material para el estudio fisiológico	82
3.2.4. Material para el estudio de la estructura de la aorta	83
3.2.5. Material para el estudio de las propiedades mecánicas de la aorta	85
3.2.6. Material para el estudio de biomarcadores de daño endotelial	85
3.3. MÉTODO	86
3.3.1. Método del estudio hemodinámico	86
3.3.2. Método del estudio de la estructura de la aorta	87
3.3.3. Método del estudio de las propiedades mecánicas de la aorta	90
3.3.4. Método del estudio de los biomarcadores de daño endotelial	92
3.3.5. Método estadístico.....	93

4. Resultados	95
4.1. EFECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y HEMODINÁMICOS	97
4.2. EFECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA AORTA	99
4.2.1 Cambios en la geometría de la aorta	99
4.2.2 Cambios en la estructura de las capas media y adventicia de la aorta	105
4.3. EFECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE LA AORTA	107
4.4. DRONEDARONA Y PARÁMETROS DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	111
5. Discusión	113
5.1. CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LA AORTA PRODUCIDOS POR LA DRONEDARONA	117
5.2. RESTAURACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE LA AORTA INDUCIDA POR LA DRONEDARONA	119
5.3. LA DRONEDARONA INDUCE CAMBIOS EN LOS BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	121
5.4. IMPLICACIONES CLÍNICAS	123
5.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	124

5.6. DÓNDE ESTAMOS Y A DÓNDE VAMOS	125
6. Conclusiones	127
7. Bibliografía	131
Anexo	159

Resumen

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial es una enfermedad sistémica que aumenta la morbimortalidad debido a su asociación con eventos cardiovasculares adversos. La hipertensión arterial mantenida produce el remodelado vascular, que consiste en cambios patológicos en la estructura y función de los vasos de conducción y de resistencia. Diferentes fármacos antihipertensivos han demostrado su eficacia en la regresión del remodelado vascular mejorando el pronóstico del paciente con esta enfermedad sistémica.

La dronedarona es un antiarrítmico (bloqueante multicanal) que se utiliza en la práctica clínica habitual para el tratamiento de la fibrilación auricular. Disminuye la incidencia de síndrome coronario agudo, así como de isquemia cerebral. Nuestro grupo de investigación ha demostrado en estudios previos, en un modelo experimental de hipertensión arterial primaria del humano (*spontaneously hypertensive rat*, la rata SHR), la regresión del remodelado cardíaco (hipertrofia ventricular izquierda) y el remodelado de la arteria coronaria tras la administración de dronedarona durante 14 días. Sin embargo, desconocemos el impacto de este fármaco sobre el remodelado de las grandes arterias, también llamadas arterias elásticas, como la aorta.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como hipótesis de trabajo planteamos que la administración de un antiarrítmico, la dronedarona, produce un efecto positivo sobre la regresión precoz del remodelado de la aorta torácica.

El objetivo general del presente trabajo es, por lo tanto, estudiar el efecto del tratamiento con un antiarrítmico, la dronedarona, en la regresión precoz del remodelado de la aorta torácica, en un modelo experimental de hipertensión arterial primaria (SHR). Siendo los objetivos específicos: 1) Analizar si el tratamiento con dronedarona afecta a la estructura de la aorta, 2) Estudiar las propiedades mecánicas pasivas de la aorta tras el anterior tratamiento, y 3) Evaluar el efecto del fármaco sobre diversos biomarcadores de disfunción endotelial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha desarrollado un estudio experimental con la rata genéticamente hipertensa SHR, macho de 10 meses de edad, y su control normotenso, la rata Wistar Kyoto (WKY). Las ratas SHR se aleatorizaron en tres grupos: un grupo de intervención que recibió tratamiento con dronedarona (SHR-D), un grupo de intervención que recibió amiodarona (SHR-A), y un grupo control hipertenso que recibió placebo (suero fisiológico) (SHR). Un cuarto grupo lo formó la rata WKY, control normotenso. Durante la administración del fármaco/placebo vía oral (14 días), se controlaron los parámetros fisiológicos (frecuencia cardíaca y presión arterial sistólica). Una vez finalizado el tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y la aorta torácica fue disecada para el estudio de su estructura, propiedades mecánicas y biomarcadores de daño endotelial.

El estudio de la estructura de la aorta se realizó mediante técnicas de histología (microscopía óptica) y microscopía confocal usando la tinción de orceína. Se estudió la geometría del vaso: diámetro interno (DI), diámetro externo (DE), grosor de pared (GP), relación grosor pared/diámetro interno (GP/DI), y área de la sección

del vaso (CSA). También se estudió la elastina mediante el cálculo de la densidad de volumen de las fibras elásticas de la capa media de la aorta.

El estudio de las propiedades mecánicas de la aorta (mecánica pasiva) se desarrolló mediante la realización de curvas tensión-deformación en segmentos arteriales introducidos en un baño de órganos. El cálculo del parámetro beta permitió estudiar la rigidez de la pared.

El estudio de dimetilarginina asimétrica (ADMA) y dimetilarginina simétrica (SDMA) se realizó en tejido arterial (aorta) con un nuevo método de cromatografía líquida utilizando un espectrómetro de masas cuadrupolar en tándem (LC-MS/MS).

RESULTADOS

La dronedarona produjo una disminución significativa de la presión arterial y frecuencia cardiaca en el grupo SHR-D con respecto al grupo control SHR. Las ratas que recibieron amiodarona presentaron el mismo comportamiento hemodinámico que las tratadas con dronedarona.

Con respecto a la estructura de la aorta, la dronedarona produjo una disminución del DE, GP (capa media), GP/DI y CSA en el grupo SHR-D con respecto al grupo control SHR. No se encontraron diferencias entre los grupos SHR-D y WKY en los parámetros GP y GP/DI. La amiodarona no produjo cambios en la estructura de la aorta.

La dronedarona produjo una disminución significativa de la densidad de volumen de las fibras elásticas y del parámetro beta en el grupo SHR-D respecto al grupo SHR control, no mostrando diferencias con las ratas WKY. La amiodarona no

mostró diferencias significativas en el grupo SHR-A respecto al grupo SHR control en ambos parámetros en el estudio de la mecánica pasiva de la aorta.

La administración de dronedarona no produjo cambios en la concentración de ADMA en las ratas SHR-D con respecto al grupo SHR control, sin embargo este fármaco normalizó el valor de SDMA, no encontrándose diferencias significativas de este valor entre las SHR-D y las ratas WKY.

CONCLUSIONES

1. La dronedarona produce regresión precoz del remodelado de la aorta en la SHR, modelo de hipertensión arterial primaria y daño vascular.
2. La aorta de la SHR tratada con dronedarona muestra diferencias estructurales significativas respecto a la de la rata hipertensa sin tratar. Estos cambios incluyen la disminución del grosor de la pared y de la capa media.
3. La dronedarona restaura las propiedades mecánicas pasivas de la aorta de la SHR, hasta equipararla con la rata normotensa. Este fármaco produce disminución del contenido de elastina y del parámetro beta.
4. El tratamiento con dronedarona induce cambios en el biomarcador de disfunción endotelial dimetilarginina simétrica disminuyendo su concentración en la aorta de la SHR. Sin embargo, no produce cambios en la dimetilarginina asimétrica.

Abstract

INTRODUCTION

Arterial hypertension is a systemic disease that increases morbidity and mortality due to its association with adverse cardiovascular events. Maintained arterial hypertension leads to vascular remodeling, characterized by pathological changes in the structure and function of conducting and resistance vessels. Various antihypertensive drugs have demonstrated their effectiveness in regressing vascular remodeling, thereby improving the prognosis of patients with this systemic disease.

Dronedarone is an antiarrhythmic (multichannel blocker) used in routine clinical practice for the treatment of atrial fibrillation. It reduces the incidence of acute coronary syndrome and cerebral ischemia. Our research group has previously demonstrated, in an experimental model of primary arterial hypertension in humans (spontaneously hypertensive rat, SHR), the regression of cardiac remodeling (left ventricular hypertrophy) and coronary artery remodeling after the administration of dronedarone for 14 days. However, the impact of this drug on the remodeling of large arteries, also known as elastic arteries, such as the aorta, remains unknown.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

As a working hypothesis, we propose that the administration of an antiarrhythmic drug, dronedarone, has a positive effect on the early regression of thoracic aorta remodeling.

The general objective of this study is, therefore, to investigate the effect of treatment with an antiarrhythmic drug, dronedarone, on the early regression of thoracic aorta

remodeling in an experimental model of primary arterial hypertension (SHR). The specific objectives are: 1) To analyze if dronedarone treatment affects the structure of the aorta, 2) To study the passive mechanical properties of the aorta after the aforementioned treatment, and 3) To evaluate the drug's effect on various biomarkers of endothelial dysfunction.

MATERIAL AND METHODS

An experimental study was conducted using genetically hypertensive male SHR rats, 10 months old, and their normotensive control, Wistar Kyoto (WKY) rats. The SHR rats were randomized into three groups: an intervention group receiving dronedarone treatment (SHR-D), an intervention group receiving amiodarone (SHR-A), and a hypertensive control group receiving a placebo (physiological saline) (SHR). A fourth group consisted of WKY normotensive rats. Physiological parameters (heart rate and systolic blood pressure) were monitored during oral drug/placebo administration (14 days). After completing the treatment, the rats were sacrificed, and the thoracic aorta was dissected for structural analysis, mechanical properties, and biomarker assessment.

The structure of the aorta was examined using histological techniques (optical microscopy) and confocal microscopy with orcein staining. Vessel geometry was analyzed, including inner diameter (DI), outer diameter (DE), wall thickness (WT), wall thickness-to-inner diameter ratio (WT/DI), and cross-sectional area (CSA). Elastic fibers in the middle layer of the aorta were studied by calculating their volume density.

Passive mechanical properties of the aorta were determined by performing stress-strain curves on arterial segments immersed in an organ bath. The beta parameter was calculated to assess wall stiffness.

The study of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) was conducted in arterial tissue (aorta) using a new liquid chromatography method with tandem quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS).

RESULTS

Dronedarone significantly reduced blood pressure and heart rate in the SHR-D group compared to the control SHR group. Rats receiving amiodarone exhibited the same hemodynamic behavior as those treated with dronedarone.

Regarding the structure of the aorta, dronedarone led to a reduction in DE, WT (middle layer), WT/DI, and CSA in the SHR-D group compared to the control SHR group. No differences were observed between the SHR-D and WKY groups in terms of WT and WT/DI. Amiodarone did not induce changes in aortic structure.

Dronedarone resulted in a significant decrease in the volume density of elastic fibers and the beta parameter in the SHR-D group compared to the control SHR group, with no differences compared to WKY rats. Amiodarone did not show significant differences in the SHR-A group compared to the control SHR group in both parameters in the study of aortic passive mechanics.

The administration of dronedarone did not produce changes in the concentration of ADMA in SHR-D rats compared to the control SHR group. However, this drug normalized the SDMA value, with no significant differences in this value between SHR-D and WKY rats.

CONCLUSIONS

1. Dronedarone induces early regression of aortic remodeling in SHR, a model of primary arterial hypertension and vascular damage.
2. The aorta of SHR treated with dronedarone shows significant structural differences compared to untreated hypertensive rats. These changes include a reduction in wall thickness and the middle layer.
3. Dronedarone restores passive mechanical properties of the aorta in SHR, making it comparable to normotensive rats. This drug leads to a decrease in elastin content and the beta parameter.
4. Treatment with dronedarone induces changes in the biomarker of endothelial dysfunction, symmetric dimethylarginine, reducing its concentration in the SHR aorta. However, it does not affect asymmetric dimethylarginine.

Lista de Abreviaturas

Ach	Acetilcolina
ADMA	Dimetilarginina Asimétrica
ARA II	Antagonistas de los Receptores de la Angiotensina II
AT1R	Receptores de Angiotensina-II-subtipo 1
AT2R	Receptores de angiotensina-II-subtipo 2
CAM	Moléculas de Adhesión Celular
CSA	<i>“Cross-Sectional Area”</i>
DE	Diámetro Externo
DI	Diámetro Interno
DM	Diabetes Mellitus
FC	Frecuencia Cardíaca
GP	Grosor de Pared
HTA	Hipertensión Arterial
HVI	Hipertrofia Ventricular Izquierda
IL	Interleucina
IECA	Inhibidor del Enzima Convertidor de la Angiotensina
MCP- 1	Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1
MMP	Metaloproteasas de la Matriz Extracelular
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
PAI	Inhibidor del Activador de Plasminógeno
PAS	Presión Arterial Sistólica
PCR	Proteína C Reactiva
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rat</i>
SDMA	Dimetilarginina Simétrica
SOD	Superóxido Dismutasa
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
WKY	<i>Wistar-Kyoto Rat</i>

1. Introducción

1.1 EL PROBLEMA CLÍNICO: LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Definición

La hipertensión arterial (HTA) se caracteriza por la observación repetida, en diferentes momentos, de cifras de presión arterial iguales o superiores a 140/90 mmHg, según criterios internacionales que la consideran como un problema de salud ¹. La HTA es una enfermedad crónica que termina afectando a múltiples sistemas.

La HTA puede ser, según su origen, primaria (esencial) o secundaria. La HTA esencial es de origen desconocido y multifactorial, participando tanto factores genéticos como estilos de vida ^{2,3}. Este tipo de HTA es el más frecuente en la población (90-95% de los casos de HTA). La HTA secundaria (5-10% de los casos de HTA) tiene un origen específico conocido, siendo las causas más frecuentes la enfermedad renovascular, la coartación aórtica, el hiperaldosteronismo de diversas causas o el uso de algunos fármacos.

Esta patología afecta aproximadamente al 20% de la población mundial, con una prevalencia aún mayor en España, llegando al 30%. Esta prevalencia aumenta considerablemente con la edad, superando el 75% en personas de 70 a 74 años ⁴. Esto la convierte en una de las enfermedades más comunes en la sociedad actual.

Evolución clínica y consecuencias de la hipertensión arterial

La hipertensión arterial mantenida tiene efectos significativos en diversos sistemas del cuerpo, incluyendo el corazón, los vasos sanguíneos, el sistema nervioso

central y los riñones, lo que aumenta significativamente la morbilidad y mortalidad en el paciente hipertenso ⁵.

La afección cardíaca resultante de la HTA se denomina cardiopatía hipertensiva e incluye una serie de alteraciones como la hipertrofia ventricular izquierda, la disfunción sistólica y diastólica, los problemas en la conducción eléctrica del corazón y la enfermedad arterial coronaria.

La presión arterial es el resultado de dos componentes principales: el gasto cardíaco y la resistencia periférica. Cualquier aumento en uno de estos componentes puede dar lugar a la HTA, si no se equilibra con una disminución en el otro. Inicialmente, el aumento de la presión arterial se debe principalmente a un incremento en la actividad del sistema nervioso simpático, lo que conlleva un aumento en el gasto cardíaco ^{6,7}. A medida que la enfermedad progresa, el gasto cardíaco se normaliza, y para mantener niveles similares de presión arterial, se produce una constricción de los vasos sanguíneos periféricos, lo que aumenta la resistencia total ⁸. Este aumento en la poscarga cardíaca conduce a un engrosamiento del músculo del ventrículo izquierdo del corazón, es la hipertrofia ventricular izquierda, HVI (hipertrofia celular y fibrosis). Esta hipertrofia es un mecanismo de adaptación del corazón frente al estrés que produce la HTA. Si la enfermedad no se controla adecuadamente aparecerá una segunda fase, de descompensación, en la que la microcirculación coronaria no aumenta de forma proporcional a la hipertrofia celular, dando lugar a fenómenos de isquemia-reperfusión y apoptosis de cardiomiocitos. Aparecerá la disfunción cardíaca, arritmias e isquemia miocárdica asociadas a la cardiopatía hipertensiva dilatada.

La HTA mantenida también afecta a los vasos. Se producen cambios en la morfología y desarrollo del vaso, se altera la función del endotelio, la proliferación de las células del músculo liso vascular, así como la síntesis de la matriz extracelular. Es lo que se denomina enfermedad vascular hipertensiva, cuyas consecuencias son la arterioesclerosis, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal e isquemia miocárdica ⁹.

Dado el impacto clínico de la cardiopatía y la enfermedad vascular hipertensivas, es crucial contar con herramientas para su diagnóstico en sus etapas iniciales, e identificar a pacientes de alto riesgo que requieran tratamiento. Numerosos estudios respaldan la idea de que un tratamiento temprano y apropiado mejora el pronóstico de estos pacientes ¹⁰. Diferentes fármacos antihipertensivos, dentro de los cinco grupos, [antagonistas del receptor de angiotensina II-subtipo 1 (ARA-II), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), bloqueantes del receptor adrenérgico β (β -bloqueantes), calcio-antagonistas y diuréticos] han mostrado su eficacia en la regresión de la hipertrofia ventricular izquierda, tras tratamientos de larga duración. En esta misma dirección, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que un bloqueante multicanal, la dronedarona, es capaz de revertir la HVI y el remodelado vascular coronario producidos por la HTA, en un modelo experimental de rata espontáneamente hipertensa (SHR, “*spontaneously hypertensive rats*”), tras dos semanas de tratamiento ^{11,12}. Otros fármacos, como el esmolol, betabloqueante cardioselectivo, mostró el mismo efecto sobre el corazón y los vasos (arteria coronaria y aorta) en la rata SHR, tras tan solo 48 horas de tratamiento ¹³⁻¹⁵.

1.2 REMODELADO VASCULAR

1.2.1 Estructura y propiedades mecánicas de la pared arterial

La pared de las arterias la constituyen tres capas concéntricas formadas por células (células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos) y una matriz extracelular ¹⁶:

Túnica íntima. Se encuentra en contacto con la sangre. Está formada por el endotelio propiamente dicho y la capa subendotelial. El endotelio lo constituye una monocapa de células endoteliales situadas sobre una membrana basal. Esta lámina basal microfibrilar está formada por colágeno tipo IV, elastina, fibronectina, laminina y proteoglicanos. La capa subendotelial está compuesta por tejido conectivo laxo y, en ocasiones, están presentes células de músculo liso. Separando la túnica íntima de la túnica media se encuentra la lámina elástica interna, compuesta por fibras elásticas que forman una estructura fenestrada.

Túnica media o muscular. Está formada células musculares lisas y tejido conectivo (principalmente fibras elásticas). Las fibras elásticas están organizadas en láminas fenestradas entre las que se sitúan las células musculares lisas, las fibras de colágeno y otros elementos de la matriz extracelular (proteoglicanos), constituyendo la unidad lamelar ¹⁷. El número de lamelas varía dependiendo del tipo de vaso (siendo mayor en las grandes arterias, y disminuyendo en las arterias de resistencia). La lámina elástica externa forma parte de la túnica media, constituyendo el límite entre ambas túnicas, media y adventicia.

Túnica adventicia o externa. Es la capa más externa del vaso, formada por fibroblastos y matriz extracelular rica en colágeno.

La matriz extracelular tiene diferentes funciones: una estructural (como soporte de las células de la pared vascular), otra relacionada con las propiedades mecánicas de la pared (responsable de la elasticidad y la resistencia al estiramiento) y, por último, una función reguladora de la biodisponibilidad de factores de crecimiento.

La matriz extracelular está formada por:

Colágeno. Proteína muy rígida que contribuye a la integridad estructural y resistencia mecánica de la pared del vaso. Un aumento del colágeno produce aumento de la rigidez del vaso, como ocurre en la HTA ^{18,19}.

Fibras elásticas. La función de estas fibras es dotar al vaso sanguíneo de elasticidad. Estas fibras se organizan formando las lamelas. El 90% de la fibra elástica lo forma la elastina, y el resto son glicoproteínas microfibrilares. En la HTA hay deposición de nuevas fibras elásticas en respuesta a una elevada tensión de la pared vascular, sin embargo, estas fibras no tienen la misma funcionalidad que las generadas durante la elastogénesis fisiológica ²⁰.

Matriz extracelular no fibrosa. Formada por glucoproteínas, hialuronanos y proteoglicanos constituyendo un gel viscoelástico.

Las propiedades mecánicas de la pared arterial son importantes en la regulación de la presión arterial, por lo que son de vital importancia en la enfermedad hipertensiva vascular. De los componentes de la pared del vaso, ya descritos anteriormente, la matriz extracelular fibrosa (formada por el colágeno y la elastina)

contribuye a las propiedades elásticas del vaso, a su mecánica pasiva, mientras que el componente celular contribuye a la mecánica activa ¹⁸. Las propiedades mecánicas del colágeno y la elastina son muy diferentes, el colágeno proporciona rigidez y resistencia a la tensión mientras que las fibras elásticas proporcionan resiliencia y elasticidad.

1.2.2 Definición, fisiopatología y tipos de remodelado vascular

El remodelado vascular, una desorganización de los componentes de la pared vascular alrededor de un lumen disminuido ²¹, hace referencia a un cambio activo, estructural y celular, generalmente adaptativo, que conlleva la producción y degradación de sustancias presentes en la matriz extracelular y crecimiento, muerte, proliferación y migración celular ²².

El índice de remodelado ²³ sirve para cuantificar el grado de remodelado vascular, y se define como la proporción de cambio del lumen responsable del total de remodelado del vaso. Las arterias que tienen la responsabilidad principal del remodelado en el individuo son arterias finas, las únicas en las que se puede encontrar un índice elevado²⁴. Existen dos tipos de remodelado vascular ²⁵⁻²⁷:

Hipertrófico concéntrico. En este caso, se observa una disminución del diámetro interno del lumen del vaso provocada por el engrosamiento de la pared arterial. Se caracteriza por un mayor área de la sección transversal de la arteria (cross-sectional area, CSA), disminuyendo el cociente entre el diámetro interno del vaso y

el grosor de la pared. En los casos de hipertensión secundaria como puede ser la hipertensión causada por hipertensión renovascular o la asociada a diabetes mellitus se observa de forma frecuente este tipo de remodelado ^{28,29}.

Eutrófico concéntrico: En este caso, sólo disminuye el lumen interno y externo, sin que el área de la sección transversal del vaso ni la pared del vaso se vean alteradas. Conlleva una disminución del cociente entre el diámetro interno y el grosor de la pared. Se produce debido a la apoptosis de células periféricas de la arteria unida a la vasoconstricción crónica ³⁰. Este tipo de remodelado vascular se encuentra principalmente en los casos de hipertensión esencial en humanos y el que se puede observar en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

En el remodelado vascular intervienen procesos como la inflamación, la apoptosis y el crecimiento celular o la fibrosis ²⁷, además de las variaciones en la composición de la matriz extracelular que median en la adaptación tisular ³¹. Estos procesos son, principalmente, los siguientes:

- **Apoptosis celular.** Aunque el impacto de los procesos apoptóticos en el proceso de remodelado vascular no está bien definido, si existen evidencias significativas de apoptosis de células musculares lisas en vasos sanguíneos de cerebro, riñón ³² o corazón ³³. En el modelo de rata SHR se han estudiado los procesos apoptóticos en ratas de diferentes edades. Dickhout

comprobó, en ratas SHR jóvenes, una reducción de los procesos de apoptosis en células de músculo liso en arterias de pequeño calibre, sugiriendo que esta disminución de tasa de apoptosis sería la responsable del aumento de la resistencia de los vasos por favorecer el crecimiento de la pared vascular ³⁴. También en ratas SHR se evidenciaron mayores valores de la tasa de apoptosis, del cociente entre el grosor de la pared y el diámetro interno del vaso, así como de la presión arterial, en ratas de 2-3 meses frente a ratas jóvenes de 1 mes ³⁵.

En el remodelado eutrófico concéntrico vascular en las ratas espontáneamente hipertensas es posible que existan procesos simultáneos de apoptosis y crecimiento celular. Esto podría llevar a un crecimiento celular en la capa interna de la pared del vaso unido a una reducción selectiva de células en la capa externa. Aunque se han identificado algunos de los mecanismos involucrados en la apoptosis, aún no se conocen todos los detalles de este proceso. Además, no está claro si la apoptosis es un evento primario o si es una respuesta compensatoria al crecimiento celular.

Algunos de los mecanismos que influyen en los eventos de apoptosis que afectan al remodelado son la rarefacción vascular, un proceso por el que desaparecen las arteriolas y capilares como resultado de la disminución de la densidad de microvasos periféricos, favoreciendo una alta resistencia periférica en casos de hipertensión arterial e incrementando el riesgo de isquemia ¹⁷⁸; y la activación de MMPs (metaloproteínas de la matriz extracelular, metaloproteasas), unas endopeptidasas dependientes de zinc que tienen la función de mantener la homeostasis de la pared del vaso.

- **Disfunción endotelial.** Esta situación es habitual en el caso de enfermedades vasculares, y se trata de un factor determinante en el desarrollo de arteriosclerosis. Los mecanismos principales que intervienen en la pérdida de función del endotelio son la disminución en la producción de NO (óxido nítrico) y el aumento de especies reactivas de oxígeno. La disfunción endotelial está relacionada con factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la hipertensión o la DM³⁶. Algunos de los mecanismos que influyen en la aparición de disfunción endotelial son:

Inflamación endotelial

La activación del endotelio desencadena una serie de respuestas que incluyen la liberación de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular. Estas sustancias tienen como objetivo interactuar con leucocitos y otras células inflamatorias en el cuerpo. El resultado final de esta interacción es promover la inflamación en los tejidos.

Al estudiar el modelo experimental de hipertensión arterial, se ha observado un aumento en la expresión de ciertas moléculas de adhesión, como las integrinas, así como la presencia elevada de proteínas inflamatorias como la proteína C reactiva (PCR) y proteínas con capacidad trombogénica, como la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1 o CCL2) y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) ³⁷. Estos efectos, causados por la activación endotelial, tienen dos resultados principales. En primer lugar,

contribuyen a alterar la estructura de los vasos sanguíneos, lo que incluye un aumento en la proliferación celular. Por otro lado, disminuyen la capacidad de los vasos sanguíneos para dilatarse en respuesta a señales endoteliales. En conjunto, estos procesos predisponen al desarrollo de eventos trombo-isquémicos que pueden causar daño en los tejidos ³⁸ . Alguno de los mecanismos asociados a la inflamación endotelial son:

a) Expresión de MCP-1: MCP-1 participa en la migración e infiltración de monocitos y macrófagos en el endotelio, activando factores de transcripción como NF- κ B y AP-1. Esto conduce a la expresión de interleucina 6 (IL-6) y promueve la proliferación de células musculares lisas ³⁹ .

b) Aumento en los niveles de PCR: La elevada expresión de PCR induce la adhesión y migración de leucocitos, estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión celular (CAM) ⁴⁰ . Esto se asocia comúnmente con un estado de coagulación y una disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) endotelial debido a la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial.

c) Aumento en el número de células inflamatorias en la capa adventicia: Este incremento se considera una fuente principal de radicales libres de oxígeno, que desempeñan un papel importante en la patología vascular ⁴¹ .

Expresión de moléculas de adhesión

En el contexto de la hipertensión arterial, se observa la activación de las células endoteliales, lo que resulta en la expresión de moléculas de adhesión celular, como integrinas, que tienen la capacidad de atraer células inflamatorias hacia la pared del vaso. En este momento se produce un aumento específico en la expresión de E-selectina. La E-selectina se considera un biomarcador de daño endotelial muy significativo.

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ⁴² se refiere a un desequilibrio entre los productos antioxidantes y prooxidantes en el cuerpo, lo que resulta en un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO). Este fenómeno está relacionado con la alteración de la capacidad de vasodilatación, la homeostasis celular alterada y el daño tisular ⁴³.

Estudios clínicos en pacientes con hipertensión arterial han demostrado que los niveles de presión arterial se relacionan directamente con la producción de biomarcadores de estrés oxidativo y se relacionan inversamente con los niveles de antioxidantes en el plasma ⁴⁴⁻⁴⁶.

Los principales procesos de estrés oxidativo implicados en el daño del endotelio son los siguientes:

a) Reducción de la biodisponibilidad de NO: El NO es una molécula señalizadora que regula varios procesos biológicos, incluyendo la presión arterial, la inhibición de la proliferación celular y la prevención de la

agregación plaquetaria ⁴⁷. La disminución de la biodisponibilidad de NO se debe en parte a la interferencia de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), que actúa como antagonista de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) (Fig. 1) ^{48,49}. Otro biomarcador como la dimetilarginina simétrica (SDMA) inhibe la síntesis de óxido nítrico pero indirectamente, ya que interfiere en la captación intracelular de la L-Arginina ⁵⁰.

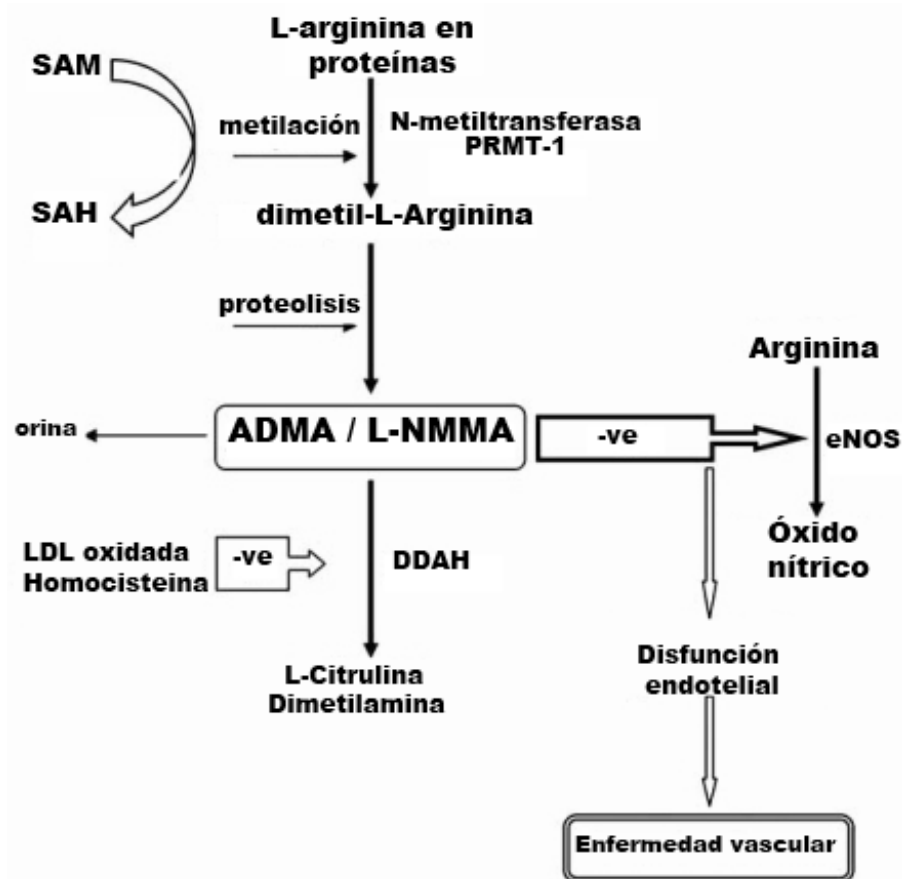


Figura 1 .Vía de L-Arginina-Óxido nítrico, y la implicación de ADMA (dimetilarginina asimétrica). Traducido de Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. Curr Cardiol Rev. 2010; 6(2): 82–90.

b) Aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS): En la hipertensión arterial, debido al aumento de enzimas como la xantina oxidasa o la NAPDH, se produce un aumento en la producción de ROS ⁵¹, moléculas derivadas del O₂ que pueden reaccionar, a través de procesos REDOX con otras moléculas orgánicas ⁵² lo que contribuye al remodelado vascular, la inflamación y la disfunción endotelial.

c) Disminución de las defensas antioxidantes: Se ha observado, en pacientes con hipertensión, una reducción en la expresión de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, como la superóxido dismutasa (SOD) o la vitamina E y el glutatión.

Expresión de Endotelina-1

La expresión de endotelina-1, una molécula vasoconstrictora, se ha encontrado elevada en diversos modelos experimentales de hipertensión, como en ratas tratadas con acetato de desoxicorticosterona ⁵³. Además, se ha observado un aumento en la expresión del RNA mensajero de la pre-pro-endotelina-1 en el endotelio de arterias de pequeño calibre en tejido subcutáneo glúteo en humanos ⁵⁴. Este incremento en los niveles de endotelina-1 se asocia con un remodelado vascular hipertrófico, que puede corregirse mediante el uso de antagonistas de la endotelina ⁵⁵. Cabe mencionar que la elevación de los niveles plasmáticos de aldosterona y/o la presión arterial activan la expresión de endotelina-1 en el endotelio vascular^{56,57}.

Vasoconstricción

La vasoconstricción crónica está estrechamente relacionada con los procesos inflamatorios en la hipertensión arterial. Esto conlleva procesos como la acumulación de fibronectina, la activación del depósito de colágeno. En estudios realizados en arterias mesentéricas de ratas, se demostró un remodelado concéntrico después de una exposición prolongada a la adrenalina durante 7 días ⁵⁸. Es importante destacar que este remodelado no guardaba relación con la presión intravascular sufrida en estas arterias.

- **Fibrosis de matriz extracelular.** El depósito de colágeno alrededor del vaso induce rigidez en la pared vascular. Este colágeno se observa claramente a nivel de vasos coronarios y de forma menos importante alrededor de la aorta y de las arterias mesentéricas ⁵⁹⁻⁶¹. Este depósito no es, en sí mismo, el responsable de la rigidez, sino que depende del grado de reclutamiento de las fibras de colágeno cuando aumenta la presión intravascular, como puede deducirse de la reducción de la rigidez observada en casos de hipertensión leve o moderada de pacientes jóvenes ^{62,63}.

Los procesos de fibrosis vascular son activados por mediadores como la aldosterona ⁶⁴ (induce depósito extracelular de colágeno tipo I), la angiotensina II ⁵⁷ (promueve producción de fibronectina y colágenos tipo I y II), el factor de crecimiento tisular β (TGF- β) (existen niveles más altos de este factor de crecimiento en ratas WKY ⁶⁵) y la endotelina-1.

- **Activación del eje renina-angiotensina-aldosterona, SRAA** ^{66,67}, está relacionada con el aumento de factores de transcripción y del estrés oxidativo, que conllevan la activación de transcripción de quimiocinas y citoquinas, así como de la amplificación de la respuesta inflamatoria. En la rata hipertensa alimentada con fructosa, un modelo de hipertensión asociada a síndrome metabólico, se demostró la existencia de una relación entre el SRAA y el remodelado vascular, al observarse marcadores de disfunción endotelial, hipertrofia y crecimiento celular en la pared de los vasos como son los cambios en la expresión de distintos subtipos de ATII.

1.2.3 Evolución clínica del remodelado vascular

El remodelado vascular es un proceso adaptativo que implica cambios en la estructura del vaso (cambios en la geometría y composición), producidos como respuesta a estímulos mecánicos, hemodinámicos o humorales.

La HTA se caracteriza por mantener presiones elevadas en el interior de los vasos sanguíneos. Inicialmente, esto se consigue aumentando el gasto cardiaco pero después se mantiene incrementando la resistencia de los vasos periféricos ⁷. En la HTA, el remodelado vascular comienza como una respuesta adaptativa para compensar estas presiones elevadas, pero con el tiempo (elevación crónica de la presión arterial) se convierte en un proceso desfavorable produciendo alteraciones patológicas de la pared vascular. En situaciones de HTA, los cambios en la geometría y la composición de la pared vascular (remodelado) modifican las propiedades funcionales, tanto activas (que dependen de las células) como pasivas

(determinadas por la matriz extracelular) de los vasos sanguíneos. Estas alteraciones estructurales son de gran relevancia clínica ya que se han asociado con una mayor incidencia de eventos cardiovasculares adversos ^{68,69}.

El remodelado vascular afecta a todos los vasos sanguíneos, pero el tipo de alteración difiere según el tipo de vaso. En las grandes arterias (como la aorta) se produce una pérdida de elasticidad, debida a la hipertrofia de la pared y a las alteraciones en su composición, por la fragmentación y calcificación de las fibras elásticas y un mayor depósito de colágeno ¹⁹. En las arterias de resistencia se produce un estrechamiento de la luz, a veces acompañado de hipertrofia de la pared, por hiperplasia o hipertrofia de las células musculares lisas, así como por una mayor deposición de colágeno ⁷⁰. Las alteraciones estructurales en los vasos tienen un valor predictivo importante en pacientes con hipertensión. Se ha demostrado de manera convincente que aquellos pacientes con mayor relación entre el grosor de la pared del vaso y su diámetro interno tienen una mayor probabilidad de sufrir eventos cardiovasculares, como infarto agudo de miocardio o accidentes cerebrovasculares. Actualmente, encontrar formas efectivas de revertir estos cambios morfológicos se considera una de las principales metas en la investigación en el campo cardiovascular.

1.2.4 Tratamiento del remodelado vascular

Regresión del remodelado vascular

Como la vasoconstricción crónica es un mecanismo de remodelado arterial concéntrico, podemos desarrollar la hipótesis de que el uso de antihipertensivos que induzcan vasodilatación debería producir un remodelado arterial excéntrico, es decir, el efecto contrario. Este tipo de remodelado produciría una disminución del daño tisular y de los eventos isquémicos asociados a la HTA⁷.

La evidencia para respaldar esta hipótesis proviene de estudios in vivo realizados usando las arterias mesentéricas de ratas con hipertensión inducida por adrenalina. En estos estudios, la administración de amlodipino, un fármaco vasodilatador, logró revertir el remodelado vascular que se había desarrollado en respuesta a la hipertensión ⁷¹. Aunque en investigaciones posteriores con otros tipos de fármacos antihipertensivos han corroborado estos resultados, todavía no se han aclarado completamente los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la reversión del remodelado vascular causado por estos medicamentos.

La variabilidad en la eficacia de los diferentes fármacos vasodilatadores en la normalización de la estructura vascular puede estar relacionada con la expresión de subtipos específicos de NADPH oxidasas (como nox1, nox2 y nox4) y /sus subunidades correspondientes en las células de músculo liso y endotelio ⁷². Esto podría explicar por qué algunos fármacos, como los calcio-antagonistas, IECAs o ARA-II, muestran efectos beneficiosos en la normalización de la estructura

vascular, mientras que otros, como los β -bloqueantes, no logran este efecto en pacientes con HTA ⁷³.

Terapias en la regresión del remodelado vascular

En ensayos clínicos aleatorizados que se han llevado a cabo en pacientes con HTA, se ha observado que el tratamiento antihipertensivo puede prevenir la aparición de eventos cardiovasculares. Un aspecto crucial en esta protección radica en la capacidad del tratamiento para revertir el remodelado vascular. Se ha comprobado que en este grupo de pacientes, simplemente normalizando la presión arterial sin lograr una reversión del remodelado con nitroglicerina, no mejora el pronóstico ⁷⁴. La evidencia sugiere que la regresión del remodelado vascular en la hipertensión arterial puede manifestarse de diversas maneras, dependiendo del tipo de vasodilatador utilizado y del tipo de arteria que se esté estudiando:

- **Regresión del remodelado en arterias de gran calibre (arterias elásticas, la aorta):**

Algunos medicamentos antihipertensivos como los calcioantagonistas, la espironolactona, los antagonistas del receptor de la angiotensina II o los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, parecen influir en las propiedades estructurales de las arterias de conducción. Estos medicamentos ⁷⁵ estimulan la apoptosis de las células musculares lisas en la aorta torácica de ratas con hipertensión espontánea. En contraste, la hidralazina, a pesar de su capacidad hipotensora, no ha demostrado este efecto ⁷⁶. La relación entre la apoptosis y el remodelado vascular es aún objeto de investigación, con resultados contradictorios en la literatura.

Antihipertensivos como los IECA, los nitratos, la espironolactona, los β -bloqueantes, los calcioantagonistas y los ARA-II, han demostrado reducir la rigidez de la pared vascular ⁷⁷⁻⁷⁹. Esta reducción de la rigidez arterial disminuye la resistencia vascular periférica, lo que a su vez conlleva una reducción en la presión de pulso a nivel central en la aorta.

Un estudio preclínico (en modelo animal) publicado por nuestro grupo de investigación investigó los efectos del esmolol, un β -bloqueante cardioselectivo, en el remodelado de la aorta torácica ⁸⁰. Se observó una regresión del remodelado estructural, caracterizada por una reducción de la rigidez de la aorta junto con una disminución en el grosor de la pared y el área del vaso, tras la administración de esmolol durante dos días.

Los mecanismos conocidos que participan en la regresión del remodelado vascular incluyen los siguientes:

Reversión de la rigidez

La capacidad vasodilatadora de los nitratos logra este efecto⁷⁹. En contraste, otros fármacos mencionados anteriormente, a través de mecanismos antifibróticos, aumentan la complianza vascular, especialmente mediante la inhibición del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1). Esta reducción en la rigidez arterial conlleva una disminución en la impedancia vascular, lo que resulta, en última instancia, en una reducción de la presión de pulso en la aorta.

Bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

ARA-II y IECAs ejercen su acción bloqueando el eje renina-angiotensina-aldosterona. Esto reduce los niveles intracelulares de calcio (Ca^{2+}), la actividad de la enzima NADPH oxidasa y la proteína tirosina cinasa Pyk-2 al evitar la activación del receptor tipo 1 de angiotensina II (AT1R). Además de este efecto, estos medicamentos también influyen en otros mecanismos relacionados con el remodelado vascular. Cabe mencionar que la aldosterona promueve el depósito de colágeno, y por lo tanto, la administración de un antagonista de la aldosterona, como la eplerenona, puede reducir la rigidez arterial en arterias tanto de gran calibre como de pequeño calibre ⁸¹⁻⁸².

Cambios en la distensibilidad del vaso

El atenolol y otros β -bloqueantes inducen modificaciones en la distensibilidad de los vasos ⁸³. Esto incluye un aumento de la presión de pulso por una reducción en la frecuencia cardíaca y una vasoconstricción periférica ⁸⁴. Esta podría ser la razón de la menor eficacia de los β -bloqueantes, en comparación con los medicamentos que inhiben el SRAA, en la prevención de eventos cardiovasculares ⁸⁵.

- **Regresión del remodelado en arterias de pequeño calibre (arterias musculares):**

Cambios en la estructura de los vasos

Las transformaciones en el remodelado de las arterias de pequeño calibre subcutáneas pueden servir como indicadores confiables de los cambios observados en otros vasos similares, como las arterias coronarias ⁸⁶⁻⁸⁸. La evidencia ⁸⁹⁻⁹⁵ revela que ARA-II, IECA y ciertos calcioantagonistas contribuyen a restaurar la estructura normal de las arterias de pequeño calibre en el tejido subcutáneo glúteo de pacientes diagnosticados con HTA. No obstante, vale la pena mencionar un estudio ⁷⁶ que presenta un enfoque diferente al mostrar que el verapamilo puede aumentar la cantidad de células musculares lisas apoptóticas en las arterias coronarias de ratas con hipertensión inducida por adrenalina. Además, se ha constatado que la espironolactona reduce la rigidez de las arterias de pequeño calibre en individuos hipertensos ⁸¹. Este efecto se deriva de la disminución en la acumulación de colágeno y de la modificación de la relación colágeno/elastina en la pared de los vasos, como respuesta al tratamiento farmacológico. Asimismo, en personas que padecen diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) ^{96,97}, la intervención que bloquea el sistema renina-angiotensina-aldosterona mediante IECA y ARA-II también se traduce en mejoras en el remodelado de las arterias de pequeño calibre. Un dato interesante es que un agonista selectivo del receptor AT2R, denominado compuesto 21, ha demostrado su capacidad para reducir la acumulación de colágeno en torno a la aorta y las arterias coronarias, al tiempo que reduce la rigidez de los

vasos de pequeño calibre. Además, este compuesto mejora la función endotelial en un modelo de ratas espontáneamente hipertensas propensas a padecer accidentes cerebrovasculares. Este efecto se ve amplificado cuando se combina con un tratamiento paralelo con ARA-II, independientemente de su influencia sobre la presión arterial ⁹⁸. Sin embargo, se ha observado que los β -bloqueadores no parecen tener un impacto positivo en la estructura de los vasos de pequeño calibre ⁹⁹. No obstante, estudios preclínicos realizados por nuestro grupo de investigación indican que el esmolol promueve la regresión en el remodelado de las arterias intramiocárdicas y las arterias coronarias después de 48 horas de tratamiento ¹⁰⁰.

Cambios en la función de los vasos

Varios estudios sugieren que la terapia antihipertensiva puede contribuir a mejorar la función deteriorada de las arterias de pequeño calibre, una condición frecuentemente asociada a la HTA. Los datos recopilados hasta la fecha sugieren que la normalización de la función endotelial depende en gran medida del tipo de fármaco antihipertensivo utilizado, más que de su efecto sobre la presión arterial. Por ejemplo, se ha documentado que la administración de enalapril o amlodipino resulta en una mejora de la relajación inducida por la acetilcolina (ACh) ⁵⁹. Hallazgos similares se han observado con los calcioantagonistas ^{94,95} y con ARA-II ¹⁰¹. No obstante, la literatura científica muestra resultados variables ya que, aunque el tratamiento agudo con IECA no ha mostrado mejoras en la función endotelial *in vivo* ^{102,103}, el tratamiento crónico con cilazapril durante 2 años demostró

ser capaz de producir una normalización *in vitro* en la función de las arterias de pequeño calibre en seres humanos ¹⁰⁴. Los ARA-II también han demostrado su capacidad para normalizar la función endotelial en un modelo experimental de DM temprana ¹⁰⁵. Sin embargo, en casos de DM tipo 2 combinada con hipertensión, la terapia multimodal con ARA-II y calcioantagonistas no mostró beneficios significativos en la función vascular, a pesar de que logró corregir parcialmente las alteraciones estructurales de los vasos ⁹⁶. En cuanto a los β -bloqueadores, el esmolol mejoró la relajación inducida por Ach ¹⁰⁶.

- **Efecto sobre las arteriolas:**

Las arteriolas, con diámetros internos menores a 100 μm , desempeñan un papel importante en el aumento de las resistencias vasculares en la hipertensión ¹⁰⁷. En algunos modelos experimentales, se ha demostrado que los IECA tienen la capacidad de revertir la rarefacción, que es una reducción en la densidad de los vasos de pequeño calibre asociada con un aumento en la resistencia arterial periférica.

La evidencia disponible sugiere que los medicamentos antihipertensivos pueden influir en el remodelado vascular de diferentes maneras, dependiendo del tipo de medicamento y del tipo de arteria en estudio. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender completamente estos procesos y sus implicaciones clínicas.

1.3 DRONEDARONA

La dronedarona es un fármaco antiarrítmico que ha surgido recientemente y es un derivado de la amiodarona. Al igual que la amiodarona, pertenece a la familia de los derivados del benzofurano y tiene la capacidad de bloquear múltiples canales iónicos, lo que le otorga sus propiedades antiarrítmicas. La principal diferencia entre la dronedarona y la amiodarona radica en la ausencia de dos grupos de yodo en la primera, los cuales son responsables de la toxicidad tiroidea o pulmonar que se observa en la segunda. Además, la dronedarona contiene un grupo metilsulfonamida que disminuye su afinidad lipofílica y, como resultado, su vida media (Fig. 2). En resumen, la dronedarona es un fármaco con una menor incidencia de efectos secundarios y una vida media más corta que la amiodarona.

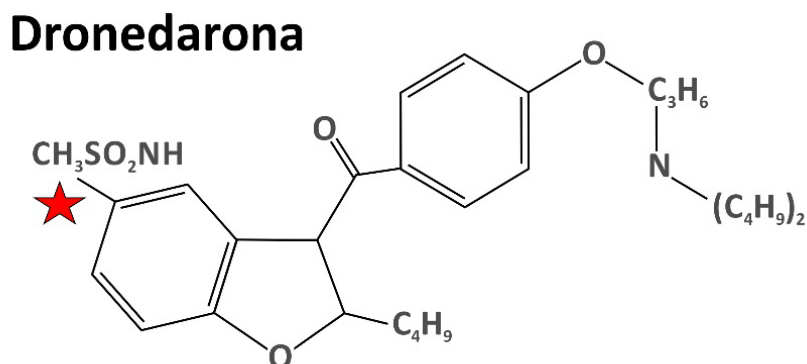


Fig 2. Estructura química de la dronedarona. Tadros R et al. Dronedarone: Basic Pharmacology and Clinical Use. Card Electrophysiol Clin 2016; 8(2):453-65.

1.3.1 Farmacología Básica

Farmacocinética de Dronedaron

La dronedarona es un fármaco que se absorbe rápidamente por vía oral (70-94%). Su biodisponibilidad total es solo del 15% debido al metabolismo hepático. Aunque tiene un metabolito activo, la N-desbutil-dronedaron, este es mucho menos potente. La concentración máxima de dronedarona se alcanza aproximadamente 4 horas después de su ingestión, y debido a su menor solubilidad en grasas, su vida media es de solo 24 horas (en contraste con la amiodarona, que tiene una vida media mucho más larga, de semanas). Al administrar la dosis estándar de 400 mg dos veces al día, se logra el estado de equilibrio en 7 días. La dronedarona se une en gran medida a proteínas (98%) y se elimina a través de las heces en forma de metabolitos, gracias a la acción del citocromo CYP3A4 hepático¹⁰⁸.

Farmacodinámica de Dronedaron

La dronedarona, al igual que la amiodarona, afecta a múltiples corrientes iónicas, alterando así las propiedades electrofisiológicas de las células cardíacas. Los principales canales sobre los que actúa^{109,110} incluyen la corriente de calcio de tipo L (ICaL), los componentes rápido (IKr) y lento (IKs) de la corriente rectificadora tardía de potasio, la corriente de marcapasos (If), la corriente de entrada de sodio (INa), la corriente de potasio dependiente de acetilcolina (IK, Ach) y el canal de entrada rectificador de potasio (IK1).

La inhibición de estos canales por la dronedarona da lugar a los siguientes efectos en el corazón:

- **Inhibición de la actividad auricular reentrante:** La dronedarona prolonga el potencial de acción al inhibir canales de potasio ¹¹¹. Esto le confiere propiedades antiarrítmicas de la clase III de Vaughan-Williams. La prolongación del potencial de acción auricular dificulta la actividad de un circuito de reentrada, aunque puede aumentar el riesgo de extrasistolia ventricular o arritmias ^{112,113}.
- **Inhibición del automatismo auricular:** La dronedarona reduce la excitabilidad celular y la tasa de ectopias al inhibir la corriente de entrada de sodio (INa). Esto se clasifica como un efecto de clase Ic de Vaughan-Williams y es más pronunciado en las células auriculares. Además, la dronedarona tiene un efecto cronotrópico negativo y dromotrópico negativo, ralentizando la conducción a través del nodo auriculoventricular y reduciendo la respuesta ventricular en pacientes con fibrilación auricular. La dronedarona también inhibe la corriente de calcio I_{CaL} y la corriente de intercambio Na⁺/Ca²⁺ (INCX), lo que puede ser beneficioso en pacientes con FA, pero podría tener efectos negativos en la función cardíaca en general ¹¹⁴.

1.3.2 Efectos pleiotrópicos de la dronedarona

Interacciones farmacológicas de dronedarona

La dronedarona interactúa con otros fármacos debido a su capacidad para inhibir el citocromo CYP3A4, la glicoproteína P y el citocromo CYP2D6, lo que lleva a varias interacciones farmacológicas significativas:

- Interacción con Ketoconazol: El ketoconazol, al ser un inhibidor del CYP3A4, puede aumentar de manera notable los niveles sanguíneos de dronedarona. Por esta razón, se debe evitar el uso simultáneo de dronedarona y antifúngicos, antibióticos macrólidos o inhibidores de la proteasa. Sin embargo, es posible combinar dronedarona con inhibidores moderados del citocromo, como el verapamilo o el diltiazem, bajo una supervisión estricta.
- Interacción con Simvastatina: La dronedarona aumenta los niveles sanguíneos de simvastatina hasta cuatro veces debido a su acción sobre el CYP3A4. Por lo tanto, se debe prestar atención a la posible aparición de efectos secundarios y miopatía al combinar estos dos medicamentos.
- Interacción con Digoxina: Como se mencionó anteriormente, la dronedarona inhibe la glicoproteína P, que está involucrada en el metabolismo de la digoxina. Si se necesita combinar ambos medicamentos, se deben usar dosis más bajas de digoxina y monitorear los niveles sanguíneos de la misma.
- Interacción con Metoprolol: Debido a su acción sobre el citocromo, la dronedarona puede aumentar discretamente la biodisponibilidad del metoprolol.

- Interacción con Nuevos Anticoagulantes: La combinación de dronedarona con nuevos anticoagulantes como dabigatrán, rivaroxabán o apixabán debe realizarse con precaución, ya que puede afectar su eficacia. Sin embargo, no se han observado cambios en los niveles de INR con warfarina o acenocumarol ¹¹⁵.
- Interacción con medicamentos que prolongan el QT: Aunque el riesgo de arritmia con dronedarona es bajo, se debe evitar su combinación con fármacos que puedan prolongar el intervalo QT.

Efectos Secundarios de Dronedarona

- Los efectos secundarios más comunes son cutáneos y gastrointestinales, como diarrea, náuseas y vómitos, generalmente de intensidad leve.
- Debido a la inhibición del transporte tubular de creatinina, puede provocar un falso incremento en los niveles de la misma.
- Puede causar bradicardia y prolongación del intervalo QT.
- Se recomienda vigilar la función hepática en pacientes que reciben tratamiento crónico con dronedarona debido a que se han reportado casos graves de hepatotoxicidad ^{116,117}.

1.3.3 Evidencia clínica del uso de la dronedarona

La dronedarona es un fármaco principal para mantener el ritmo sinusal después de la cardioversión de la fibrilación auricular, tanto paroxística como persistente, según

las Guías de Práctica Clínica del American Heart/American College of Cardiology¹¹⁸ y de la Sociedad Europea de Cardiología¹¹⁹.

La Ficha Europea de Características del Producto indica que su uso debe ser pautado y supervisado por profesionales con experiencia en el manejo de antiarrítmicos. Esto significa que se requiere la supervisión de un cardiólogo durante el tratamiento. Debe interrumpir el uso de dronedarona en caso de que aparezca un nuevo episodio de fibrilación auricular durante el tratamiento y se descarte la reversión del ritmo.

La Agencia Europea del Medicamento, basándose en los resultados del estudio ANDROMEDA, considera contraindicado el uso de dronedarona en pacientes con insuficiencia cardíaca en clase NYHA III o IV o con disfunción ventricular moderada, así como en pacientes hemodinámicamente inestables. En pacientes con insuficiencia cardíaca en clase NYHA I o II, el uso de dronedarona solo se consideraría cuando no existan otras alternativas.

La dronedarona se ha considerado segura en casos de hipertrofia ventricular izquierda o cardiopatía isquémica, al no relacionarse con efectos proarrítmicos significativos. Durante el estudio ATHENA¹²⁰, se observó una reducción significativa en los ingresos por síndrome coronario agudo, posiblemente debido a la reducción de la frecuencia cardíaca, que conlleva una disminución del consumo de oxígeno y una prolongación de la diástole, lo que favorecería el flujo coronario. Además, la dronedarona tiene efectos antihipertensivos debido a su acción bloqueadora de los receptores α adrenérgicos, lo que podría reducir la

vasoconstricción relacionada con la isquemia miocárdica en pacientes con enfermedad coronaria.

En un estudio experimental con cerdos ¹²¹ sometidos a isquemia controlada en la arteria coronaria descendente anterior, se observó que la dronedarona redujo el tamaño del infarto, aunque el mecanismo exacto aún no se comprende completamente. Se cree que podría estar relacionado con la capacidad del fármaco para reducir la acumulación tóxica de calcio intracelular.

Además, un subestudio del ensayo ATHENA sugirió un efecto no descrito para ningún otro fármaco antiarrítmico: la reducción de la incidencia de accidentes cerebrovasculares. Aunque los mecanismos involucrados no se comprenden completamente, se cree que podrían estar relacionados con el efecto antiarrítmico del fármaco, así como con la reducción de la presión arterial y la frecuencia cardíaca. También se ha observado una reducción en el tamaño del infarto cerebral en modelos de ratas ¹²².

Otro efecto descrito es la utilidad de la dronedarona en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, gracias a la interferencia con el metabolismo del calcio y la síntesis de esteroides de membrana de *Trypanosoma cruzi* ¹²³. También se ha observado un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Leishmania mexicana*, aún más potente que sobre *T. cruzi* ¹²⁴.

1.4 LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA COMO MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La rata SHR se derivó de la cepa Wistar Kyoto (WKY) a principios de los años 60, por el Dr. Okamoto, mediante la selección y el cruce endogámico de descendientes que desarrollaban hipertensión arterial espontánea ¹²⁵. Por otro lado, la cepa de ratas WKY se estableció en 1971 como una colonia de control normotenso también a partir de cruces consanguíneos ¹²⁶. Ambas cepas tienen diferencias genéticas significativas, comparable a la máxima divergencia posible que puede existir entre personas no emparentadas ¹²⁷.

La cepa de rata SHR posee similitudes con la hipertensión humana, como la elevada presión arterial, aumento de resistencias periféricas, las alteraciones hemodinámicas y una respuesta adecuada al tratamiento con fármacos que disminuyen esa hipertensión.

Como ocurre en humanos, existe un dimorfismo sexual en el desarrollo de la hipertensión ¹²⁸, que aparece de forma más rápida y se hace más severa en machos que en hembras ¹²⁹, además de encontrarse aumento de la rigidez y dilatación del ventrículo izquierdo ¹³⁰. Por estas razones, es la rata SHR macho la que se usa como modelo animal de hipertensión arterial.

El modelo experimental de las ratas SHR macho sigue una serie de etapas bien definidas en el desarrollo de la hipertensión:

Durante los primeros 1-2 meses de vida, las ratas SHR son prehipertensas con una tensión arterial sistólica de 100-120 mm Hg. En esta fase, las SHR tienen un gasto cardíaco aumentado con resistencias vasculares sistémicas normales.

Durante los siguientes 3-4 meses, desarrollan de forma progresiva hipertensión arterial con cifras de tensión sistólica superiores a 150 mmHg. A las 11 y 27 semanas de edad, las ratas SHR tienen una presión arterial media de 135 y 150 mmHg, en contraste con la presión de 100 y 105 mmHg en las ratas normotensas WKY ¹³¹. Progresivamente se produce un remodelado de los vasos sanguíneos que produce aumento de las resistencias periféricas y el gasto cardíaco se normaliza.

Durante la mayor parte de su esperanza de vida de 2-2.5 años, las ratas SHR permanecen en un estado de hipertensión crónica caracterizada por el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda como mecanismo compensatorio. La rata SHR adulta presenta hipercontractilidad con aumento de la función ventricular izquierda debido al aumento progresivo de la hipertrofia ventricular.

La rata SHR también presenta, como ocurre en el humano, alteraciones en el metabolismo miocárdico, con supresión del consumo normal de ácidos grasos que es desplazado hacia un aumento del consumo de glucosa. Esta alteración se considera una consecuencia de la hipertrofia, ya que aparece después del desarrollo de las alteraciones estructurales del miocardio.

A los 12-24 meses de edad, aproximadamente 2 de cada 3 ratas SHR desarrollan insuficiencia cardíaca congestiva con disminución de la actividad, del autocuidado y del cepillado, taquipnea y respiración dificultosa ¹³². En esta etapa, las ratas SHR presentan un aumento del volumen y una reducción de la contracción del ventrículo izquierdo y desarrollan hipertrofia ventricular derecha y derrame pleural y pericárdico.

Este patrón de enfermedad tiene varias características que convierten a la rata SHR en un excelente modelo de investigación. La uniformidad genética, similitud con la hipertensión esencial humana, progresión predecible de la enfermedad y capacidad para estudiar diversos parámetros cardiovasculares son ventajas notables.

Sin embargo, este modelo experimental tiene limitaciones, como el largo tiempo necesario para el desarrollo de la enfermedad, las diferencias en la edad de inicio en comparación con los humanos (la enfermedad aparece en adultos jóvenes) y la complejidad de la cría y el manejo de los animales.

La manipulación de los animales debe ser muy cuidadosa, utilizando elementos de protección y seguridad para evitar mordiscos, ya que la respuesta a técnicas de habituación y manejo periódico es levemente positiva.

En la práctica, las hembras reproductoras SHR son más sensibles a cualquier cambio en el macroambiente y microambiente. Cambios de estaciones, cambio en el personal técnico y cuidador, cambios en el lecho o en la alimentación aumentan la frecuencia de canibalismo, debiendo mantener una estabilidad alta en los parámetros antes mencionados. Todos los elementos de enriquecimiento ambiental deben ser conocidos por el animal para que durante la gestación y la lactancia no aparezcan elementos novedosos. Además, se debe mantener a la hembra con la camada sin manipular hasta, al menos, los 14 días, sobre todo en madres primerizas y jóvenes. Nunca puede realizarse un cruce continuo debido a la

posibilidad de que el macho ataque a los neonatos por lo que no se pueden aprovechar elementos como el estro postparto para optimizar la reproducción.

A pesar de estas limitaciones, el modelo de rata SHR ha sido y es una de las principales herramientas para comprender los mecanismos subyacentes a la hipertensión y probar nuevos enfoques terapéuticos.

1.5. JUSTIFICACIÓN

Tras el análisis previo de la literatura encontramos que:

- La HTA es una enfermedad sistémica que aumenta la morbimortalidad debido a su asociación con eventos cardiovasculares adversos. Es una de las patologías con mayor prevalencia en la sociedad actual.
- La HTA crónica produce el remodelado vascular. Este consiste en cambios patológicos en la estructura y función de los vasos de conducción y de resistencia.
- El tratamiento antihipertensivo puede prevenir eventos cardiovasculares al producir regresión del remodelado vascular.
- La dronedarona es un antiarrítmico (bloqueante multicanal), que se utiliza en la práctica clínica habitual para el tratamiento de la FA. Disminuye la incidencia de síndrome coronario agudo así como de isquemia cerebral.
- Nuestro grupo de investigación ha demostrado en estudios previos (en modelo animal) la regresión del remodelado cardíaco (HVI) y remodelado

coronario tras la administración de dronedarona durante 14 días. Sin embargo, desconocemos el impacto de este fármaco sobre el remodelado de las grandes arterias, también llamadas arterias elásticas, como la aorta.

Estas afirmaciones nos han llevado a la pregunta: ¿la dronedarona produce regresión precoz del remodelado de la aorta?

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. HIPÓTESIS

Como hipótesis de trabajo planteamos, que la administración de un antiarrítmico, la dronedarona (bloqueante multicanal), produce un efecto positivo sobre la regresión precoz del remodelado de la aorta torácica (Ha) en un modelo experimental de rata hipertensa, asumiendo como hipótesis nula (H0) el hecho de que el fármaco no produzca dicho efecto.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Estudiar el efecto del tratamiento con un antiarrítmico, la dronedarona, en la regresión precoz del remodelado de la aorta torácica, en un modelo experimental de hipertensión arterial primaria (SHR).

2.2.2 Objetivos específicos

- i. Analizar si el tratamiento con dronedarona afecta a la estructura de la aorta.
- ii. Estudiar las propiedades mecánicas pasivas de la aorta tras el anterior tratamiento.
- iii. Evaluar el efecto del fármaco sobre diversos biomarcadores de disfunción endotelial.

3. Material y Métodos

3.1. PROTOCOLO DEL ESTUDIO

3.1.1. Aspectos éticos y legales

El animal seleccionado para nuestro estudio es la rata SHR (rata hipertensa espontánea, que desarrolla hipertensión arterial de origen genético), macho de 10 meses de edad, peso 300-350 gr. Toda manipulación de los animales se ha llevado a cabo según las normas recogidas en la Directiva 2010/63/UE y RD 53/2013 *por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos incluyendo la docencia*, y por personal cualificado con capacitación para la realización de las funciones requeridas.

El estudio tiene el dictamen favorable del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) y Comité de Investigación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Ha sido aprobado por la Autoridad Competente con el número PROEX 110/17.

3.1.2. Diseño del estudio

Se ha desarrollado un trabajo experimental dentro de la línea de investigación (“Búsqueda de nuevas terapias en la regresión del remodelado cardiovascular”)^{11-13,133} de nuestro grupo, adscrito al Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (Código de Grupo 7.16B). En este trabajo se estudia el efecto de la dronedarona en la estructura, propiedades mecánicas de la aorta, y en los

biomarcadores de daño endotelial, en un modelo animal de cardiopatía hipertensiva.

El animal seleccionado para el estudio es la rata genéticamente hipertensa SHR, y su control normotenso, la rata Wistar Kyoto (WKY). Las ratas SHR se aleatorizaron en tres grupos: un grupo de intervención que recibió tratamiento con dronedarona (SHR-D), un grupo de intervención que recibió amiodarona (SHR-A), y un grupo control hipertenso que recibió placebo (suero fisiológico)(SHR-C). Un cuarto grupo lo formó la rata WKY, control normotenso. Durante la administración del fármaco/placebo vía oral (14 días), se controlaron los parámetros fisiológicos (frecuencia cardíaca y presión arterial sistólica). Una vez finalizado el tratamiento, las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación, previamente sedadas con diazepam (4 mg/kg) y Ketamina (10 mg/kg) intraperitoneal. Finalmente, la aorta torácica fue disecada para el estudio de su estructura y propiedades mecánicas. Y segmentos de aorta fueron enviados al Departamento de Farmacología y Toxicología Clínica en la Universidad Medical Center Hamburg-Eppendorf, en Alemania, para el estudio de los biomarcadores de daño endotelial.

3.2. MATERIAL

3.2.1. Animal de experimentación

Se han empleado ratas macho de 10 meses de edad de las cepas SHR (SHR/NHsd, Laboratorio Harlan S.A. Barcelona) y WKY (WKY/NHsd, Laboratorio Harlan S.A.,

Barcelona), criadas y estabuladas en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (número de Registro ES-28079-0000097). Las ratas fueron alimentadas con *pellets* de pienso estándar y agua *ad libitum*, y permanecieron en condiciones controladas de luz (ciclo 12 horas luz / 12 horas de oscuridad), humedad (40%) y temperatura (24°C).

El trabajo se ha realizado en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid). Esta Unidad dispone de un animalario (nº de registro: ES-28079-0000087), incluido en el Registro Oficial de Establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales para la experimentación y otros fines científicos de la Comunidad de Madrid según la Orden de 4 de agosto de 1989 (BOCM de 24 de agosto). También dispone de instalaciones adecuadas para el desarrollo del proyecto, entre las que se encuentran salas de microcirugía y laboratorios de biología molecular. Parte del estudio se ha realizado en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y el Departamento de Farmacología y Toxicología Clínica en la Universidad Medical Center Hamburg-Eppendorf, en Alemania.

Se han empleado un total de 32 animales distribuidos en cuatro grupos:

Grupos	WKY	SHR-C	SHR-D	SHR-A
Nº animales	8	8	8	8

Tabla 1. Distribución del número de animales por grupos experimentales. WKY, Wistar Kyoto (control normotenso); SHR-C, rata espontánea hipertensa (control hipertenso); SHR-D, SHR tratada con dronedarona; SHR-A, SHR tratada con amiodarona.

3.2.2. Fármacos

- Hidrocloruro de dronedarona (Multaq, Sanofi-Aventis, Barcelona), comprimidos de 400 mg. La dosis administrada fue de 100 mg/kg vía oral una dosis cada 24h. La duración del tratamiento fue de 14 días.
- Amiodarona (Trangorex, Sanofi-Aventis, Barcelona). La dosis administrada fue de 30 mg/kg vía oral una dosis cada 24h. La duración del tratamiento fue de 14 días.
- Diazepam (Valium, Roche Pharmaceuticals, Madrid), 4 mg/kg intraperitoneal, dosis única.
- Ketamina (Ketolar, Parke-Davis, Madrid), 10 mg/kg intraperitoneal, dosis única.

3.2.3. Material para el estudio fisiológico

- Balanza de tres barras (OHAUS, U.S.A.) calibrada para uso en pequeños animales.
- Estufa para animal pequeño (JP Selecta S.A., España).
- Dispositivo para medir la presión arterial y la frecuencia cardíaca: Pletismógrafo NIPREM 645 (CIBERTEC S.A., España), y ordenador con el software NIPREM 1.5 para el análisis de los datos.

3.2.4. Material para el estudio de la estructura de la aorta

Estudio histológico y microscopía óptica

Equipo utilizado para la realización del estudio histológico:

- Baño termostático Selecta Mod Precisdig.
- Dispensador de parafina “Dispenser” (temperaturas regulables desde ambiente +5 hasta 100 °C) (Cód. 4000490).
- Estufa “Heraeus” (C.R. MARES, S.A, Madrid).
- Microtomo mecánico Leica modelo JUNG RM 2025.
- Portas (Menzel-Glaser 24 x 32 mm, 24 x 40 mm).
- Plantilla puntos-rayas con bordes de inclusión-exclusión ¹³⁴.
- Microscopio óptico (Leica DMLB).
- Cámara de vídeo de alta resolución (Sony CCD IRIS).
- Monitor de vídeo (Sony TRINITRON KX-14CP1).
- Programa de tratamiento de imagen y montaje: programa Adobe Photoshop CS2.

Soluciones y reactivos utilizados para el procesamiento histológico y realización de la tinción de orceína:

- DePeX (Gurr, England, Prod. 361254D).

- Tampón formalina al 4%.
- Etanol 70°, 96° y 100° (absoluto).
- Acetato de butilo.
- Xilol.
- Parafina: Parafín M.P 55-58°C (Panreac, Ref. 256993).
- Paraplast Plus, Tissue Embedding Medium (McCormick Scientific, Ref 502004).
- Orceína (Panreac, Cód. 261324. Cód. 251324.1604)
- Alcohol clorhídrico 1% (etanol 70% 1 L y Ácido clorhídrico 10 cc).

Estudio de microscopía confocal

Equipo utilizado para la realización del estudio de microscopía confocal:

- Microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), acoplado a un microscopio invertido con fuentes de láser argón y helio-neón.
- MetaMorph Image Analysis Software (Universal Imaging, Co., UK).

Soluciones y reactivos:

- Marcador nuclear DAPI (1:500 de la solución 5 mg/mL, Life technologies).
- Paraformaldehído (PFA) 4%.
- Citifluor (AF2, Aname, España).

3.2.5. Material para el estudio de las propiedades mecánicas de la aorta

- Baños de órganos que contienen solución Krebs Henseleit (KH): Glucosa, NaCl, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄ 7H₂O, NaHCO₃, EGTA 0,1M.
- Solución fisiológica contenida en los baños de órganos burbujeada continuamente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂).
- Transductor de fuerza (Piodem controls LTD. Dynamometer. Cibertec SA. España).
- Sistema de adquisición de datos Lab Chart Scope V5 (AD Instruments).
- Termocirculador (Techna TE1 Tempeltes).

3.2.6. Material para el estudio de biomarcadores de daño endotelial

- Varian 1200L espectrómetro de masas triple cuadrupolo (Varian, Walnut Creek, California, USA).
- -Columna cromatográfica: Chirobiotic T, 20 mm de longitud x 1 mm de diámetro interno (Astec, Whippany, NJ, USA).

3.3. MÉTODO

3.3.1. Método del estudio hemodinámico

Se midió la presión arterial sistólica (PAS) y la frecuencia cardíaca (FC) a todos los animales siguiendo las recomendaciones establecidas para los animales de experimentación ¹³⁵.

Las mediciones se realizaron con el animal consciente, mediante pletismografía (método no invasivo). El sistema lo constituye un sensor fotoeléctrico (que se coloca en la cola del animal) que detecta la radiación infrarroja asociada al aumento de la temperatura que produce el pulso, y la convierte en una señal eléctrica que se procesa con un software. Para hacer la medición se utiliza una banda elástica que comprime la cola de la rata hasta que desaparece el flujo de la arteria caudal. La presión en la banda neumática se reduce de forma controlada hasta que reaparece la onda de pulso, que es el momento de la PAS. La frecuencia de las ondas del pulso permite medir la frecuencia cardíaca.

A continuación se describe el protocolo de medición de la PAS y la frecuencia cardíaca:

- Inicialmente los animales fueron colocados en cajas termostáticas durante 20 min, a una temperatura de 37°, sin humedad, para conseguir la vasodilatación de las arterias caudales.
- Posteriormente el animal se colocó en un cepo que deja la cola libre. Se puso en la cola la banda neumática (esfingomanómetro) y el transductor fotoeléctrico (pinza-sensor) para la medición de la PAS y la frecuencia cardiaca respectivamente. El manguito del esfingomanómetro se colocó en la cola del animal, lo más próximo al cuerpo, y la pinza-sensor se situó más alejada del manguito.
- Se realizaron numerosas mediciones y el resultado se consideró válido cuando se obtuvo una serie de 10 medidas consecutivas con una señal de buena calidad y un resultado dentro del rango de 10 mmHg.

Esta técnica puede ocasionar estrés en el animal, lo que podría resultar un sesgo, por lo que previa recogida de datos, se realizaron durante 3 días mediciones consecutivas de PAS y frecuencia cardiaca en cada animal para conseguir su adaptación al método de medición.

3.3.2. Método del estudio de la estructura de la aorta

Método histológico

El estudio de la estructura de la aorta mediante histología se realizó de acuerdo a trabajos previos realizados por nuestro grupo ¹³.

Inicialmente se disecó la aorta torácica (descendente) en 8 animales por grupo de estudio (WKY = 8, SHR = 8, SHR-D = 8, SHR-A = 8). En cada animal, un segmento de 1 mm de longitud se fijó en formaldehído al 4%. Cada segmento se sometió a un proceso de deshidratación con concentraciones crecientes de solución alcohólica y, por último, acetato de butilo. A continuación, la pieza fue embebida en parafina, y se realizaron cortes histológicos seriados de 5 μ m de grosor. Estos cortes se tiñeron con la tinción de orceína para el estudio de la geometría y la elastina de la aorta.

- *Método de tinción con Orceína*

Cada preparación se desparafinó en la estufa a 60 °C y se pasó a Xilol. Posteriormente, se procedió a la hidratación en concentraciones decrecientes de alcoholes y a su lavado en agua destilada. Se embebió en una solución de Orceína durante 30 min a 60 °C, con posterior lavado con agua destilada. A continuación, se sumergió en etanol 96% y se lavó con agua corriente. Finalmente, se procedió a la tinción con Hematoxilina y posterior deshidratación en concentraciones crecientes de alcoholes hasta llegar a Xilol para montar las preparaciones con DePeX para estudio.

Tras el proceso de preparación, la tinción con orceína permitió visualizar:

- La geometría de la aorta mediante el microscopio óptico Leica DMLB (objetivo 4x) equipado con la cámara digital Sony CCD IRIS.
- La medición del diámetro interno (DI, mm) y diámetro externo de la aorta (DE, mm) permitieron el cálculo de las variables según estudios previos realizados por Yokoyama y cols¹³⁶.

- Grosor de pared o GP (capas íntima, media y adventicia):

$$GP \text{ (mm)} = (DE - DI)/2$$

- Relación grosor pared/diámetro interno (GP/DI), expresada en porcentaje:

$$GP/DI \text{ (\%)} = GP/DI \times 100$$

- *Cross Sectional Area* o área de la sección del vaso (CSA):

$$CSA \text{ (mm}^2\text{)} = (\pi/4) \times (DE^2 - DI^2)$$

- La elastina de la aorta mediante el microscopio óptico Leica DMLB (objetivo 40x) equipado con la cámara digital Sony CCD IRIS. El análisis morfométrico usando el método de Gundersen y cols. ¹³⁴ permitió el cálculo de la densidad de volumen de las fibras elásticas (%) de la capa media de la aorta.

Método de microscopía confocal

El estudio del grosor de las capas media y adventicia de la pared de la aorta torácica se realizó mediante microscopía confocal siguiendo el protocolo realizado en trabajos previos por nuestro grupo ¹³. Se estudiaron 8 animales por grupo de ratas (WKY = 8, SHR = 8, SHR-D = 8, SHR-A = 8).

- *Procesamiento de la muestra*

Segmentos de aorta torácica (descendente) se fijaron en paraformaldehído al 4%. Cada segmento fue sometido a un corte transversal (anillo) y otro longitudinal (en la zona media del vaso para dividirlo en dos partes longitudinales iguales) que se tiñó con el colorante nuclear DAPI (1:500 de una solución 5 mg/mL). Los segmentos longitudinales se lavaron durante 10 minutos en solución salina, luego se sumergieron en la solución con DAPI durante 15 minutos, y por último se hicieron

2 lavados con solución salina durante 10 minutos cada uno. El anillo y las dos partes longitudinales del vaso fueron montados en portas con citifluor. El montaje de las secciones longitudinales se realizó con la capa adventicia hacia arriba (en contacto con el cubreobjetos).

- *Visualización y cuantificación del grosor de las capas media y adventicia*

Para cuantificar el grosor de la capa media, los anillos fueron visualizados (usando una microscopio confocal) con un objetivo 20x y zoom de 2, a la longitud de onda de 488 nm excitación, 515 nm emisión. Se capturaron 3 regiones distintas de la pared. El grosor de la capa media se cuantificó (con el programa MetaMorph) midiendo la distancia entre la lámina elástica interna y externa de los anillos.

Para cuantificar el grosor de la capa adventicia se emplearon los segmentos longitudinales de aorta. En cada arteria se procedió a analizar, de forma aleatoria, 3 regiones por cada sección longitudinal, visualizando las imágenes (con un microscopio confocal) con un objetivo 20x y zoom de 4, a la longitud de onda de 405 nm excitación, 410-475 nm emisión. De cada región se capturaron las imágenes correspondientes a cortes seriados (de 1 μm de grosor) de la adventicia (desde su parte externa hasta la primera célula de la zona media). La cuantificación del grosor de la capa adventicia se realizó (mediante el Programa MetaMorph) en el conjunto de imágenes seriadas.

3.3.3. Método del estudio de las propiedades mecánicas de la aorta

El estudio de las propiedades mecánicas de la aorta (mecánica pasiva) se desarrolló mediante la realización de curvas tensión-deformación en segmentos arteriales siguiendo el método de Angus y cols. ¹³⁷.

Se utilizaron segmentos de 3 mm de longitud de la aorta torácica (descendente) en 8 animales por grupo de estudio (WKY = 8, SHR = 8, SHR-D = 8, SHR-A = 8). Los segmentos arteriales fueron suspendidos en dos alambres paralelos colocados dentro de la luz del vaso (ambos de acero rígido, de 168 μm de diámetro), uno fijado a la pared del baño y el otro (que puede desplazarse de manera paralela al primero) conectado a un transductor de fuerza. El transductor se conectó a un amplificador y a un sistema de adquisición de datos Lab Chart Scope V5 en el que se registraron los cambios de tensión producidos por estiramientos sucesivos del segmento arterial.

Los segmentos arteriales se introdujeron en baños de órganos que contienen 1ml de solución Krebs Henseleit libre de calcio, para el registro de la tensión isométrica. La temperatura del baño de órganos se mantiene constante a 37°C, mediante una doble pared por donde circula agua procedente de un termocirculador. La solución fisiológica contenida en los baños de órganos es burbujeada continuamente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) para proporcionar el oxígeno necesario y mantener un pH fisiológico (7.3-7.4).

Método de tensión isométrica en un baño de órganos

Inicialmente, los alambres introducidos en la luz vascular se separan hasta tocar la pared vascular pero sin generar tensión, reajustándose la separación entre alambres (durante un periodo de 60-90 minutos) hasta lograr su completa estabilización (T=0). Posteriormente, los segmentos arteriales se someten a estiramientos sucesivos de 200 μm (transcurriendo 3 minutos entre cada

estiramiento) hasta la rotura del vaso o hasta el máximo permitido por el sistema, registrándose la tensión isométrica desarrollada en cada uno de ellos.

Para el estudio de las propiedades mecánicas pasivas de la aorta se analizó la relación tensión/deformación siguiendo el método de Angus y cols.¹³⁷:

- Cálculo de L_i (deformación calculada como circunferencia interna del vaso en cada estiramiento x_1, x_2, \dots, x_i):

$$L_i = (\pi + 2) d + 2 (f_i)$$

d , diámetro de los alambres (mm); f_i , separación entre ellos (mm).

- Cálculo de T_i (tensión circunferencial de la pared):

$$T_i = F_i / 2g$$

F_i , fuerza de la pared; g , longitud del segmento (3 mm)

- Los valores de F_i y f_i en cada estiramiento se utilizaron para calcular T_i y L_i (aplicando las anteriores fórmulas). Y los valores de T_i y L_i fueron ajustados mediante una ecuación exponencial usando un análisis de regresión no lineal:

$$T_i = A e^{\beta L_i}$$

Donde el parámetro beta (β) indica el grado de rigidez de la pared vascular, mostrándonos la mecánica pasiva de la arteria.

3.3.4. Método del estudio de los biomarcadores de daño endotelial

El estudio de dimetilarginina asimétrica (ADMA) y dimetilarginina simétrica (SDMA) se realizó en tejido arterial (aorta) de 8 animales por grupo de estudio (WKY = 8, SHR = 8, SHR-D = 8, SHR-A = 8). La determinación de ambos biomarcadores se realizó con un nuevo método de cromatografía líquida utilizando un espectrómetro de masas cuadrupolar en tándem (LC-MS/MS) ^{138,139}. Las muestras se analizaron en una placa de microfiltración de 0,20 µm de 96 pocillos. Se realizó la conversión a sus derivados de éster de butilo. Los resultados fueron estudiados con un varian 1200L espectrómetro de masas triple cuadrupolo en el modo positivo de ionización por electrospray (ESI+).

3.3.5. Método estadístico

Tamaño muestral

Por razones propias del modelo experimental utilizado, y teniendo en cuenta estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación ¹³, se incluyó un total de 32 ratas en una proporción 1:3 control/problema, y de esta manera se aseguró tener un mínimo de 8 ejemplares por grupo a estudiar.

Análisis estadístico

Inicialmente usamos el test de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución normal de las variables cuantitativas. En caso afirmativo, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) (en caso negativo se hubiera procedido a la utilizaron de los test

no-paramétricos). El ANOVA fue utilizado para estudiar si existían diferencias significativas entre los cuatro grupos de estudio en lo que respecta a los parámetros fisiológicos, estructurales (microscopía óptica y microscopía confocal), propiedades mecánicas de la aorta y de disfunción endotelial analizados. Se utilizó la corrección de Bonferroni (Post hoc). El coeficiente de correlación de Pearson permitió medir la relación estadística entre la concentración de SDMA en la aorta y el grosor de pared.

Los resultados obtenidos se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media aritmética (SEM). Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. En todos los casos, los valores para rechazar la hipótesis nula fueron de $\alpha = 0.05$ y potencia $(1 - \beta) = 80\%$. El análisis estadístico se llevó a cabo con los programas GraphPad Prism (Version 5) y SPSS (Version 20).

4. Resultados

4.1. EFECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y HEMODINÁMICOS

La Tabla 2 muestra los datos obtenidos en las mediciones del peso, frecuencia cardiaca y presión arterial sistólica de los cuatro grupos de animales (WKY, SHR, SHR-D, SHR-A) tras 14 días de tratamiento/placebo.

El peso fue significativamente superior en las ratas normotensas (WKY) que en las SHR, independientemente que fueran tratadas con placebo (SHR), dronedarona (SHR-D), o con amiodarona (SHR-A). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al peso entre los grupos SHR, SHR-D y SHR-A.

Las ratas WKY y SHR presentaron valores similares de FC, sin embargo las tratadas con dronedarona mostraron una FC significativamente inferior a la observada en los otros dos grupos no tratados (WKY y SHR). Las ratas que recibieron amiodarona presentaron el mismo comportamiento que las tratadas con dronedarona en lo que respecta a la FC.

Las ratas SHR de 10 meses de edad utilizadas en el presente estudio mostraron una elevación significativa de la PAS con respecto a las ratas WKY de la misma edad. La dronedarona produjo una disminución significativa de la PAS en el grupo SHR-D con respecto a su grupo control SHR. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en este parámetro entre los grupos SHR-D y WKY. Las ratas que recibieron amiodarona presentaron el mismo comportamiento que las tratadas con dronedarona en lo que respecta a la PAS.

Tabla 2. Peso, presión arterial sistólica y frecuencia cardiaca en los cuatro grupos de estudio tras el periodo de tratamiento

	WKY (n=8)	SHR (n=8)	SHR-D (n=8)	SHR-A (n=8)
Peso (g)	441.13 ± 10.21	390.92 ± 5.12**	387.85 ± 3.82**	385.14 ± 3.15**
PAS (mmHg)	138 ± 15	178 ± 20**	145 ± 10##	143 ± 20##
FC (lat/min)	400 ± 24	395 ± 17	315 ± 14***,###	324 ± 21***,###

PAS: presión arterial sistólica; FC: frecuencia cardiaca. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: **P<0.01 vs. WKY, ***P<0.001 vs. WKY, ## P<0.01 vs. SHR, ###P<0.001 vs. SHR. Los valores se expresan como media ± SEM.

4.2. EFECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA AORTA

4.2.1 Cambios en la geometría de la aorta

Los resultados de la estructura de la aorta obtenidos mediante el estudio histológico (microscopía óptica) se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cambios en la geometría de la aorta en los cuatro grupos de estudio

	WKY (n=8)	SHR (n=8)	SHR-D (n=8)	SHR-A (n=8)
DI (mm)	1.50 ± 0.01	1.83 ± 0.01***	1.84 ± 0.01***	1.76 ± 0.02***
DE (mm)	1.76 ± 0.01	2.32 ± 0.02***	2.16 ± 0.01***,###	2.29 ± 0.05***,§§
GP (mm)	0.12 ± 0.009	0.24 ± 0.009***	0.16 ± 0.007###	0.26 ± 0.01***,§§§
GP/DI(%)	8.44 ± 0.64	13.13 ± 0.51***	8.68 ± 0.40###	15.02 ± 1.04***,§§§
CSA (mm ²)	0.65 ± 0.04	1.57 ± 0.07***	1.01 ± 0.04**,###	1.70 ± 0.14***,§§§

DI: diámetro interno; DE: diámetro externo; GP: grosor de pared; GP/DI: ratio GP/DI; CSA: área de la sección de corte. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: **P<0.01 vs. WKY, ***P<0.001 vs. WKY, ### P<0.001 vs. SHR, §§P<0.01 vs SHR-D, §§§P<0.001 vs SHR-D. Los valores se expresan como media ± SEM.

El diámetro interno (DI) de la aorta fue significativamente menor en la rata WKY que en las ratas SHR, SHR-D y SHR-A. La administración de dronedarona no produjo cambios significativos en el DI en el grupo SHR-D respecto al grupo SHR control. La administración de amiodarona tampoco produjo cambios significativos en el grupo SHR-A respecto al grupo SHR control (Fig. 3).

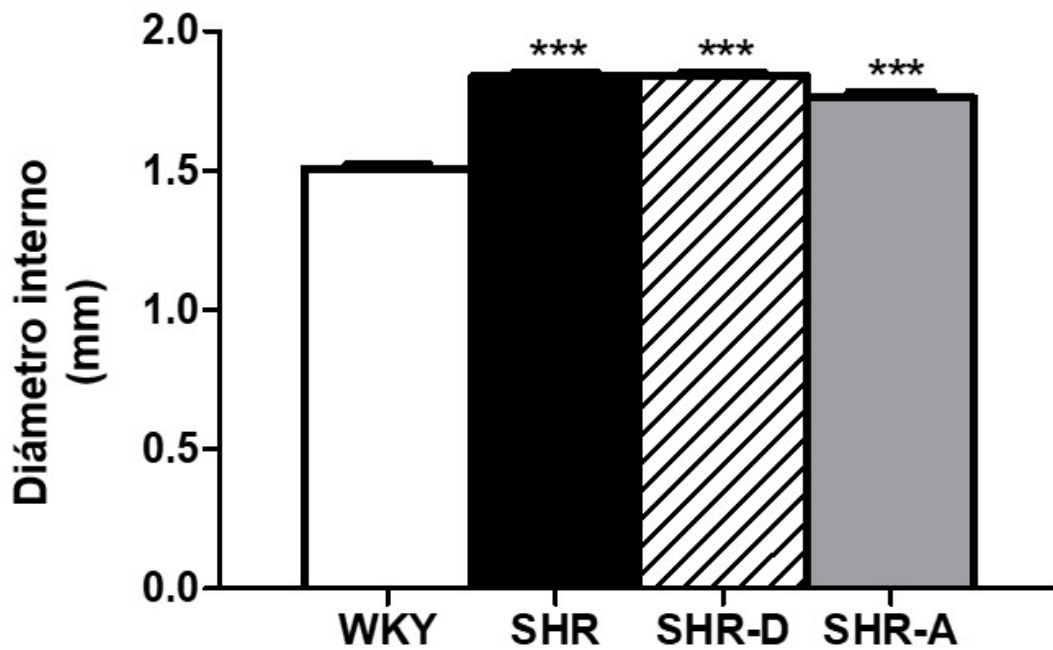


Figura 3. Diámetro interno de la aorta. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: *** $P < 0.001$ vs. WKY. Los valores se expresan como media \pm SEM. $n = 8$ ratas por grupo.

El diámetro externo (DE) de la aorta fue significativamente mayor en la rata WKY que en las ratas SHR, SHR-D y SHR-A. La administración de dronedarona produjo una disminución significativa de dicho parámetro en el grupo SHR-D respecto al grupo SHR control. Sin embargo, la amiodarona no produjo cambios significativos en el DE en el grupo SHR-A con respecto al grupo SHR control (Fig. 4)

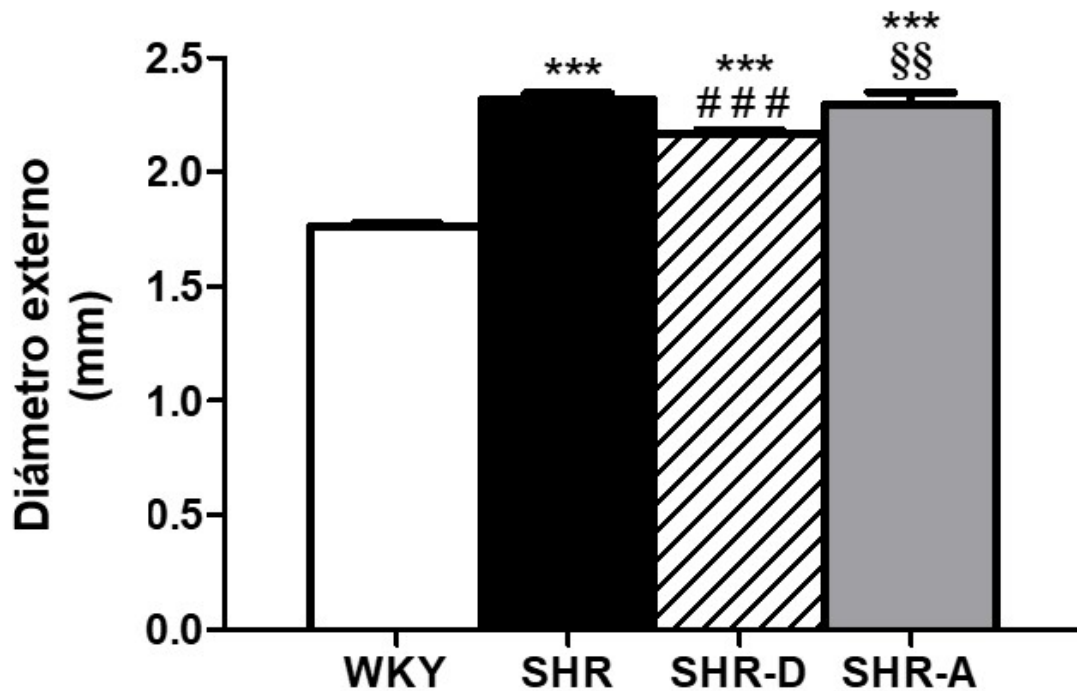


Figura 4. Diámetro externo de la aorta. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: *** $P < 0.001$ vs. WKY, ### $P < 0.001$ vs. SHR, §§ $P < 0.01$ vs SHR-D. Los valores se expresan como media \pm SEM. $n = 8$ ratas por grupo.

El grosor de pared (GP) de la aorta (capas íntima, media y adventicia) fue significativamente mayor en el grupo SHR control con respecto al grupo WKY. Sin embargo, la administración de dronedarona produjo una disminución significativa de dicho parámetro en el grupo SHR-D con respecto al grupo SHR control. No encontramos diferencias significativas en el GP entre los grupos WKY y SHR-D. Tampoco encontramos diferencias significativas tras la administración de amiodarona en el grupo SHR-A con respecto al grupo SHR control (Fig. 5).

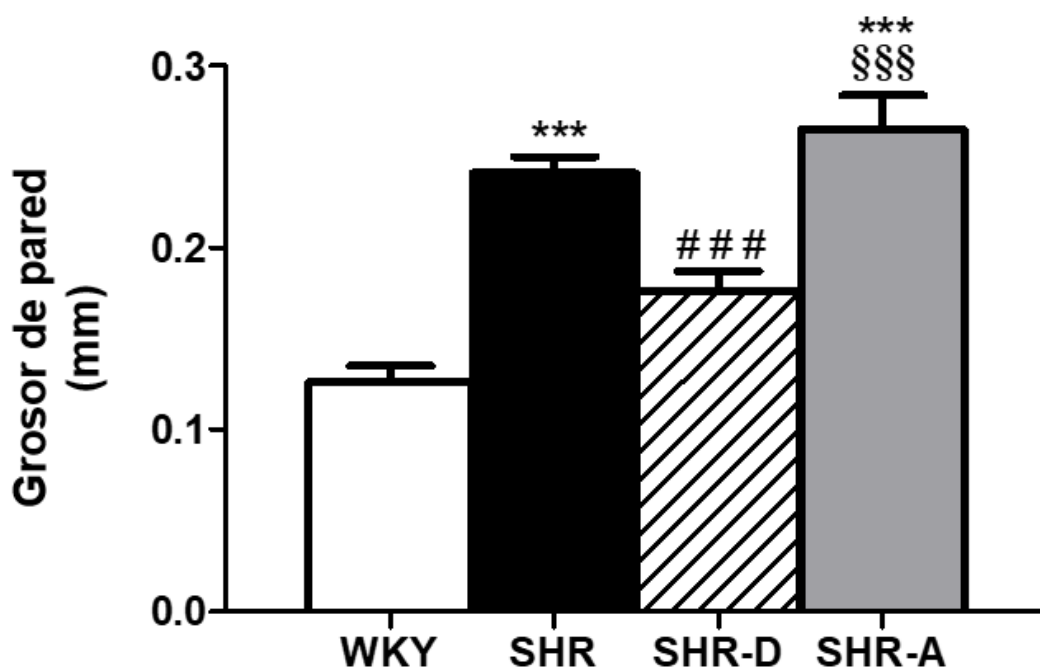


Figura 5. Grosor de pared de la aorta. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: *** $P < 0.001$ vs. WKY, ### $P < 0.001$ vs. SHR, §§§ $P < 0.001$ vs SHR-D, §§§ $P < 0.001$ vs SHR-D. Los valores se expresan como media \pm SEM. $n = 8$ ratas por grupo.

El área de la sección de corte del vaso (CSA) fue significativamente menor en la rata WKY que en las ratas SHR, SHR-D y SHR-A. La administración de dronedarona produjo una disminución significativa de dicho parámetro en el grupo SHR-D con respecto al grupo SHR control. Sin embargo, la amiodarona no produjo cambios significativos en CSA en el grupo SHR-A con respecto al grupo SHR control (Fig. 6).

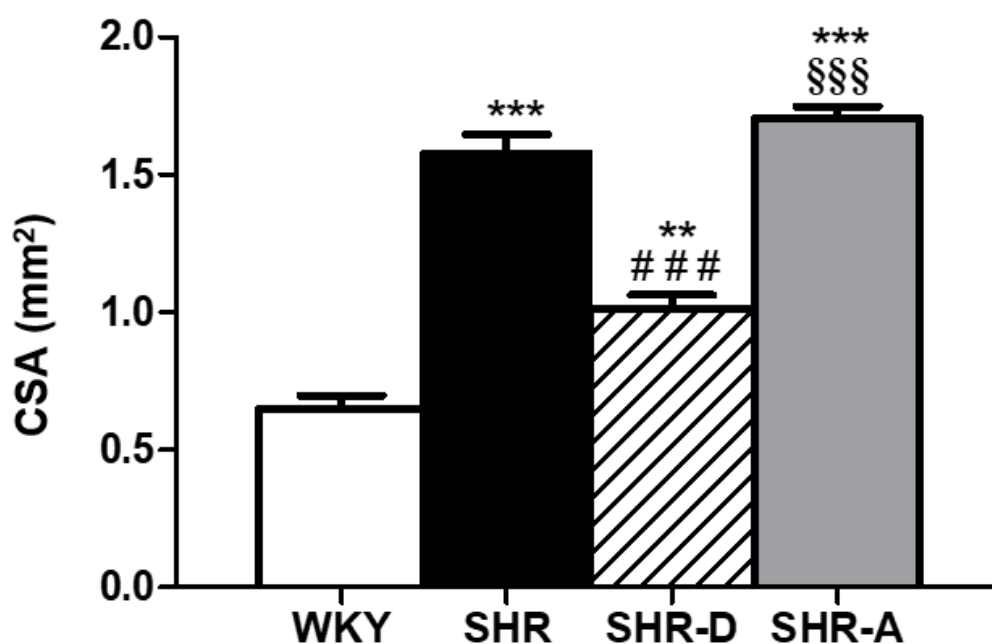


Figura 6. Área de la sección de corta de la aorta (CSA). WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: **P<0.01 vs. WKY, ***P<0.001 vs. WKY, ### P<0.001 vs. SHR, \$\$\$P<0.001 vs SHR-D. Los valores se expresan como media \pm SEM. n = 8 ratas por grupo.

La Figura 8 muestra la relación GP/DI de la aorta en los cuatro grupos de ratas. La relación GP/DI fue significativamente mayor en el grupo SHR control con respecto al grupo WKY, sin embargo, la administración de dronedarona produjo una disminución significativa de dicho parámetro en el grupo SHR-D con respecto al grupo SHR control. No encontramos diferencias significativas en GP/DI entre los grupos WKY y SHR-D. Tampoco encontramos diferencias significativas tras la administración de amiodarona en el grupo SHR-A con respecto al grupo SHR control (Fig. 7).

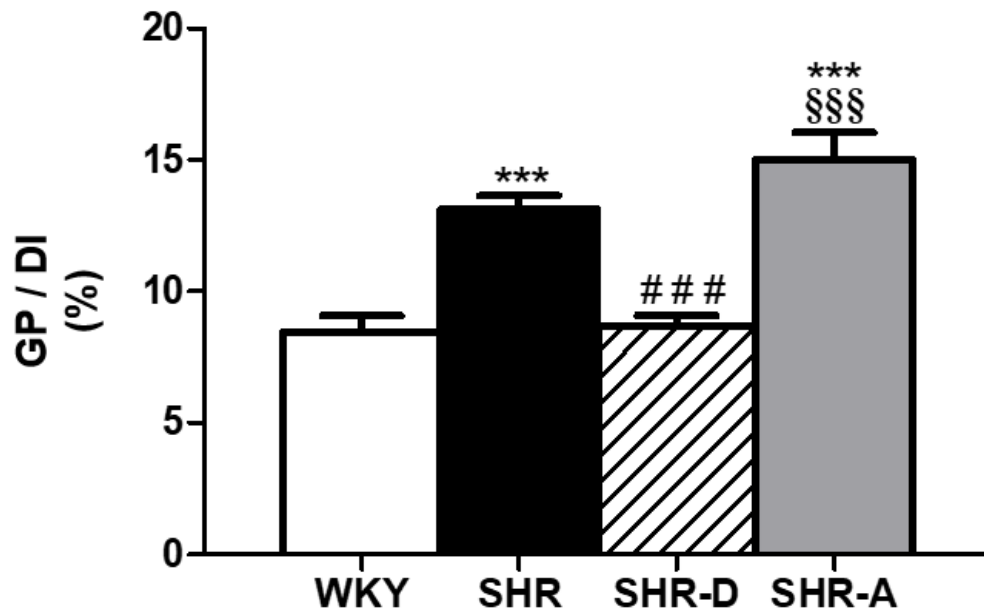


Figura 7. Relación grosor de pared/diámetro interno de la aorta. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: *** $P < 0.001$ vs. WKY, ### $P < 0.001$ vs. SHR, §§§ $P < 0.001$ vs SHR-D. Los valores se expresan como media \pm SEM. $n = 8$ ratas por grupo.

A continuación, mostramos cortes histológicos (tinción con Orceína) de la aorta torácica (íntima + media + adventicia), en los cuatro grupos de ratas (WKY, SHR, SHR-D y SHR-A) (Fig. 8):

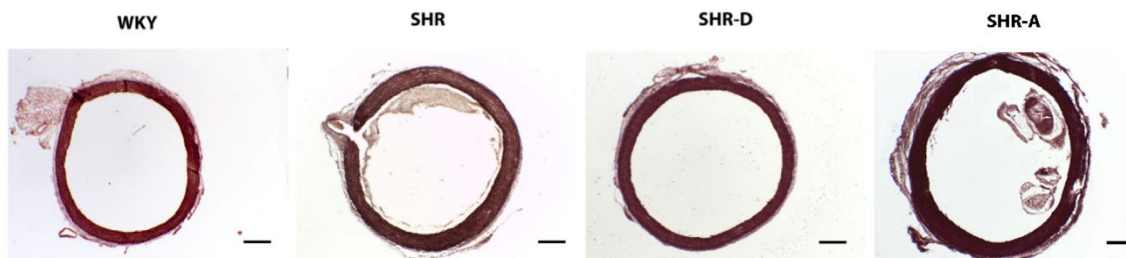


Figura 8. Cortes histológicos representativos de la aorta (Orceína 40 x, 300 μm) de una rata normotensa (WKY) y tres ratas hipertensas, una de ellas recibió placebo (SHR), otra dronedarona (SHR-D) y otra amiodarona (SHR-A).

4.2.2 Cambios en la estructura de las capas media y adventicia de la aorta

Los resultados de las alteraciones en la estructura de las capas media y adventicia de la aorta obtenidos en el presente estudio mediante microscopía confocal se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Cambios en la estructura de las capas media y adventicia de la aorta en los cuatro grupos de estudio

	WKY (n=8)	SHR (n=8)	SHR-D (n=8)	SHR-A (n=8)
Grosor capa media (µm)	134.33 ± 9.89	284.27 ± 37.83**	166.86 ± 7.91##	287.96±8.33***.§§
Grosor capa adventicia (µm)	86.18 ± 8.29	52.33 ± 1.49**	56.46 ± 4.21**	47 ± 1.81***

WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: **P<0.01 vs. WKY, ***P<0.001 vs. WKY, ##P<0.01 vs. SHR, §§P<0.01 vs SHR-D. Los valores se expresan como media ± SEM.

El grosor de la capa media de la aorta fue significativamente mayor en las ratas SHR control con respecto a las WKY. La administración de dronedarona produjo una disminución significativa de dicho parámetro en las SHR-D con respecto al grupo SHR control. Dicha reducción fue considerable, ya que no se encontraron diferencias significativas en el GP entre los grupos WKY y SHR-D. La

administración de amiodarona no produjo cambios significativos en el grupo SHR-A con respecto al grupo SHR control (Figs. 9 y 10).

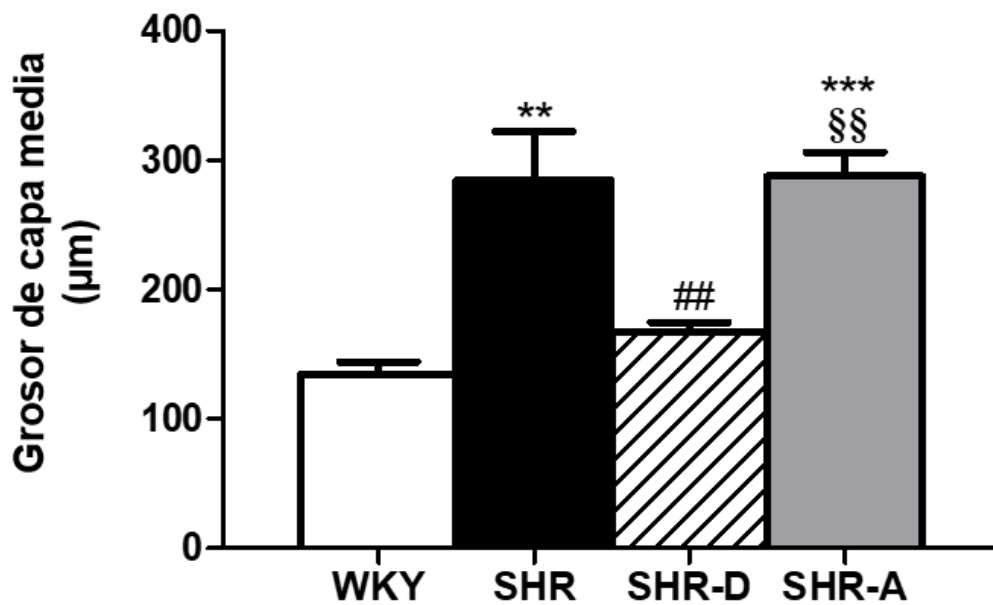


Figura 9. Grosor de la capa media de la aorta. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: ** $P < 0.01$ vs. WKY, *** $P < 0.001$ vs. WKY, ## $P < 0.01$ vs. SHR, §§ $P < 0.01$ vs. SHR-D. Los valores se expresan como media \pm SEM. $n = 8$ ratas por grupo.

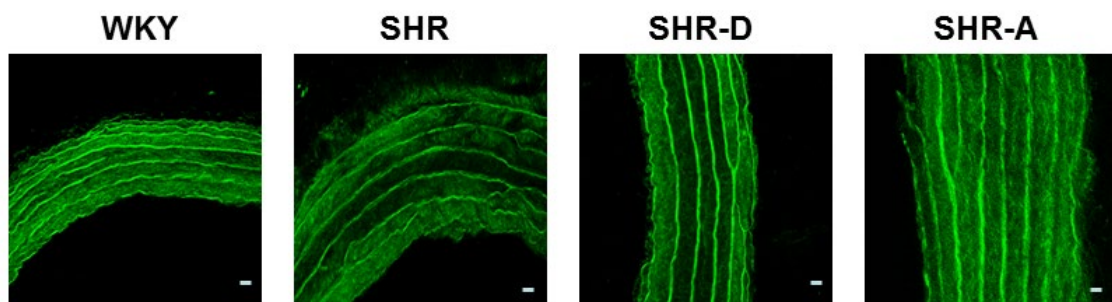


Figura 10. Imágenes representativas de la capa media de la aorta torácica obtenidas mediante microscopía confocal (imágenes 20 x, zoom 2, 100 µm) de una rata normotensa (WKY) y tres ratas hipertensas, una de ellas recibió placebo (SHR), otra dronedarona (SHR-D) y otra amiodarona (SHR-A).

El grosor de la capa adventicia de la aorta fue significativamente mayor en la rata WKY que en las ratas SHR, SHR-D y SHR-A. Ni la administración de dronedarona, ni de amiodarona produjeron cambios significativos en los grupos SHR-D y SHR-A respectivamente, respecto al grupo SHR control (Fig. 11).

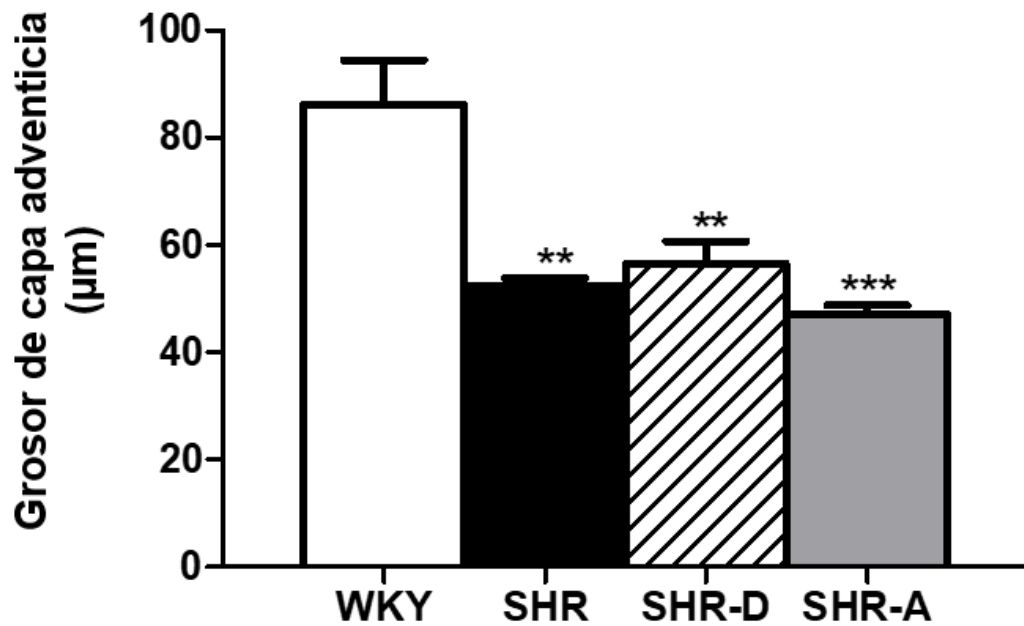


Figura 11. Grosor de la capa adventicia de la aorta. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: **P<0.01 vs. WKY, ***P<0.001 vs. WKY. Los valores se expresan como media \pm SEM. n = 8 ratas por grupo.

4.3. EFECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE LA AORTA

El estudio de las propiedades mecánicas de la aorta se ha realizado analizando dos parámetros: la densidad de volumen de la elastina de la capa media de la arteria

(mediante técnicas de histología), y el parámetro β (mediante curvas tensión-deformación en segmentos arteriales) que nos informa de la rigidez de la pared del vaso. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos al comparar los cuatro grupos de estudio (WKY, SHR, SHR-D y SHR-A):

Tabla 5. Densidad de volumen de las fibras elásticas y parámetro B de la aorta en los cuatro grupos de estudio

	WKY (n=8)	SHR (n=8)	SHR-D (n=8)	SHR-A (n=8)
Densidad volumen elastina (%)	17.52 ± 0.28	23.15 ± 0.30 ^{***}	16.72 ± 0.42 ^{###}	22.87 ± 0.76 ^{***.\$\$\$}
Parámetro β	0.36 ± 0.01	0.45 ± 0.006 ^{***}	0.39 ± 0.009 ^{###}	0.5 ± 0.01 ^{***.\$\$\$}

WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: ^{***}P<0.001 vs. WKY, ^{###} P<0.001 vs. SHR, ^{\$\$\$}P<0.001 vs SHR-D. Los valores se expresan como media ± SEM.

- La densidad de volumen de las fibras elásticas fue significativamente mayor en las ratas SHR control respecto a las ratas WKY. La dronedarona produjo una disminución significativa de este parámetro en el grupo SHR-D respecto al grupo SHR control, no mostrando diferencias con las ratas WKY. La amiodarona no mostró diferencias significativas en el grupo SHR-A respecto al grupo SHR control (Fig 12).

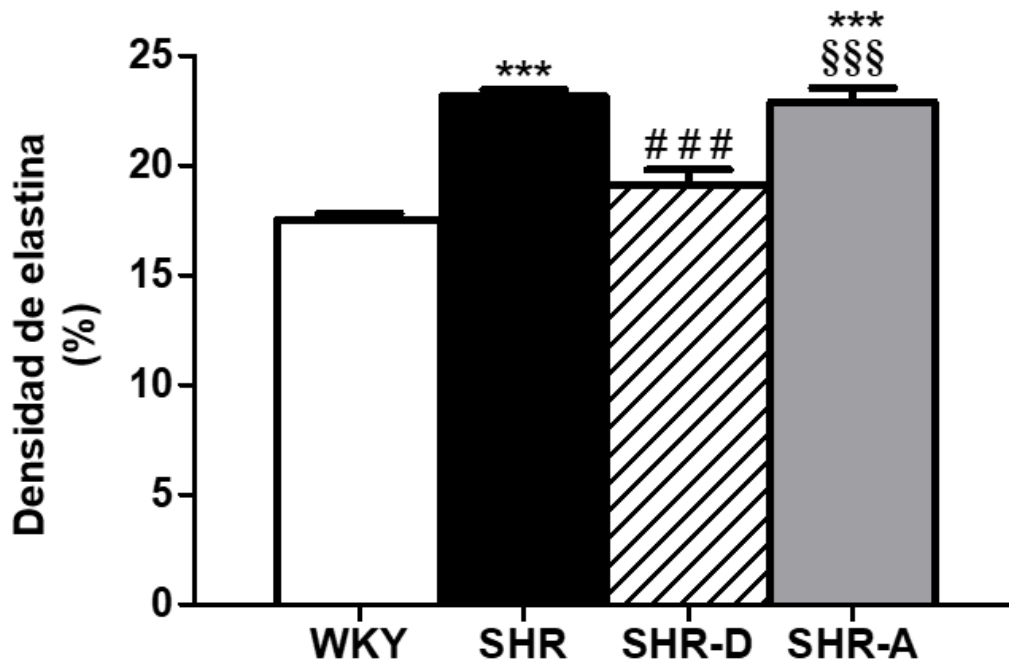


Figura 12. Densidad de elastina de la capa media de la aorta. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: *** $P < 0.001$ vs. WKY, ### $P < 0.001$ vs. SHR, \$\$\$ $P < 0.001$ vs. SHR-D. Los valores se expresan como media \pm SEM. $n = 8$ ratas por grupo.

A continuación mostramos cortes histológicos de fibras de elastina (tinción con Orceína) de aorta torácica (capa media) en los cuatro grupos de ratas (WKY, SHR, SHR-D y SHR-A) (Fig. 13):

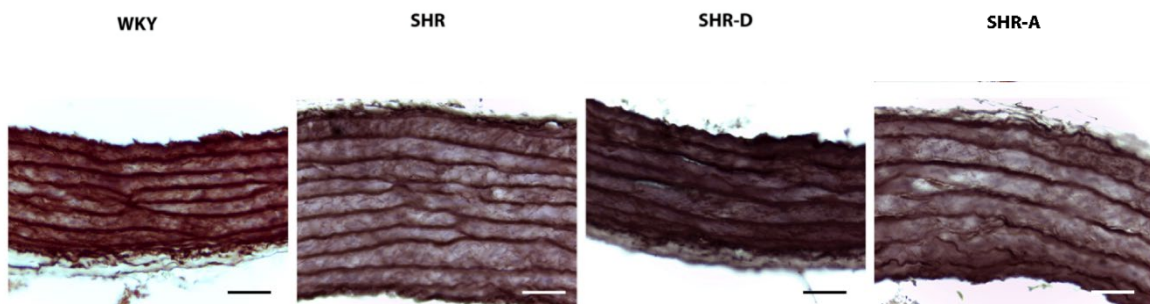


Figura 13. Imágenes representativas de fibras de elastina de la capa media de la aorta (Orceína 400 x, 50 μ m) de una rata normotensa (WKY) y tres ratas hipertensas, una de ellas recibió placebo (SHR), otra dronedarona (SHR-D) y otra amiodarona (SHR-A).

- El parámetro β (rigidez de pared arterial) fue significativamente mayor en las ratas SHR control respecto a las ratas WKY. La dronedarona produjo una disminución significativa de este parámetro en el grupo SHR-D respecto al grupo SHR control, no mostrando diferencias con las ratas WKY. La amiodarona no mostró diferencias significativas en el grupo SHR-A respecto al grupo SHR control (Fig 14).

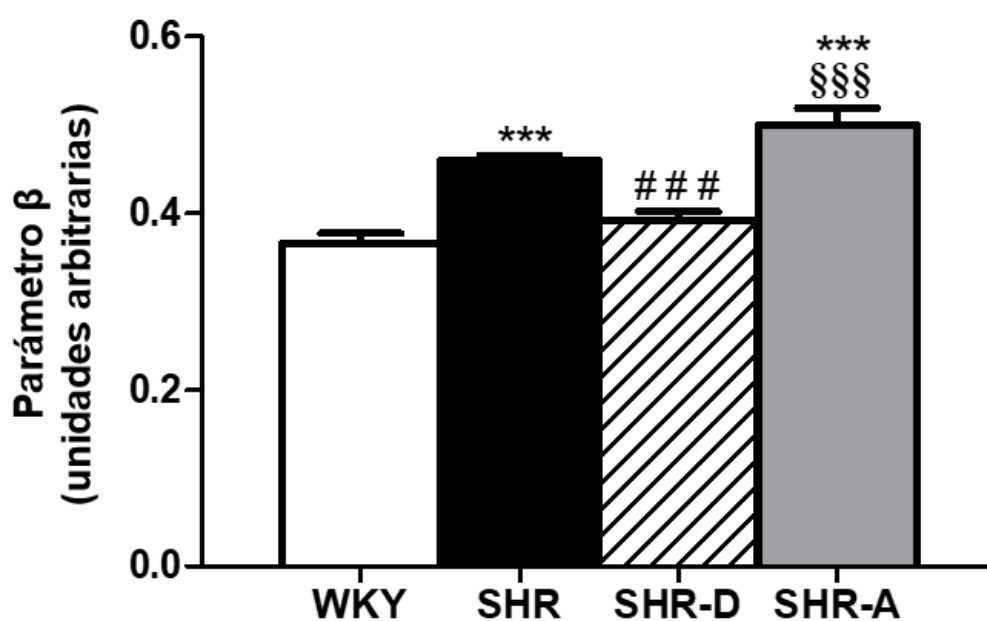


Figura 14. Propiedad mecánica de la aorta (Parámetro beta). WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Significación estadística: ***P<0.001 vs. WKY, ### P<0.001 vs. SHR, \$\$\$P<0.001 vs. SHR-D. Los valores se expresan como media \pm SEM. n = 8 ratas por grupo.

4.4. DRONEDARONA Y PARÁMETROS DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Los resultados de la determinación de diversos biomarcadores de disfunción endotelial en la aorta de tres grupos incluidos en el presente estudio (WKY, SHR y SHR-D) se muestran en la tabla 6. Según se desprende de los datos obtenidos, las ratas SHR control mostraban un aumento significativo de la concentración de ADMA y SDMA con respecto a los valores obtenidos en ratas WKY. La administración de dronedarona no produjo cambios en la concentración de ADMA en las ratas SHR-D con respecto al grupo SHR control ($P = 0.37$). Sin embargo, la dronedarona normalizó el valor de SDMA, no encontrándose diferencias significativas de este valor entre las SHR-D y las ratas WKY.

Tabla 6. Valores de biomarcadores de disfunción endotelial en aorta en los grupos de ratas (WKY, SHR y SHR-D)

	WKY (n=8)	SHR (n=8)	SHR-D (n=8)
ADMA (nm/g protein)	25.56 ± 3.62	37.05 ± 1.59*	32.49 ± 4.65
SDMA (nm/g protein)	5.23 ± 1.71	9.87 ± 0.85*	4.25 ± 0.65#

ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona). Significación estadística: * $P < 0.05$ vs. WKY, # $P < 0.05$ vs. SHR. Los valores se expresan como media ± SEM.

A continuación se muestra la asociación entre la concentración de SDMA en la aorta y el grosor de pared. El coeficiente de correlación de Pearson mostró una

correlación positiva entre ambos parámetros en todos los grupos experimentales: $r = 0.76$, $P < 0.001$ (Fig 15).

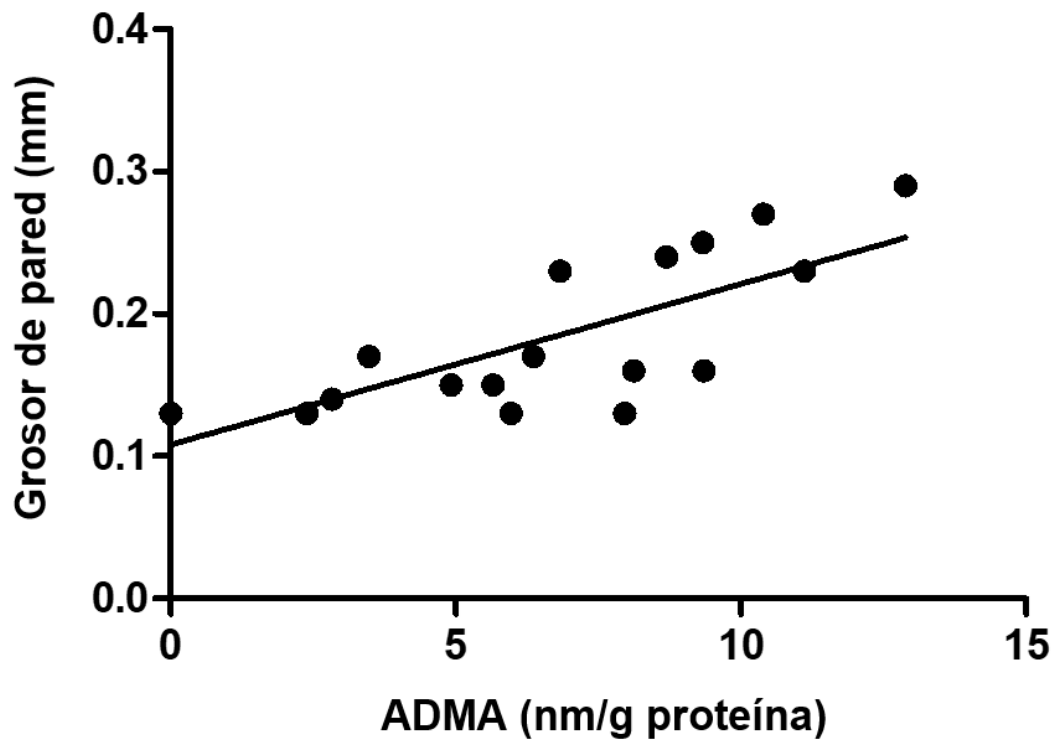


Figura 15. Concentración de dimetilarginina simétrica (SDMA) en la aorta y su asociación con el grosor de pared. WKY (ratas normotensas), SHR (ratas hipertensas tratadas con placebo), SHR-D (ratas hipertensas tratadas con dronedarona) y SHR-A (ratas hipertensas tratadas con amiodarona). Coeficiente de correlación de Pearson mostró correlación positiva entre ambos parámetros en todos los grupos experimentales ($P < 0.001$).

5. Discusión

El trabajo experimental desarrollado demuestra, por primera vez, que el tratamiento con un bloqueante multicanal, la dronedarona, produce de manera precoz una regresión del remodelado aórtico secundario a la hipertensión arterial. Adicionalmente, nuestros resultados revelan algún mecanismo fisiopatológico que podría subyacer en el efecto de este fármaco. Como modelo experimental de remodelado de la aorta se han utilizado tres grupos de ratas hipertensas: uno recibió placebo (SHR), otro dronedarona (SHR-D) y otro amiodarona (SHR-A), así como ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) como grupo control.

La SHR constituye un modelo experimental bien establecido y habitualmente utilizado para estudiar la hipertensión arterial primaria y sus consecuencias cardiovasculares (remodelado cardiovascular). A los 10 meses de edad, esta rata ya presenta una cardiopatía estructural compensada (HVI) ¹⁴⁰, y alteraciones funcionales y estructurales de los vasos ¹⁴¹. Previamente a esta Tesis, nuestro grupo de investigación demostró la regresión precoz de la HVI (disminución de la masa del ventrículo izquierdo, disminución el área del miocito, y cambios en el metabolismo de la glucosa del ventrículo izquierdo), y del remodelado vascular (cambios en la estructura y función en las arterias intramiocárdicas y coronarias) en la SHR tras un tratamiento breve (14 días) con dronedarona ^{11,12,133}. Este resultado tan sorprendente nos animó a diseñar el presente estudio con el fin de investigar si la dronedarona producía un efecto similar sobre el remodelado de la aorta en el mismo modelo experimental. Para ello, se realizaron experimentos encaminados a detectar los cambios producidos en el grupo de ratas hipertensas tratadas con dronedarona (SHR-D) respecto a los otros dos grupos de animales no tratados (WKY y SHR) y al grupo tratado con otro antiarrítmico, la amiodarona (SHR-A), en

relación a: 1) la estructura de la aorta; y 2) las propiedades mecánicas de la aorta (mecánica pasiva); y 3) diversos biomarcadores de disfunción endotelial.

Nuestro grupo ha demostrado, en estudios previos, la regresión del remodelado de la aorta con esmolol (fármaco antihipertensivo) tras tan sólo 48 h de tratamiento en un estudio con el mismo modelo experimental, la rata SHR¹³. El esmolol es un betabloqueante cardioselectivo que se utiliza en la práctica clínica habitual (en el entorno perioperatorio) como fármaco antihipertensivo y antiarrítmico. Su administración sólo es intravenosa, y requiere una monitorización adecuada del paciente^{142,143}. Nuestro grupo de investigación ha dado un paso hacia adelante buscando un fármaco con un efecto (sobre el remodelado cardiovascular) similar al inducido por el esmolol, pero de administración vía oral. Motivo por el que se ha desarrollado el presente trabajo.

Nuestros resultados revelan que la administración oral de dronedarona (100 mg/Kg/24h), durante 14 días, induce la regresión del remodelado de la aorta de SHR adultas (10 meses de edad). A continuación se discutirán los resultados más relevantes del presente trabajo.

5.1. CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LA AORTA PRODUCIDOS POR LA DRONEDARONA

La HTA es un factor de riesgo cardiovascular que produce alteraciones tanto en la microcirculación (arterias de resistencia) como en la macrocirculación (arterias de conducción) ¹⁴⁴, que aumentan la mortalidad. En la macrocirculación (arterias de gran calibre), el remodelado producido por la HTA se caracteriza por un aumento en el diámetro interno del vaso (DI) y en el grosor de la pared (GP) ¹⁴⁴. Nuestros datos en el modelo animal son consistentes con la anterior asociación. Así, tras analizar ambos parámetros estructurales (DI y GP) en la aorta de la SHR adulta (10 meses) se observó un aumento significativo de los mismos respecto a su control normotenso (ratas WKY), mostrando un remodelado hipertrófico externo ¹⁴⁵. La SHR es un modelo experimental de hipertensión arterial primaria y daño vascular, que muestra un remodelado de la aorta que progresa, no sólo con la edad, sino también como mecanismo “mal-adaptativo” en respuesta a la hipertensión arterial crónica ¹⁴⁶.

Los resultados del presente estudio también muestran que la administración de dronedarona durante 2 semanas induce cambios en la estructura de la aorta de las SHR. Estos cambios incluyen la disminución de CSA y DE a expensas de GP (capa media), llegando el GP a valores similares a los encontrados en las ratas normotensas. Estos datos muestran la efectividad de la dronedarona sobre la regresión del remodelado estructural de la aorta.

También existen trabajos en la literatura que han mostrado la capacidad de los cinco grandes grupos de fármacos antihipertensivos y antiarrítmicos (IECAs, ARBs, betabloqueantes, antagonistas del calcio y diuréticos) para inducir cambios en la estructura de la aorta (cambios en la capa media y CSA) en la SHR: Losartán, enalapril y nifedipino tras 4 semanas de tratamiento ⁷⁶, captopril + hidroclorotiazida 6 meses ¹⁴⁷, propanolol y perindopril 3 meses ¹⁴⁸, nifedipino, verapamil y diltiazem 1 semana ¹⁴⁹, espironolactona 3 meses ¹⁵⁰, olmesatán 4 meses ¹⁵¹, losartán 4 meses ¹⁵². Y, como nuestro grupo ha publicado, con esmolol administrado durante sólo 48 horas ¹³. Los cambios producidos por estos fármacos (tras terapias de diferente duración, y de diferentes dosis) son comparables a los obtenidos en nuestro estudio con la dronedarona tras 2 semanas de tratamiento.

El tratamiento con dronedarona disminuyó la FC y la PAS en el grupo SHR-D, igualándose a las cifras del control normotenso WKY. Este cambio en los parámetros hemodinámicos reproduce el efecto de este fármaco, ya observado en humanos ¹⁵³.

El mecanismo por el que la dronedarona induce cambios en la estructura de la aorta en la SHR es desconocido. Seguramente exista un componente hemodinámico debido a la reducción de la FC y la PAS. Para profundizar en este aspecto, administramos amiodarona a un grupo SHR (SHR-A). La amiodarona, al igual que la dronedarona, es un fármaco que actúa sobre múltiples corrientes iónicas (antiarrítmico), disminuye la PA y la FC, y se utiliza en la práctica clínica habitual en el tratamiento de la FA ¹⁵⁴. En el presente estudio, la administración de amiodarona mostró un descenso de ambos parámetros hemodinámicos en el grupo SHR-A, sin

embargo no produjo cambios en la estructura de la aorta. Esto sugiere que el componente hemodinámico por sí sólo no es suficiente y probablemente exista un efecto específico de la dronedarona que participe en la regresión del remodelado de la aorta.

5.2. RESTAURACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE LA AORTA INDUCIDA POR LA DRONEDARONA

La HTA produce cambios en la geometría de la pared arterial (remodelado estructural) que modifican las propiedades funcionales, tanto activas (celularidad) como pasivas (matriz extracelular) del vaso. Estas alteraciones estructurales son de gran relevancia clínica ya que se han asociado con una mayor incidencia de eventos cardiovasculares adversos ^{68, 155}.

Las grandes arterias (como la aorta) se denominan también arterias elásticas debido a la abundancia de fibras elásticas sobre todo en su capa media, siendo la capa adventicia de escaso desarrollo. En el remodelado hipertensivo de la aorta se produce una pérdida de elasticidad, ya que las fibras elásticas pueden presentar un defecto en su formación y/o sufrir fragmentación, debilitando la pared vascular. Esta fragmentación (rotura de fibras) podría explicarse por la presión arterial que soporta la pared, o por la liberación de proteasas por parte de las células musculares lisas que degradan la elastina ^{9, 19, 156}. En nuestro trabajo, la SHR (modelo de HTA) a los 10 meses de edad mostró un aumento de elastina en la capa media de la aorta respecto a la rata normotensa (WKY), siendo estos resultados congruentes con

estudios previos en este modelo aunque en animales de menor edad ^{146, 150, 152}. Este aumento en el contenido de elastina es debido a un aumento en el número y/o grosor de las láminas elásticas ¹⁵⁷. Nuestro objetivo en lo que respecta al estudio de las propiedades mecánicas de la aorta no ha incluido la capa adventicia de la aorta, ya que apenas contribuye a la mecánica pasiva de la aorta torácica en la SHR ¹⁵⁸.

La elastina y el colágeno (dentro de la matriz extracelular) de la pared son los componentes que realmente contribuyen al comportamiento elástico de los vasos, a su mecánica pasiva ¹⁸. El colágeno proporciona rigidez y resistencia a la tensión mientras que las fibras elásticas proporcionan resiliencia y elasticidad. En nuestro estudio hemos investigado la mecánica pasiva de la aorta tras la administración de dronedarona analizando la densidad de volumen de la elastina de la capa media (elasticidad) y el parámetro β (rigidez) de la aorta torácica. Paralelamente a los cambios estructurales, la administración oral de dronedarona durante 2 semanas indujo cambios en ambos parámetros en el grupo SHR-D, siendo los valores similares a los del grupo WKY. Es decir, la dronedarona restaura las propiedades mecánicas de la aorta (mecánica pasiva) en la SHR. Similares resultados muestran un estudio con olmesatán en SHR tras 16 semanas de tratamiento oral (produjo cambios en la estructura y mecánica pasiva de la aorta)¹⁵¹. En esta línea, no hemos encontrado en la literatura muchos estudios que investiguen dentro de la función mecánica de la aorta, la mecánica pasiva. Resulta interesante un trabajo que muestra el efecto positivo de nifedipino (tras 1 semana de tratamiento vía subcutánea) sobre la estructura (disminución del grosor de pared) y función activa (mejoría de la vasodilatación endotelio-dependiente) de la aorta en la SHR de 14

semanas. Sin embargo, los autores no encontraron cambios en la función activa de la aorta tras la administración de otros antagonistas del calcio (verapamil y diltiazem) aunque sí produjeron cambios en el remodelado estructural de la aorta¹⁴⁹. En nuestro trabajo sólo se ha estudiado la contribución pasiva en cuanto al comportamiento mecánico, ya que la aorta presenta una pequeña parte de componente muscular, siendo las fibras elásticas las de mayor cantidad, sobre todo en la capa media ¹⁵⁹.

Es importante resaltar que la administración de amiodarona en el grupo SHR-A no produjo cambios en la densidad de volumen de la elastina de la capa media (elasticidad) ni en el parámetro β , respecto al grupo SHR que recibió placebo. Por lo que, aunque seguramente exista un componente hemodinámico debido a la reducción de la FC y la PA, aún desconocemos el mecanismo específico por el que la dronedarona participa en la regresión del remodelado de la aorta.

5.3. LA DRONEDARONA INDUCE CAMBIOS EN LOS BIOMARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La SDMA, inhibidor indirecto del óxido nítrico, es un predictor independiente de mortalidad cardiovascular ¹⁶⁰⁻¹⁶³. Su concentración aumenta en la enfermedad coronaria, insuficiencia renal terminal y la enfermedad vascular periférica ¹⁶⁴⁻¹⁶⁷, e incluso algunos autores lo han asociado con la HTA ¹⁶⁸. Niveles altos de SDMA también se han relacionado con aumento del grosor de la pared vascular ^{160,169-171}. En concreto, el estudio “Dallas Heart” muestra, en humanos (estudio de cohortes),

la asociación entre este biomarcador y un aumento del grosor de pared de la aorta¹⁶⁰. Esto concuerda con el aumento de la concentración de SDMA encontrado en la aorta en las SHR, y su correlación positiva con el grosor de pared en el presente estudio. Nuestros datos también revelan una rápida y significativa disminución de la concentración de SDMA paralelamente a los cambios estructurales de la aorta producidos por el efecto de la dronedarona en las SHR. Es el primer estudio que muestra este biomarcador como diana terapéutica en el remodelado vascular.

Los resultados del presente trabajo no pueden explicar los mecanismos moleculares por los que la dronedarona produce este efecto positivo sobre el remodelado de la aorta, pero podemos sugerir que la disminución de la concentración de SDMA en el vaso podría estar implicada.

Estudios previos muestran un posible efecto protector cardiovascular de la dronedarona en el que podrían estar involucrados dos mecanismos: estimulación de la óxido nítrico sintasa y el bloqueo de los canales iónicos del calcio¹⁷². En nuestro estudio, el primer mecanismo posiblemente no explique los resultados observados, ya que la SDMA inhibe la síntesis de óxido nítrico pero indirectamente, ya que interfiere en la captación intracelular de la L-Arginina^{160,164}. Sin embargo, como el papel de SDMA en el daño vascular (remodelado estructural) está relacionado con las alteraciones proinflamatorias que se producen en la pared vascular (a su vez relacionadas con la apertura de canales de calcio y activación de monocitos)¹⁷³ el segundo mecanismo de la dronedarona, descrito anteriormente, podría estar implicado en la regresión del remodelado aórtico inducido por este

fármaco en nuestro trabajo. Esta es sólo una de las posibles vías de trabajo para una pregunta no resuelta.

5.4. IMPLICACIONES CLÍNICAS

Nuestro trabajo sugiere que la dronedarona podría interferir con el proceso de remodelado patológico causado por la HTA, induciendo cambios estructurales y restaurando las propiedades mecánicas (mecánica pasiva) de la aorta.

La evolución y mantenimiento de la HTA produce el remodelado vascular. Este surge inicialmente como un mecanismo adaptativo compensatorio y, con el tiempo, se transforma en un mecanismo *mal-adaptativo* que compromete la función vascular e incrementa el riesgo de desarrollar eventos vasculares. Terapias antihipertensivas como losartán han demostrado su eficacia en la regresión del remodelado vascular de origen hipertensivo, tanto en modelo animal como en humanos ^{150, 174}. Losartán produjo disminución del grosor de pared (capa media) de la aorta torácica tras 4 meses de tratamiento, en la SHR de 32 semanas de edad ¹⁵⁰. Un estudio posterior (estudio observacional) muestra la traslación de estos resultados a la clínica, demostrado la eficacia de losartán en pacientes con HTA esencial, al disminuir la rigidez de pared de la carótida tras un tratamiento de 3-6 meses, y como consecuencia reduciendo los eventos vasculares ¹⁷⁴.

Es interesante mencionar el estudio ATHENA (ensayo clínico) que mostró la eficacia de la dronedarona en la disminución del accidente cerebrovascular en el 36% de 2301 pacientes que recibieron el fármaco frente a 2327 pacientes que

recibieron placebo (la mayor parte de los pacientes que participaron en el estudio tenían HTA) ¹²⁰. Este efecto coincidió con la disminución de la PA y la FC.

Los datos de nuestro trabajo nos permiten plantear la hipótesis de que la baja incidencia de accidente cardiovascular tras la administración de dronedarona podría estar asociada a su capacidad de reducir el remodelado patológico vascular causado por la HTA. Si esta hipótesis se confirma, aportaría una base fisiopatológica a las observaciones realizadas en clínica y daría una nueva indicación del fármaco. De manera que la dronedarona podría ser la elección en el paciente con FA e HTA de base.

5.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Tras el análisis de nuestro trabajo experimental, encontramos las siguientes limitaciones:

- La dosis de dronedarona administrada a las ratas ha sido extraída de estudios previos en roedores ^{175, 176, 122, 178}. Sin embargo, diferentes dosis de un mismo fármaco pueden dar lugar a diferentes resultados al actuar sobre el remodelado vascular en la SHR ^{76, 152}. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio son sólo aplicables a la dosis de 100 mg/Kg de dronedarona (administrada vía oral).
- La edad de la SHR en la que se administra el fármaco antihipertensivo/antiarrítmico interfiere en la efectividad del tratamiento ¹⁵⁰.

Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio son sólo aplicables a la aorta de la rata SHR macho de 10 meses de edad.

- El presente trabajo muestra la regresión del remodelado de la aorta tras 2 semanas de tratamiento con dronedarona. Sin embargo, desconocemos si este efecto persiste o no más allá del periodo de tratamiento.
- Por último, se trata de un estudio experimental (en modelo animal), por lo que serán necesarios futuros ensayos clínicos para asegurar que la regresión del remodelado de la aorta es un efecto terapéutico de la dronedarona.

5.6. DÓNDE ESTAMOS Y A DÓNDE VAMOS

Este es el primer estudio que demuestra una regresión del remodelado de la aorta (asociado a la HTA) inducida por un fármaco, el bloqueante multicanal dronedarona, administrado durante 2 semanas. Para ello, hemos estudiado los cambios producidos en la aorta desde múltiples perspectivas: cambios estructurales mediante microscopía óptica y confocal, cambios en la mecánica pasiva usando el baño de órganos, y efectos del fármaco sobre biomarcadores de disfunción endotelial en tejido (aorta).

A partir de los resultados del trabajo que describimos en esta Tesis doctoral, nuestro grupo de investigación está trabajando en nuevos proyectos encaminados

al estudio de los mecanismos implicados en la regresión del remodelado vascular producido por la dronedarona. Por un lado, estudios previos muestran la relación entre SDMA, grosor de pared de la aorta y eventos cardiovasculares adversos ¹⁶⁰; Por otro lado, nuestros resultados muestran la implicación de la SDMA en los cambios producidos por la dronedarona sobre la estructura de la aorta, por lo que nos vemos obligados a profundizar en los mecanismos moleculares responsables de este efecto. Además de la realización de estudios de biología molecular, profundizaremos en el análisis de los biomarcadores de disfunción endotelial (gracias a la colaboración del equipo del Dr. Rainer H Böger, del Instituto de Farmacología Hamburg-Eppendorf, Alemania), referente internacional en el estudio de estos marcadores, y que participa en nuestra línea de investigación sobre el remodelado cardiovascular desde hace más de 10 años.

En este momento, nuestro grupo de investigación ha puesto en marcha un nuevo estudio experimental en modelo animal (SHR) que analizará la prolongación o no del efecto producido por la dronedarona a lo largo del tiempo (PROEX 256.5/22).

Por último, el presente trabajo podría abrir la puerta a una nueva indicación del fármaco, la dronedarona, si se confirman los resultados en humanos mediante futuros ensayos clínicos.

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos de este trabajo experimental, y de la discusión de los mismos, podemos formular las siguientes conclusiones:

1. La dronedarona produce regresión precoz del remodelado de la aorta en la SHR, modelo de hipertensión arterial primaria y daño vascular.
2. La aorta de la SHR tratada con dronedarona muestra diferencias estructurales significativas respecto a la de la rata hipertensa sin tratar. Estos cambios incluyen la disminución del grosor de la pared y de la capa media.
3. La dronedarona restaura las propiedades mecánicas pasivas de la aorta de la SHR, hasta equipararla con la rata normotensa. Este fármaco produce disminución del contenido de elastina y del parámetro beta.
4. El tratamiento con dronedarona induce cambios en el biomarcador de disfunción endotelial dimetilarginina simétrica disminuyendo su concentración en la aorta de la SHR. Sin embargo, no produce cambios en la dimetilarginina asimétrica.

7. Bibliografía

- 1 Giles TD, Materson BJ, Cohn JN, et al. Definition and classification of hypertension: an update. *J Clin Hypertens*. 2009; 11:611-614.
- 2 Kuschnir MC, Mendonça GA. Risk factors associated with arterial hypertension in adolescents. *J Pediatr*. 2007; 83 (4):335-342.
- 3 Timberlake DS, O'Connor DT, Parmer RJ. Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001; 10 (1):71-79.
- 4 Ortiz Marron H, Vaamonde Martin RJ, Zorrilla Torras B et al. Prevalence, degree of control and treatment of hypertension in the adult population of Madrid, Spain. *Rev. Esp. Salud Publica*. 2011; 85:329-338.
- 5 Barengo NC, Antikainen R, Kastarinen M, et al. The effects of control of systolic and diastolic hypertension on cardiovascular and all-cause mortality in a community-based population cohort. *J Hum Hypertension*. 2013; 27:693-697.
- 6 Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, et al. Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. *Hypertension*. 1999; 34:724-728.
- 7 Lund-Johansen P. Haemodynamics in essential hypertension. *Clin Sci*. 1980; 59 Suppl 6:343S-54S.

- 8 Mulvany MJ. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput.* 2008; 46:461-467.
- 9 Fortuño Cebamanos MA, Díez Martínez J. Enfermedad vascular hipertensiva. *Medicine* 1998; 7(71):3287-3296
- 10 Drazner MH. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation.* 2011; 123:327-334.
- 11 Quintana-Villamandos B, Gómez de Diego JJ, Delgado-Martos MJ, et al. Dronedarone produces early regression of myocardial remodelling in structural heart disease. *Plos One.* 2017; 12:e0188442.
- 12 Quintana-Villamandos B, Pazó-Sayós L, Arribas SM, et al. Dronedarone induces regression of coronary artery remodeling related to better global antioxidant status. *Hypertens Res.* 2019; 42:1485-1494
- 13 Quintana-Villamandos B, González MC, Delgado-Martos MJ, et al. Short-term esmolol attenuates remodeling of the thoracic aorta in hypertensive rats by decreasing concentrations of ADMA down-regulated by oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 2016; 791:502–509.
- 14 Quintana-Villamandos B, Delgado-Martos MJ, Sánchez-Hernández, et al. Early regression of left ventricular hypertrophy after treatment with esmolol in an experimental rat model of primary hypertension. *Hypertens Res.* 2013;

36:408-413.

- 15 Arnalich-Montiel A, González MC, Delgado-Baeza E, et al. Short-term esmolol improves coronary artery remodeling in spontaneously hypertensive rats through increased nitric oxide bioavailability and superoxide dismutase activity. *BioMed Res Int.* 2014; 2014:531087.
- 16 Cabrera EI. Biomecánica de la hipertensión arterial. *Revista Argentina de Cardiología.* 2004; 72:150-156.
- 17 Wolinsky H, Glagov S. A Lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Cir Res.* 1967; 20 (1):99-111.
- 18 Ponticos M, Smith BD. Extracellular Matrix Synthesis in Vascular Disease: Hypertension and Atherosclerosis. *J Biomed Res.* 2014; 28(1):25-39.
- 19 Lemarié CA, Tharaux, PL, Lehoux S. Extracellular Matrix Alterations in Hypertensive Vascular Remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48(3):433-439.
- 20 Arribas SM, Hinek A, González, MC. Elastic Fibres and Vascular Structure in Hypertension. *Pharmacol Ther.* 2006; 111(3):771-791.
- 21 Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension.* 1989; 13:968-972.

- 22 Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Eng J Med.* 1994; 330:1431-1438.
- 23 Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, et al. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension.* 1993; 21:391-397.
- 24 Bund SJ, Lee RM. Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. *J Vasc Res.* 2003; 40:547-557.
- 25 Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, et al. Vascular remodeling. *Hypertension.* 1996; 28:505- 506.
- 26 Schiffrin EL, Deng LY, Larochele P. Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. *Clin Invest Med.* 1993; 16:177-186.
- 27 Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension.* 2001; 38:581-587.
- 28 Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D et al. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.* 2001; 103:1238-1244.
- 29 Endemann DH, Pu Q, De Ciuceis C, et al. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. *Hypertension.* 2004; 43:399-404.

- 30 Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, et al. Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J Vasc Res.* 2002; 39:12-20.
- 31 Pasterkamp G, Galis ZS, de Kleijn DP. Expansive arterial remodeling: location, location, location. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:650-657.
- 32 Rodriguez-Lopez AM, Flores O, Arevalo MA, et al. Glomerular cell proliferation and apoptosis in uninephrectomized spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int Suppl.* 1998; 68:S36-40.
- 33 Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, et al. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2000; 45:729-735.
- 34 Dickhout JG, Lee RM. Apoptosis in the muscular arteries from young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1999; 17:1413-1419.
- 35 Rizzoni D, Rodella L, Porteri E, et al. Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2000; 18:885-891.
- 36 Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007; 115:1285-1295.
- 37 Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15:1983-1992.
- 38 Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. Endothelium-dependent relaxation of small

arteries from essential hypertensive patients: mechanisms and comparison with normotensive subjects and with responses of vessels from spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci.* 1995; 88:611-622.

39 Sack M. Tumor necrosis factor-alpha in cardiovascular biology and the potential role for anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in heart disease. *Pharmacol Ther.* 2002; 94:123-135.

40 Van der Meer IM, de Maat MP, Kiliaan AJ, et al. The value of C-reactive protein in cardiovascular risk prediction: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med.* 2003; 163:1323-1328.

41 Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, et al. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:14483-14488.

42 Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enzyme Regul.* 1985; 23:217-237.

43 Jones DP, Radi R. Redox pioneer: professor Helmut Sies. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 21:2459-2468.

44 Carrizzo A, Puca A, Damato A, et al. Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension.* 2013; 62:359-366.

45 Ghasemzadeh N, Patel RS, Eapen DJ, et al. Oxidative stress is associated with increased pulmonary artery systolic pressure in humans. *Hypertension.*

2014; 63:1270-1275.

46 Rodrigo R, Libuy M, Feliu F, et al. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers*. 2013; 35:773-790.

47 Pechanova O, Simko F. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiol Res*. 2007; 56:S7-S16.

48 Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*. 1995; 26:1235-1241.

49 Sibal L, Agarwal SC, Home PD, et al. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev*. 2010; 6(2):82-90.

50 Gore MO, Schwedhelm E, Ayers CR, et al. Symmetric dimethylarginine predicts mortality in the Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Apr, 57 (14_Supplement) E1023

51 Griending KK, Sorescu D, Lassegue B, et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:2175-2183.

52 Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 884:19-40.

53 Lariviere R, Day R, Schiffrin EL. Increased expression of endothelin-1 gene

- in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension*. 1993; 21:916-920.
- 54 Schiffrin EL, Deng LY, Sventek P, Day R. Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension. *J Hypertens*. 1997; 15:57-63.
- 55 Li JS, Lariviere R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1994; 24:183-188.
- 56 Stow LR, Gumz ML, Lynch IJ, et al. Aldosterone modulates steroid receptor binding to the endothelin-1 gene (edn1). *J Biol Chem*. 2009; 284:30087-30096.
- 57 Pu Q, Neves MF, Viridis A, et al. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension*. 2003; 42:49-55.
- 58 Vecchione C, Fratta L, Rizzoni D, et al. Cardiovascular influences of alpha 1b-adrenergic receptor defect in mice. *Circulation*. 2002; 105:1700-1707.
- 59 Sharifi AM, Li JS, Endemann D, et al. Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1998; 16:457-466.
- 60 Intengan HD, Thibault G, Li JS, et al. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of

- angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1999; 100:2267-2275.
- 61 Bezie Y, Lamaziere JM, Laurent S, et al. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1998; 18:1027-1034.
- 62 Bia D, Armentano RL, Grignola JC, et al. Músculo liso y función de amortiguamiento parietal de las grandes arterias. *Rev Esp Cardiol*. 2003; 56(12):1202-1209.
- 63 Thybo NK, Mulvany MJ, Jastrup B, et al. Some pharmacological and elastic characteristics of isolated subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 1996; 14:993-998.
- 64 Schiffrin EL. Effects of aldosterone on the vasculature. *Hypertension*. 2006; 47:312-318.
- 65 Bray P, Agrotis A, Bobik A. Transforming growth factor-beta and receptor tyrosine kinase-activating growth factors negatively regulate collagen genes in smooth muscle of hypertensive rats. *Hypertension*. 1998; 31:986-994.
- 66 Brown NJ. Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertension*. 2008; 51:161-167.
- 67 Min LJ, Mogi M, Li JM, et al. Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2005; 97:434-442.

- 68 Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, et al. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation*. 2003; 108:2230-2235.
- 69 De Ciuceis C, Porteri E, Rizzoni D, et al. Structural alterations of subcutaneous small-resistance arteries may predict major cardiovascular events in patients with hypertension. *Am J Hypertens*. 2007; 20:846-852.
- 70 Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci*. 2002; 17:105-109.
- 71 Eftekhari A, Rahman A, Schaevel LH et al. Chronic cystamine treatment inhibits small artery remodelling in rats. *J Vasc Res*. 2007; 44:471-482.
- 72 Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res*. 2011; 34:5-14.
- 73 Buus NH, Bottcher M, Jorgensen CG, et al. Myocardial perfusion during long-term angiotensin-converting enzyme inhibition or beta-blockade in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 2004; 44:465-470.
- 74 Schiffrin EL. Circulatory therapeutics: use of antihypertensive agents and their effects on the vasculature. *J Cell Mol Med*. 2010; 14:1018-1029.
- 75 Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist. *Am J Hypertens*. 1998; 11:1108-1116.
- 76 DeBlois D, Tea BS, Than VD, et al. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; 29:340-

349.

- 77 Davies J, Gavin A, Band M, et al. Spironolactone reduces brachial pulse wave velocity and PIIINP levels in hypertensive diabetic patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 59:520-523.
- 78 Benetos A, Gautier S, Lafleche A, et al. Blockade of angiotensin II type 1 receptors: effect on carotid and radial artery structure and function in hypertensive humans. *J Vasc Res.* 2000; 37:8-15.
- 79 Van Bortel LM, Kool MJ, Boudier HA, et al. Effects of antihypertensive agents on local arterial distensibility and compliance. *Hypertension.* 1995; 26:531-534.
- 80 Colucci WS, Koliass TJ, Adams KF, et al. Metoprolol reverses left ventricular remodeling in patients with asymptomatic systolic dysfunction: the REversal of VEentricular Remodeling with Toprol-XL (REVERT) trial. *Circulation.* 2007; 116:49-56.
- 81 Savoia C, Touyz RM, Amiri F, et al. Selective mineralocorticoid receptor blocker eplerenone reduces resistance artery stiffness in hypertensive patients. *Hypertension.* 2008; 51:432-439.
- 82 Epstein M, Safar ME. Aldosterone and large artery vessels. *Hypertension.* 2006; 47:e24.
- 83 Williams B, Lacy PS, Thom SM, et al. Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation.*

2006; 113:1213-1225.

- 84 Lund-Johansen P, Omvik P. Acute and chronic hemodynamic effects of drugs with different actions on adrenergic receptors: a comparison between alpha blockers and different types of beta blockers with and without vasodilating effect. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1991; 5:605-615.
- 85 Lindholm LH, Ibsen H, Dahlöf B, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002; 359:1004-1010.
- 86 Rizzoni D, Palombo C, Porteri E, et al. Relationships between coronary flow vasodilator capacity and small artery remodelling in hypertensive patients. *J Hypertens.* 2003; 21:625-631.
- 87 Schwartzkopff B, Brehm M, Mundhenke M et al. Repair of coronary arterioles after treatment with perindopril in hypertensive heart disease. *Hypertension.* 2000; 36:220-225.
- 88 Motz W, Strauer BE. Improvement of coronary flow reserve after long-term therapy with enalapril. *Hypertension.* 1996; 27:1031-1038.
- 89 Schiffrin EL, Park JB, Pu Q. Effect of crossing over hypertensive patients from a beta-blocker to an angiotensin receptor antagonist on resistance artery structure and on endothelial function. *J Hypertens.* 2002; 20:71-78.
- 90 Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, et al. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin

receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000; 101:1653-1659.

91 Thybo NK, Stephens N, Cooper A, et al. Effect of antihypertensive treatment on small arteries of patients with previously untreated essential hypertension. *Hypertension*. 1995; 25:474-481.

92 Schiffrin EL, Deng LY, Laroche P. Progressive improvement in the structure of resistance arteries of hypertensive patients after 2 years of treatment with an angiotensin I-converting enzyme inhibitor. Comparison with effects of a beta-blocker. *Am J Hypertens*. 1995; 8:229-236.

93 Schiffrin EL, Deng LY, Laroche P. Effects of a beta-blocker or a converting enzyme inhibitor on resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension*. 1994; 23:83-91.

Ç

94 Schiffrin EL, Pu Q, Park JB. Effect of amlodipine compared to atenolol on small arteries of previously untreated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2002; 15:105-110.

95 Schiffrin EL, Deng LY. Structure and function of resistance arteries of hypertensive patients treated with a beta-blocker or a calcium channel antagonist. *J Hypertens*. 1996; 14:1247-1255.

96 Savoia C, Touyz RM, Endemann DH, et al. Angiotensin receptor blocker added to previous antihypertensive agents on arteries of diabetic hypertensive patients. *Hypertension*. 2006; 48:271-277.

97 Rizzoni D, Porteri E, De Ciuceis C, et al. Effect of treatment with candesartan

- or enalapril on subcutaneous small artery structure in hypertensive patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Hypertension*. 2005; 45:659-665.
- 98 Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N, et al. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2012; 59:291-299.
- 99 Schiffrin EL, Deng LY. Comparison of effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and betablockade for 2 years on function of small arteries from hypertensive patients. *Hypertension*. 1995; 25:699-703.
- 100 Quintana-Villamandos B, Arnalich-Montiel A, Arribas S, et al. Esmolol produces regression of coronary artery remodeling in hypertensive rats: role of ADMA. *Hypertens Res*. 2016; 39: 692-700.
- 101 Brassard P, Amiri F, Thibault G, et al. Role of angiotensin type-1 and angiotensin type-2 receptors in the expression of vascular integrins in angiotensin II-infused rats. *Hypertension*. 2006; 47:122-127.
- 102 Creager MA, Roddy MA. Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. *Hypertension*. 1994; 24:499-505.
- 103 Kiowski W, Linder L, Nuesch R, et al. Effects of cilazapril on vascular structure and function in essential hypertension. *Hypertension*. 1996; 27:371-376.
- 104 Schiffrin EL, Deng LY. Comparison of effects of angiotensin I-converting

- enzyme inhibition and betablockade for 2 years on function of small arteries from hypertensive patients. *Hypertension*. 1995; 25:699-703.
- 105 Malik RA, Schofield IJ, Izzard A, et al. Effects of angiotensin type-1 receptor antagonism on small artery function in patients with type 2 mellitus. *Hypertension*. 2005; 45:264-269.
- 106 Quintana-Villamandos B, González MC, Delgado-Martos MJ, et al. Short-term esmolol attenuated remodeling of the thoracic aorta in hypertensive rats by decreasing concentrations of ADMA down-regulated by oxidative stress. *Eur J Pharmacol* 2016; 791:502-509.
- 107 Bohlen HG. Localization of vascular resistance changes during hypertension. *Hypertension*. 1986; 8:181-183.
- 108 Patel C, Yan G, Kowey P R. Dronedaron. *Circulation*. 2009; 120:636-644.
- 109 Almendral J. Papel de la dronedarona en la terapia de la fibrilación auricular: una actualización en 2015. *Sec Monogr*. 2015; 3:1-5.
- 110 Tadros R, Nattel S, Andrade JG. Dronedaron: Basic Pharmacology and Clinicl Use. *Card Electrophysiol Clin*. 2016; 8:453-65.
- 111 Schmidt C, Wiedmann F, Schweizer PA, et al. Novel electrophysiological properties of dronedarone: inhibition of human cardiac two-pore-domain potassium (K2P) channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012; 385:1003-1016.
- 112 Wakili R, Voigt N, Kaab S, et al. Recent advances in the molecular

- pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest.* 2011; 121:2955-2968.
- 113 Dobrev D, Carlsson L, Nattel S. Novel molecular targets for atrial fibrillation therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11:275-291.
- 114 Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008; 1:62-73.
- 115 Shirolkar SC, Fiuzat M, Becker RC. Dronedarone and vitamin K antagonists: A review of drug-drug interactions. *Am Heart J.* 2010; 160:577-582.
- 116 Felser A, Stoller A, Morand R, et al. Hepatic toxicity of dronedarone in mice: Role of mitochondrial β -oxidation. *Toxicol.* 2014; 323:1-9.
- 117 Serviddio G, Bellanti F, Giudetti AM, et al. Mitochondrial oxidative stress and respiratory chain dysfunction account for liver toxicity during amiodarone but not dronedarone administration. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51:2234-2242.
- 118 January CT, Wann LS, Alpert JS, et al. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 64: e1-76.
- 119 Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, et al. ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). 2012 focused update of the ESC Guidelines for the

- management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J.* 2012; 33:2719-2747.
- 120 Connolly S J, Crijns H, Torp-Pedersen C, et al. Analysis of Stroke in ATHENA: A Placebo-Controlled, Double-Blind, Parallel-Arm Trial to Assess the Efficacy of Dronedarone 400 mg BID for the Prevention of Cardiovascular Hospitalization or Death From Any Cause in Patients With Atrial Fibrillation/Atrial Flutter. *Circulation.* 2009; 120:1174-1180.
- 121 Skyschally A, Heusch G. Reduction of myocardial infarct size by dronedarone in pigs - a pleiotropic action? *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011; 25: 197-201.
- 122 Engelhorn T, Schwarz MA, Heusch G, et al. Reduction of cerebral infarct size by dronedarone. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011; 25: 523-529.
- 123 Benaim G, Hernandez-Rodriguez V, Mujica-Gonzalez S, et al. In vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:3720-3725.
- 124 Benaim G, Casanova P, Hernandez-Rodriguez V, et al. Dronedarone, an amiodarone analog with improved anti-leishmania mexicana efficacy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:2295–2303.
- 125 Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963; 27:282-93.

- 126 Kurtz TW, Morris RC, Jr. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1987; 10:127-131.
- 127 Johnson ML, Ely DL, Turner ME. Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1992; 19:425-427.
- 128 Nigro D, Fortes ZB, Scivoletto R, et al. Sex-related differences in the response of spontaneously hypertensive rats to angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Endothelium*. 1997; 5:63-71.
- 129 Iams SG, Wexler BC. Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol. *J Lab Clin Med*. 1979; 94:608-616.
- 130 Chan V, Fenning A, Levick SP, et al. Cardiovascular changes during maturation and ageing in male and female spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 57:469-478.
- 131 Kokubo M, Uemura A, Matsubara T, et al. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. *Hypertens Res*. 2005; 28:601-609.
- 132 Cingolani OH, Yang XP, Cavaasin MA, et al. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2003; 41:249-254.

- 133 Quintana-Villamandos B, Delgado-Martos MJ, Delgado-Baeza, E. Impact of a multichannel blocker in attenuating intramyocardial artery remodeling in hypertensive rats through increased nitric oxide bioavailability. *BioMed Res Int.* 2019; 2019:6374582.
- 134 Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96:379-394.
- 135 Kurtz T, Griffin A, Bidani A, et al. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. *Hypertension.* 2005; 25:299-310.
- 136 Yokoyama H, Averill D B, Brosnihan K B, et al. Role of blood pressure reduction in prevention of cardiac and vascular hypertrophy. *Am J of Hypertens.* 2005; 18:922-929.
- 137 Angus JA, Wright CE. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000; 44:395-407.
- 138 Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, et al. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J Chromatogr. B,* 851(1-2), 211-219.
- 139 Schwedhelm E, Tan-Andresen J, Maas R, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of asymmetric

- dimethylarginine in human plasma. *Clin Chem.* 2005; 51(7):1268-1271.
- 140 Brooks WW, Conrad CH, Robinson KG, et al. L-arginine fails to prevent ventricular remodeling and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 2009; 22:228-234.
- 141 Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, et al. Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1986; 55:575-581.
- 142 Wiest DB, Haney JS. Clinical pharmacokinetics and therapeutic efficacy of esmolol. *Clin. Pharmacokinet.* 2012; 51:347-356.
- 143 Garnock-Jones KP. Esmolol: A review of its use in the short-term treatment of tachyarrhythmias and the short-term control of tachycardia and hypertension. *Drugs* 2012; 72,109-132.
- 144 Dabrowska E, Harazny JM, Miskowska-Nagórna E, et al. Aortic stiffness in not only associated with structural but also functional parameters of retinal microcirculation. *Microvas Res.* 2020; 129:103974.
- 145 Renna NF, de las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens.* 2013; 2013:808353.
- 146 Marque V, Kieffer P, Atkinson, et al. Elastic properties and composition of the aortic wall in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1999; 34:415-422.
- 147 Giummelly P, Lartaud-Idjouadiene I, Marque V, et al. Effects of aging and

- antihypertensive treatment on aortic internal diameter in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension. Zhongguo yao li xue bao= Acta Pharmacologica Sinica*, 20(10), 923-928.
- 148 Su JZ, Chen SC, Wu KG, et al. Effects of perindopril, propranolol, and dihydrochlorothiazide on cardiovascular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1999; 20:923–928.
- 149 Vaja V, Ochodnický P, Kreněk P, et al. Rapid large artery remodeling following the administration and withdrawal of calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2009; 619:85–91.
- 150 Han WQ, Wu LY, Zhou HY, et al. Changes in the composition of the thoracic aortic wall in spontaneously hypertensive rats treated with losartan or spiro lactone. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009; 36:583-588.
- 151 Fernandes-Santos C, de Souza Mendonca L, Mandarim-de-Lacerda CA. Favorable cardiac and aortic remodeling in olmesartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Heart Vessels*. 2009; 24(3):219-217.
- 152 Liu Q, Dong S, Zhou X, et al. Effects of long-term intervention with losartan, aspirin and atorvastatin on vascular remodeling in juvenile spontaneously hypertensive rats. *Molecules*. 2023; 28:1844.
- 153 Christiansen CB, Torp-pedersen C, Kober L. Efficacy and safety of dronedarone: a review of randomized trials. *Expert Opin Drug Saf*. 2010; 9:189-199.

- 154 Schweizer PA, Becker R, Katus HA. Dronedarone: current evidence for its safety and efficacy in the management of atrial fibrillation. *Drug Des Devel Ther.* 2011; 5:27–39.
- 155 Mathiassen ON, Buus N, Sihm, et al. Small artery structure is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. *J Hypertens.* 2007; 25(5):1021-1026.
- 156 Heeneman S, Sluimer JC, Daemen MJ. Angiotensin-Converting Enzyme and Vascular Remodeling. *Cir Res.* 2007; 101(5):441-454.
- 157 Zicha J, Kunes J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev.* 1999; 79(4):1227-1282.
- 158 Han WQ, Chen J, Wu LY, et al. Different biomechanical properties of medial and adventitial layers of thoracic aorta in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2010; 31(10):1319-1323.
- 159 Brown IAM, Diederich L, Good ME, et al. Vascular smooth muscle remodeling in conductive and resistance arteries in hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018; 38:1969-1985.
- 160 Gore MO, Lüneburg N, Schwedhelm E, et al. Symmetrical dimethylarginine predicts mortality in the general population observations from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:2682-2688.
- 161 Kiechl S, Lee T, Santer P, et al. Asymmetric and symmetric

- dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. *Atherosclerosis*. 2009; 205:261.
- 162 Lüneburg N, von Holten RA, Töpper RF, et al. Symmetric dimethylarginine is a marker of detrimental outcome in the acute phase after ischaemic stroke: role of renal function. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122:105–111.
- 163 Schulze F, Carter AM, Schwedhelm E, et al. Symmetric dimethylarginine predicts all-cause mortality following ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2010; 208:518–523.
- 164 Lüneburg N, Lieb W, Zeller T, et al. Genome-wide association study of L-arginine and dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for symmetric dimethylarginine. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014; 7:864–872.
- 165 Böger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler. Suppl* 2003; 4:23–28.
- 166 Böger RH, Endres HG, Schwedhelm E, et al. Asymmetric dimethylarginine as an independent risk marker for mortality in ambulatory patients with peripheral arterial disease. *J Intern Med*. 2011; 269:349–361.
- 167 Siegerink B, Maas R, Vossen CY, et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginine and risk of secondary cardiovascular disease events and mortality in patients with stable coronary heart disease: the KAROLA follow-up study. *Clin Res Cardiol*. 2013; 102:193–202.
- 168 Chandrasekharan UM, Wang Z, Wu Y, et al. Elevated levels of plasma

- symmetric dimethylarginine and increased arginase activity as potential indicators of cardiovascular comorbidity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2018; 20(1):123.
- 169 Mels CMC, Schutte AE, Huisman HW, et al. Asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine prospectively relates to carotid wall thickening in black men: the SABPA study. *Amino Acids.* 2017; 49:1843–1853.
- 170 Bahls M, Friedrich N, Atzler D, et al. L-Arginine and SDMA Serum Concentrations Are Associated with Subclinical Atherosclerosis in the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Plos One.* 2015; 10:e0131293.
- 171 Riccioni G, Scotti L, D’Orazio N, et al. ADMA/SDMA in elderly subjects with asymptomatic carotid atherosclerosis: values and site-specific association. *Int J Mol Sc.* 2014; 15:6391–6398.
- 172 Guiraudou P, Pucheu S C, Gayraud R, et al. Involvement of nitric oxide in amiodarone- and dronedarone-induced coronary vasodilation in guinea pig heart. *Eur J Pharmacol.* 2004; 496:119-127.
- 173 Schepers E, Glorieux G, Dhondt A, et al. Symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ROS via store-operated calcium influx in monocytes. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:1429–1435.
- 174 Zhang ZM, Wang BX, Ou WS, et al. Administration of losartan improves aortic arterial stiffness and reduces the occurrence of acute coronary syndrome in aged patients with essential hypertension. *J Cell Biochem.* 2019;

120:5713-5721.

- 175 Van Beeren HC, Kwakkel J, Ackermans MT, et al. Action of specific thyroid hormone receptor $\alpha(1)$ and $\beta(1)$ antagonists in the central and peripheral regulation of thyroid hormone metabolism in the rat. *Thyroid*. 2012; 22(12):1275-1282.
- 176 Stoykov I, van Beeren HC, Moorman AF, et al. Effect of amiodarone and dronedarone administration in rats on thyroid hormone-dependent gene expression in different cardiac components. *Eur J Endocrinol*. 2007; 156(6):695-702.
- 177 Van Beeren HC, Jong WM, Kaptein E, et al. Dronedarone acts as a selective inhibitor of 3,5,3'-triiodothyronine binding to thyroid hormone receptor- $\alpha 1$: in vitro and in vivo evidence. *Endocrinology*. 2003; 144(2):552-558.
- 178 Prasad A, Dunnill GS, Mortimer PS, et al. Capillary rarefaction in the forearm skin in essential hypertension. *J Hypertens*. 1995; 13:265-268.

Anexo

RESEARCH ARTICLE

The protective effect of dronedarone on the structure and mechanical properties of the aorta in hypertensive rats by decreasing the concentration of symmetric dimethylarginine (SDMA)

Begoña Quintana-Villamandos^{1,2†*}, María del Carmen González³, María Jesús Delgado-Martos⁴, Perla Yareli Gutiérrez-Arzapalo⁵, Rainer H. Böger⁶, Nicole Lüneburg⁶, David Muñoz⁷, Emilio Delgado-Baeza⁴

1 Department of Anesthesiology, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain, **2** Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, University Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **3** Department of Physiology, Faculty of Medicine, University Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, **4** Molecular Biology Laboratory, Department Experimental Medicine and Surgery, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain, **5** Center of Research and Teaching in Health Sciences (CIDOCS), Autonomous University of Sinaloa, Sinaloa, Mexico, **6** Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, **7** Department of Experimental Surgery, University Autónoma of Madrid, Madrid, Spain

† Current address: Department of Anaesthesiology Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain

* begoquinti@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Quintana-Villamandos B, González MdC, Delgado-Martos MJ, Gutiérrez-Arzapalo PY, Böger RH, Lüneburg N, et al. (2019) The protective effect of dronedarone on the structure and mechanical properties of the aorta in hypertensive rats by decreasing the concentration of symmetric dimethylarginine (SDMA). PLoS ONE 14(5): e0216820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216820>

Editor: Nick Ashton, The University of Manchester, UNITED KINGDOM

Received: January 9, 2019

Accepted: April 29, 2019

Published: May 21, 2019

Copyright: © 2019 Quintana-Villamandos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: Funded by grant from the Spanish Health Ministry (number FIS 16/02069) and Fondos Feder (BQV).

Abstract

Background and aims

Dronedarone is a new multichannel-blocking antiarrhythmic for the treatment of patients with atrial fibrillation. Our group has demonstrated that dronedarone produces regression of cardiac remodeling; however, its effect on the remodeling of the elastic arteries has not yet been reported. We aim to assess the effects of dronedarone on the regression of thoracic aortic remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHRs).

Method

Ten-month-old male SHRs were randomly assigned to an intervention group (SHR-D), where the animals received dronedarone treatment (100 mg/kg), to a control group (SHR) where rats were given vehicle, or to a group (SHR-A) where they were given amiodarone. A fourth group of normotensive control rats (Wistar-Kyoto rats, WKY) was also added. After two weeks of treatment, we studied the structure, the elastic fiber content of the thoracic aorta using histological techniques and confocal microscopy, and the vascular mechanical properties using an organ bath and isometric tension analysis. A mass spectrometric determination of symmetric dimethylarginine (SDMA) concentrations was performed.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Results

SHR group developed the classic remodeling expected from the experimental model: outward hypertrophic remodeling, increased elastic fiber content and wall stiffness. However, the SHR-D group showed statistically significantly lower values for aortic tunica media thickness, wall to lumen ratio, external diameter, cross-sectional area, volume density of the elastic fibers, wall stiffness, and aortic SDMA concentration when compared to the SHR group. These parameters were similar in the SHR and SHR-A groups. Interestingly, the values for tunica media thickness, volume density of the elastic fibers, wall stiffness, and SDMA concentration obtained from the SHR-D group were similar to those measured in the WKY group.

Conclusion

These results suggest that dronedarone improves the structure and passive mechanical properties of the thoracic aorta in hypertensive rats, and that this protective effect could be associated with a reduction in the concentration of aortic SDMA.

Introduction

Hypertension is the most common cause of hypertensive heart disease [1]. Hypertension induces cardiac remodeling, such as hypertrophy, which is related to arrhythmias (atrial and ventricular fibrillation), myocardial ischemia, and sudden cardiac death [2]. Hypertension increases the peripheral vascular resistance because of structural and functional changes to the large (conductive) and small (resistance) arteries [3]. However, the use of antihypertensive therapy can prevent cardiovascular events by producing a regression of cardiovascular remodeling [4–7].

Dronedarone is a new multichannel-blocking antiarrhythmic for the treatment of patients with atrial fibrillation [8]. The ATHENA trial has shown a significant reduction in the time to first cardiovascular hospitalization or death in patients with atrial arrhythmias receiving dronedarone [9]. Dronedarone produces a reduction in the risk of stroke [10] and acute coronary syndrome [11] that may be related to reduced heart rate and arterial blood pressure [12,13]. Our group has previously demonstrated that dronedarone produces regression of left ventricular hypertrophy (LVH) in hypertensive rats after two weeks of treatment (resulting in reduced left ventricular mass, changes in the cardiomyocytes and collagen of the left ventricle, and an improvement in cardiac metabolism) [14]. However, the impact of this drug on vascular remodeling has not yet been studied.

Symmetric dimethylarginine (SDMA) is a biomarker that indirectly reduces the synthesis of nitric oxide (NO) by inhibiting the cellular uptake of the NO precursor, L-arginine [15]. Some recent studies have suggested that SDMA is associated with cardiovascular events [16,17], and it has been identified as an independent predictor of cardiovascular mortality [16]. In the Dallas Heart Study, SDMA was found to be associated with an increase in aortic wall thickness [16], and in the SABPA study, with an increase in carotid intima-media thickness [18].

Given that dronedarone produces a regression of the LVH induced by hypertension, we hypothesize that this drug could improve thoracic aortic remodeling. The aim of the present study is to test this hypothesis, assessing the following in SHRs: 1) the effect of dronedarone on

the structure of the thoracic aortic wall, 2) the effect of dronedarone on the passive mechanical function of the aorta, and 3) the role of SDMA in the regression of aortic remodeling mediated by dronedarone.

Materials and methods

Experiments were performed using spontaneously hypertensive rats (SHR) from the colony maintained at the Animal House facility of the Universidad Autónoma de Madrid. All experimental procedures conformed to the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and the Spanish legislation (Directive 2010/63/UE and RD 53/2013) and were approved by the Ethics Review Board of Hospital Universitario Gregorio Marañón and of the local Government (Comunidad Autónoma de Madrid).

Animals and experimental protocols

The rats were supplied with standard rat chow and drinking water *ad libitum*. They were maintained on a 12h/12h light/dark cycle and housed at a constant temperature of 24°C and relative humidity of 40%.

Ten-month-old male SHRs were randomly assigned to an intervention group (SHR-D, $n = 8$), where they received oral dronedarone (Multaq, Sanofi-Aventis, Barcelona, Spain) (100 mg/kg, once daily) for a period of 14 days, or to a control group (SHR, $n = 8$), where they were given the vehicle only, or to a group (SHR-A, $n = 8$) where they were given amiodarone (Trangorex, Sanofi-Aventis, Barcelona, Spain) (30 mg/kg, once daily). A fourth group of normotensive control rats (Wistar-Kyoto rats, WKY, $n = 8$) was also added. Once treatment was complete, rats were sedated with an intraperitoneal injection of diazepam (Valium, Roche Pharmaceuticals, Madrid, Spain) (4 mg/kg) and ketamine (Ketolar, Parke-Davis, Madrid, Spain) (10 mg/kg) and killed by decapitation. The thoracic aorta was excised to study its vascular structure, mechanical function and the biomarker SDMA.

Arterial pressure and heart rate measurements

Systolic arterial pressure (SAP) and heart rate (HR) were measured in conscious WKY, SHR, SHR-D and SHR-A animals with a photoelectric sensor (Niprem 546, Cibertec, Madrid, Spain) using the tail-cuff method. Several determinations were made, and the findings were considered valid if 10 consecutive measurements were within 10 mmHg of each other.

Vascular structure: Histology and confocal microscopy

Histological study. The study of aortic geometry was performed as previously described [19]. A 1 mm segment of the thoracic aorta was fixed in 4% sodium-buffered formaldehyde. Samples were then dehydrated and embedded in paraffin. Serial sections (5 μm) were stained with orcein. A total of 8 segments of thoracic aorta per group were observed and analyzed using a high-resolution camera (Sony CCD IRIS) attached to a microscope (Leica DMLB, 4x objective). The external diameter (ED) (inner diameter + tunica intima + tunica media + tunica adventitia) and lumen diameter (LD) of the aorta were measured. The wall thickness (WT) was expressed as $(ED-LD)/2$, the wall-to-lumen ratio (W/L) as $(WT/LD) \times 100$, and the cross-sectional area (CSA) (tunica intima + tunica media + tunica adventitia) as $(\pi/4) \times (ED^2-LD^2)$ [20]. The volume density of the elastic fibers in the tunica media was analyzed in 8 segments of thoracic aorta per group (40x objective). The morphometric analysis was performed using the method of Gundersen et al. [21].

Confocal microscopy study. Confocal microscopy was used to assess the thickness of the tunica media and tunica adventitia in the thoracic aorta as previously described [19]. Briefly, segments (1 mm in length) were fixed in 4% PFA before being washed in 9% saline solution and stained with DAPI (1:500 from a stock solution of 5 mg/mL). One ring and one longitudinal section were cut from each segment and mounted on a slide with a small well made of spacers to avoid vessel compression. The well was then filled with the mounting medium (Citifluor, Anname, Spain). The rings were visualized with a 20x objective at zoom 2 at the 488 nm/515 nm line, and several images were captured to quantify the thickness of the media in the ring section. The longitudinal section was mounted with the tunica adventitia facing upwards and viewed using a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at excitation 405 nm/emission 410–475 nm. In each artery, three randomly selected regions were visualized with a 20x objective at zoom 4. In each of these regions, stacks of 1 μ m thick serial optical sections were captured from the tunica adventitia. Quantitative analysis was performed using MetaMorph Image Analysis Software (Universal Imaging, Co., UK) as previously described [19].

The passive mechanical function of the aorta

The study of the passive mechanical function of the aorta was performed as previously described [19]. Briefly, 3 mm-long descending thoracic aortic rings were suspended on two intraluminal parallel wires, placed into an organ bath containing oxygenated calcium-free (0Ca^{2+}) Krebs-Henseleit solution (KHS, in mM: 115.0 NaCl, 25.0 NaHCO_3 , 4.7 KCl, 1.2 MgSO_4 , 7 H_2O , 1.2 KH_2PO_4 , 11.1 glucose and 10 EGTA), and connected to a Piodem strain gauge for isometric tension recording. The vessel mounted on the wire support was then left for 30 min to equilibrate at 37°C before undergoing 200 μ m stretches using a micrometer to measure the tension applied.

Internal circumferential (L) and circumferential wall tension (T) were calculated using the following equations, reported elsewhere [22]:

$$L = (\pi + 2)d + 2f \quad (1)$$

$$T = F/2g \quad (2)$$

where d (mm) is the diameter of the wires, f (mm) is the separation between the wires (increasing by micrometer intervals), F (N) is the wall force, and g (mm) is the length of the vessel.

The experimental values F_i and f_i (for each stretch) were used to calculate L_i and T_i according to Eqs (1) and (2) above, and the values of T_i and L_i were fitted by an exponential equation using non-linear regression analysis:

$$T_i = Ae^{BL_i} \quad (3)$$

The wall stiffness parameter (B) was used to compare the passive mechanical properties of the aorta in the WKY, SHR, SHR-D and SHR-A groups.

Measurement of symmetric dimethylarginine concentrations in the aorta

Mass spectrometric determination of SDMA concentrations was performed as previously described using a fully validated high-throughput liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) assay [23,24]. In brief, samples were analyzed using 96-well 0.20- μ m microfiltration plates pre-coated with internal standards. After conversion to their butyl ester derivatives, analytes were evaluated using a Varian 1200L Triple Quadrupole MS (Varian, Walnut Creek, CA, USA) in the positive electrospray ionization (ESI+) mode.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (Version 5) and SPSS (Version 20). The data are expressed as mean ± SEM. Statistical differences between the groups (physiological, structural and mechanical parameters, and concentrations of SDMA) were analyzed by one-way ANOVA. A post hoc Bonferroni correction was applied. Non-regression analysis with an exponential equation was used to estimate mechanical parameters (the B parameter). The Pearson coefficient was applied to analyze the correlation between aortic SDMA concentrations and wall thickness. P<0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Dronedarone and physiological parameters

Rat weight, systolic arterial pressure and heart rate are shown in Table 1. Rat weight was higher in the WKY group (11.4%, P<0.01) than in the SHR group, although no differences were detected between the SHR, SHR-D and SHR-A groups. The administration of dronedarone to the SHR-D group for two weeks was associated with a reduction in tail-cuff SAP (18.6%, P<0.01) when compared to the SHR group, but no differences were detected with respect to the WKY group. The decrease in SAP found in the SHR-D group was associated with a reduction in HR when compared to both SHR and WKY groups (20.3%, P<0.001 and 21.3%, P<0.001, respectively). The SHR-A group showed the same level of SAP reduction and HR as the SHR-D group.

Dronedarone improves structural aortic remodeling

The aortic geometric parameters obtained from the histological study and the confocal microscopy are shown in Figs 1A, 1B and 2A (S1 Table). The SHR group showed outward hypertrophic remodeling associated with an increase in LD (21.8%, P<0.001) and CSA (arterial wall mass) (142.2%, P<0.001) in comparison to the WKY group. The administration of dronedarone to the SHR-D group resulted in a 35.7% decrease in CSA (P<0.001) when compared to the SHR group. No differences in LD were detected between the SHR and SHR-D groups. The WT and ED of the SHR group increased by 94.4% (P<0.001) and 31.7% (P<0.001), respectively, when compared to the WKY group; however, two weeks of dronedarone administration decreased these parameters by 27% (P<0.001) and 6.7% (P<0.001) in the SHR-D group, and no differences were detected in WT with respect to the WKY group. The SHR group presented

Table 1. Weight, arterial pressure and heart rate of WKY, SHR, SHR-D and SHR-A groups.

	WKY (n = 8)	SHR (n = 8)	SHR-D (n = 8)	SHR-A (n = 8)
Body weight (g)	441.13 ± 10.21	390.92 ± 5.12**	387.85 ± 3.82**	385.14 ± 3.15**
SAP (mmHg)	138 ± 15	178 ± 20**	145 ± 10##	143 ± 20##
HR (bpm)	400 ± 24	395 ± 17	315 ± 14***###	324 ± 21***,###

SAP: systolic arterial pressure; HR: heart rate; WKY: Wistar-Kyoto rats; SHR: spontaneously hypertensive rats; SHR-D: spontaneously hypertensive rats treated with dronedarone; SHR-A: spontaneously hypertensive rats treated with amiodarone. Statistically significant differences between WKY, SHR and SHR-D are shown as follows:

**P<0.01 vs. WKY,

***P<0.001 vs. WKY,

P<0.01 vs. SHR,

###P<0.001 vs. SHR. Values are given as mean ± SEM.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216820.t001>

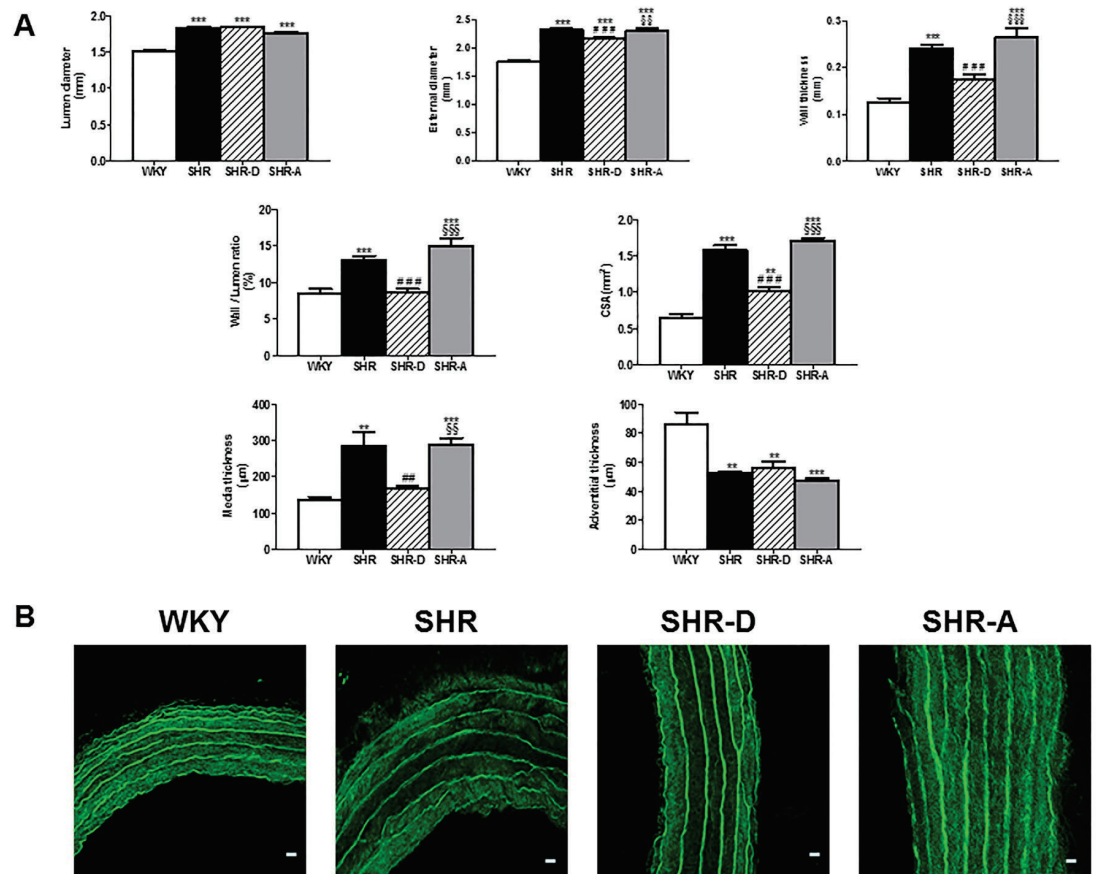


Fig 1. Aortic geometry obtained by histology and confocal microscopy. (A) Aortic structural parameters: lumen diameter, external diameter, wall thickness, wall/lumen ratio and cross-sectional area (obtained by histology); tunica media and adventitia thickness (obtained by confocal microscopy) in WKY (Wistar-Kyoto rats), SHR (spontaneously hypertensive rats), SHR-D (spontaneously hypertensive rats treated with dronedarone) and SHR-A (spontaneously hypertensive rats treated with amiodarone). Statistically significant differences between the WKY, SHR, and SHR-D and SHR-A groups are shown as follows: ** $P < 0.01$ vs. WKY, *** $P < 0.001$ vs. WKY, ## $P < 0.01$ vs. SHR, ### $P < 0.001$ vs. SHR, §§ $P < 0.01$ vs. SHR-D, §§§ $P < 0.001$ vs. SHR-D. Values are given as mean \pm SEM. $n = 8$ rats per group. (B) Examples of the tunica media obtained using confocal microscope images (20 x at zoom 2, 100 μm) from WKY, SHR, SHR-D and SHR-A animals.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216820.g001>

an increase in W/L (55.5%, $P < 0.001$) when compared to the WKY group. In the SHR-D group, dronedarone produced a decrease in W/L (34%, $P < 0.001$) with respect to the SHR group, and no differences were detected with respect to the WKY group. All structural parameters were similar in the SHR and SHR-A groups.

When compared to the WKY group, the media thickness of the SHR group was increased by 128.6% ($P < 0.01$). The analysis by confocal microscopy shows that dronedarone produced a marked decrease in the thickness of this tunica (41.4%, $P < 0.01$) when comparing the SHR-D group to the SHR group, and that this value was comparable to that of the WKY group. No significant differences in adventitial thickness were observed between the SHR and SHR-D groups. Both SHR and SHR-D animals showed a decrease in this parameter (38.2%, $P < 0.01$; 34.5%, $P < 0.01$, respectively) when compared to the WKY group. The media and adventitial thickness were similar in the SHR and SHR-A groups (S1 Table).

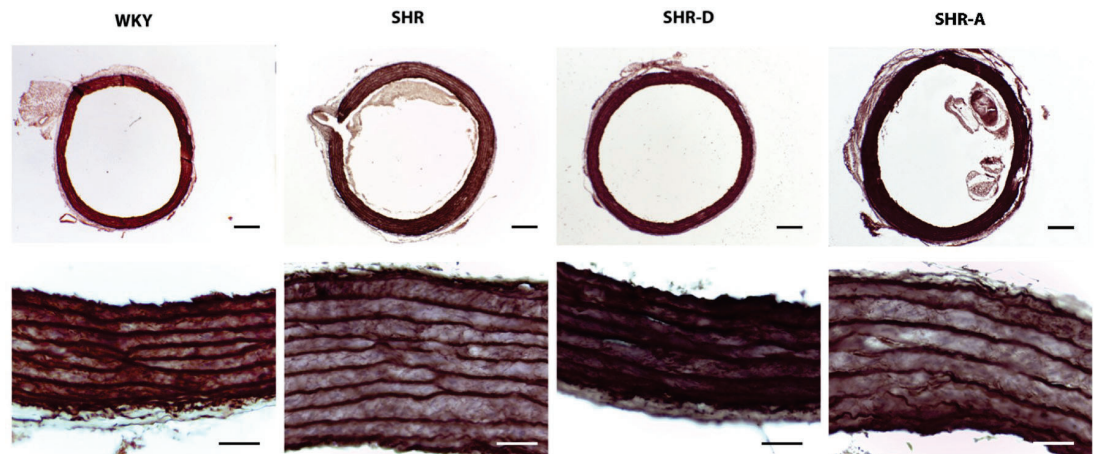


Fig 2. Sections of aorta and elastic fibers obtained from the histological study. (A) Examples of sections of aorta (tunica intima + media + adventitia) (Orcein 40 x, 300 μ m) and (B) examples of the elastic fiber content of the tunica media (Orcein 400 x, 50 μ m) from WKY (Wistar-Kyoto rats), SHR (spontaneously hypertensive rats), SHR-D (spontaneously hypertensive rats treated with dronedarone) and SHR-A (spontaneously hypertensive rats treated with amiodarone).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216820.g002>

Dronedarone improves the mechanical properties of the aorta

The volume density of the elastic fibers in the tunica media obtained from the histological study is shown in Figs 2B and 3A (S1 Table). In the SHR group, the volume density of these fibers was increased by 32.1% ($P < 0.001$) compared to the WKY group. Dronedarone administration resulted in a 17.4% decrease in this parameter in the SHR-D group ($P < 0.001$). No differences were found between the WKY and SHR-D groups. The volume density of the elastic fibers was similar in the SHR and SHR-A groups.

The tensile forces acting on the aortic wall are shown in Fig 3B (S1 Table). Experimental data for the circumferential wall tension–internal circumference curve were fitted to an exponential model to calculate the B parameter, which is related to the slope of the above curve. In the SHR group, the B parameter was increased (50.5%, $P < 0.001$) compared to the WKY group. The B parameter in the SHR-D group was smaller (13.9%, $P < 0.001$) than that of the SHR group. No differences were found between the WKY and SHR-D groups. The B parameter was similar in the SHR and SHR-A groups.

Dronedarone decreases aortic symmetric dimethylarginine concentration

The aortic SDMA concentration is shown in Fig 4A (S1 Table). SDMA in the SHR group was increased by 88.7% ($P < 0.05$) compared to the WKY group. The administration of dronedarone to the SHR-D group decreased SDMA by 56.8% ($P < 0.05$) when compared to the SHR group; in addition, the aortic SDMA value returned to normal after treatment with dronedarone.

A correlation analysis showed a positive correlation between aortic SDMA concentration and wall thickness (Pearson's $r = 0.76$, $P < 0.001$) in all experimental groups (WKY, SHR and SHR-D) (Fig 4B).

Discussion

The present study was performed to evaluate the effect of dronedarone on the regression of aortic remodeling after two weeks of treatment. Our main findings are that: 1) dronedarone

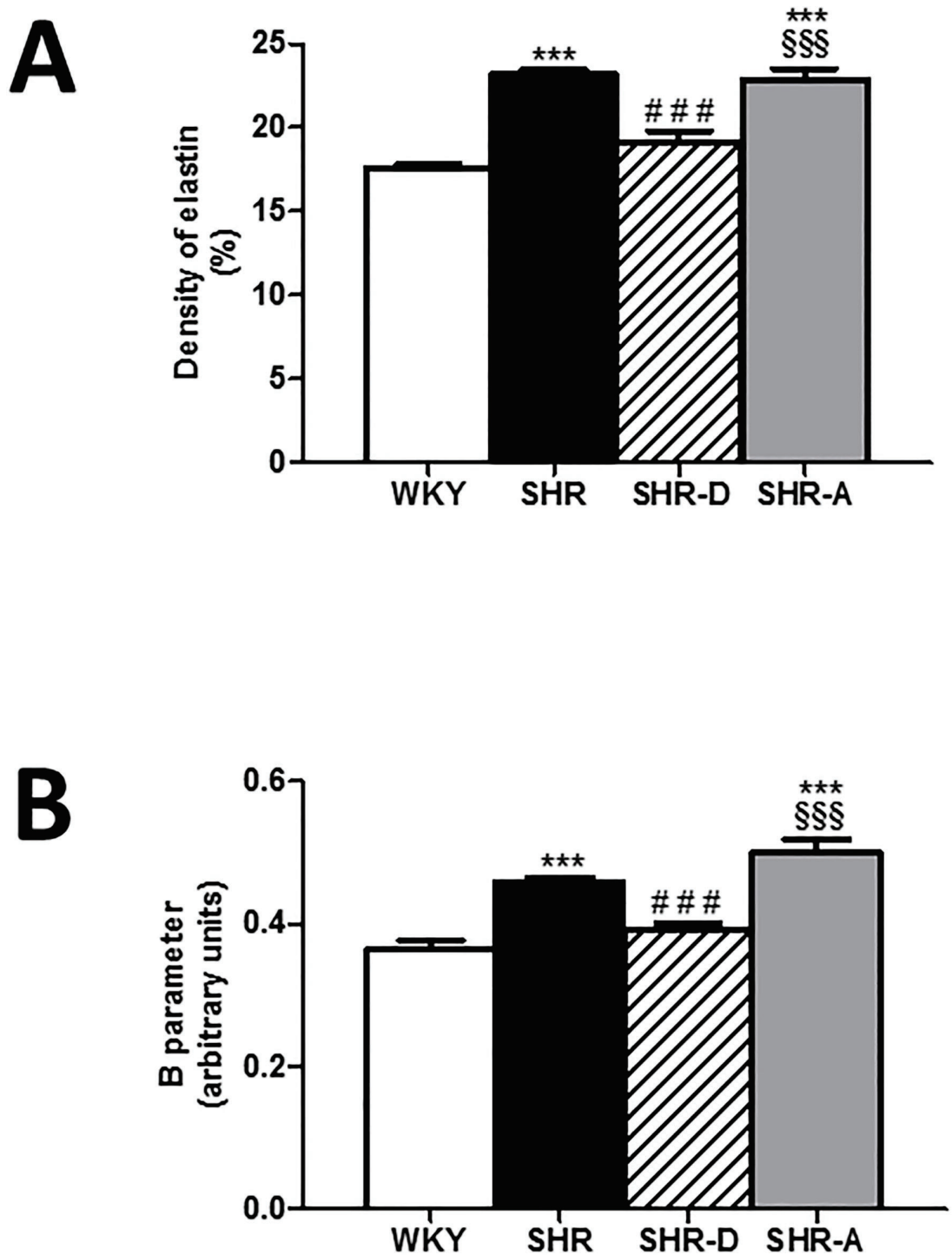


Fig 3. Aortic elastin density and wall stiffness in all experimental groups. (A) Elastin density and (B) the passive mechanical properties (B parameter) of the aorta in WKY (Wistar-Kyoto rats), SHR (spontaneously hypertensive rats), SHR-D (spontaneously hypertensive rats treated with dronedarone) and SHR-A (spontaneously hypertensive rats treated with amiodarone). Statistically significant differences between WKY, SHR, SHR-D and SHR-A are shown as follows: *** $P < 0.001$ vs. WKY, ### $P < 0.001$ vs. SHR, \$\$\$ $P < 0.001$ vs. SHR-D. Values are given as mean \pm SEM. $n = 8$ rats per group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216820.g003>

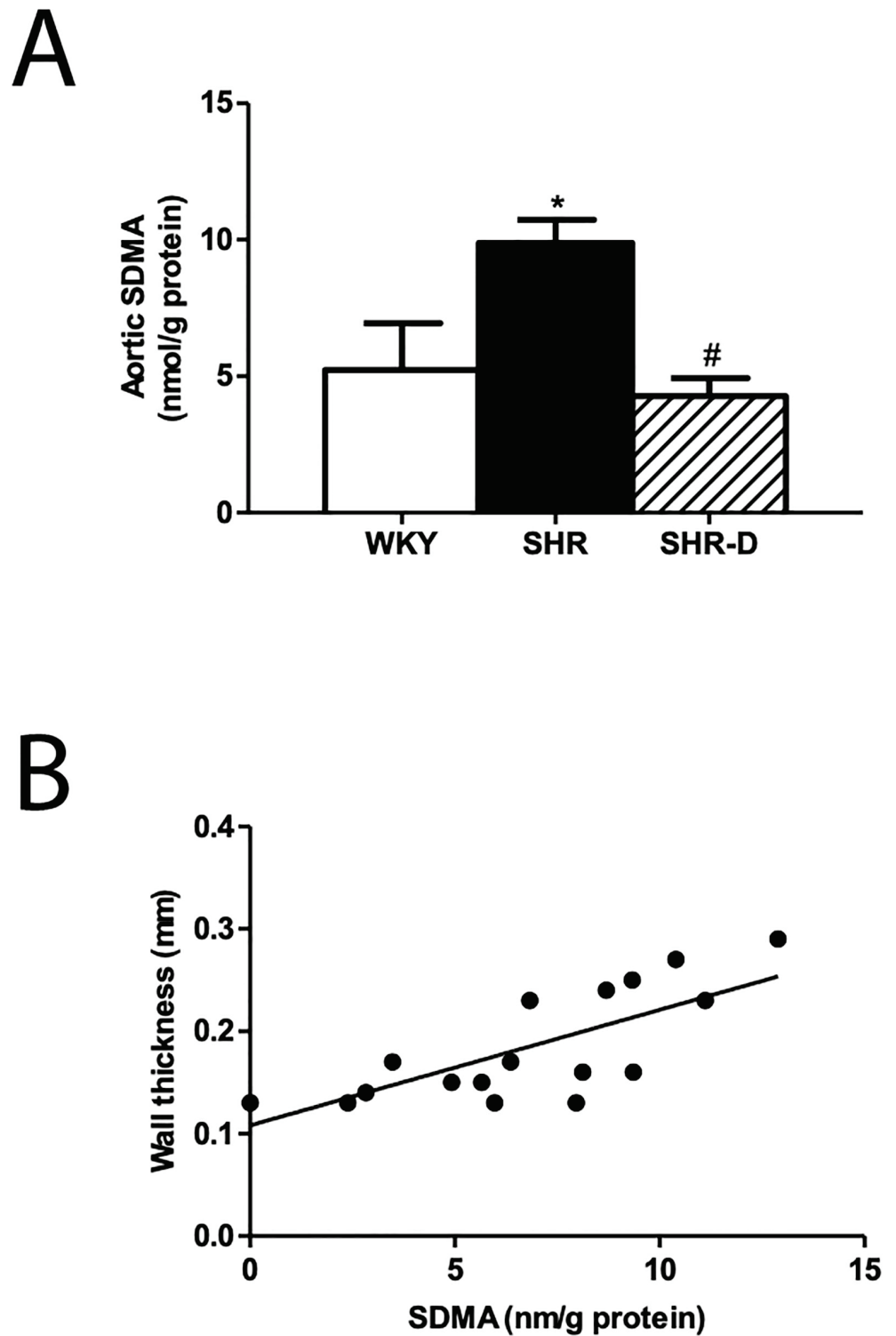


Fig 4. Aortic symmetric dimethylarginine concentration and its association with wall thickness. (A) Aortic SDMA concentration in WKY (Wistar-Kyoto rats), SHR (spontaneously hypertensive rats) and SHR-D (spontaneously hypertensive rats treated with dronedarone). Statistically significant differences between the WKY, SHR and SHR-D groups are shown as follows: * $P < 0.05$ vs. WKY, # $P < 0.05$ vs. SHR. Values are given as mean \pm SEM. $n = 8$ rats per group. (B) Pearson's correlation analysis shows a positive correlation ($P < 0.001$) between aortic SDMA concentration and wall thickness in all experimental groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216820.g004>

produces changes in the aortic structure (decreased wall thickness); 2) dronedarone produces changes in the mechanical properties of the aorta (reduced volume density of the elastic fibers and decreased wall stiffness); 3) these effects could be associated with a reduction in aortic SDMA concentrations; and 4) Amiodarone (antiarrhythmic agent) does not produce changes in the structure of the aorta or in the mechanical properties.

Dronedarone and the regression of aortic remodeling

Dronedarone is a new antiarrhythmic developed for the treatment of atrial fibrillation and atrial flutter [25]. It exerts its antiarrhythmic effects through multichannel blockade of sodium, potassium, and calcium channels and exhibits antiadrenergic properties [26]. Dronedarone reduces the risk of acute coronary syndrome because it reduces the heart rate and arterial pressure, and it has a direct cardioprotective effect (resulting in a reduction in infarct size in an animal ischemia/reperfusion model) [11]. This cardioprotective effect has been associated with reduced mortality [27]. Our results are consistent with other studies that describe a decrease in blood pressure and heart rate associated with the administration of this drug [11]. Our group has previously demonstrated that dronedarone produces a regression of LVH in hypertensive rats after two weeks of treatment [14]. However, the impact of this drug on the remodeling of the elastic arteries (e.g. the aorta) has not yet been studied.

Cardiovascular disease is the leading cause of death in the general population [28]. Hypertension induces morphological and physiological changes in the arterial wall [29]; therefore, the regression of these changes is one of the goals of antihypertensive therapy [7] in order to reduce the incidence of adverse cardiovascular events [5,6]. Several studies have shown changes in aortic remodeling (a reduction in aortic wall thickness) in SHR as a result of antiarrhythmic and antihypertensive therapy (β -adrenergic blockers, ACE inhibitors, angiotensin receptor antagonists, and calcium channel blockers) [19,30–34]. When compared to these studies, dronedarone did not show any differential effects on aortic remodeling (decreased aortic media layer and CSA); however, dronedarone also produced changes in the passive mechanical properties of the aorta. Increases in wall stress and biomechanical stretch are a consequence of hypertension and are potent drivers of arterial remodeling [35]. These alterations are also linked to a higher risk of adverse cardiovascular events. We therefore found it to be of interest to study the effects of dronedarone treatment on the structure and mechanical properties of the elastic arteries (the aorta and carotid artery). We and other authors have previously observed that SHR show outward aortic hypertrophic remodeling, increased elastic fiber content and increased wall stiffness [19,36]. This is a consequence of arterial hypertension in the elastic arteries [3,37]. Under our experimental conditions, dronedarone reduced the volume density of the elastic fibers, and decreased wall stiffness after two weeks of treatment. Similar results have been described with antihypertensive therapy (angiotensin receptor antagonists), but after four months of treatment.

The association between dronedarone, aortic wall thickness and symmetric dimethylarginine concentration

Our results show that dronedarone reduces the aortic concentration of SDMA. SDMA is an inhibitor of the intracellular uptake of L-arginine, and may additionally affect vascular homeostasis by NO-independent mechanisms [15,28]. SDMA is found in the plasma and in all human and rodent tissues [17]. Several studies have identified SDMA as potential biomarker for cardiovascular disease, associated with major cardiovascular events and mortality in patients with coronary artery disease, peripheral arterial disease and end-stage renal disease

[38–41]. In addition, SDMA is predictive of all-cause mortality after cerebral ischemic stroke [42,43].

High plasma SDMA concentrations have been positively associated with vascular wall thickness [16,18,44,45]. In the Dallas Heart Study, SDMA was associated with increased aortic wall thickness in a general population-based cohort [16]. One experimental study has shown that SDMA may contribute to proinflammatory events in the vascular wall by opening store-operated calcium channels in monocytes, leading to monocyte activation. This mechanism could be involved in the association between SDMA concentration and vascular wall thickness [28].

Our experimental study found a positive association between SDMA concentration and thoracic aortic wall thickness, which may support these clinical observations. Thus, our results not only support the regression of aortic remodeling after treatment with dronedarone, but also suggest that a decrease in SDMA levels may be related to this effect. We cannot explain the molecular mechanisms responsible for the effect of dronedarone on aortic remodeling; however, our results suggest an important role for the lowering of SDMA concentration in strategies to delay vascular remodeling.

Dronedarone and stroke

The deleterious effects of hypertension include arterial remodeling (increased wall thickness) [29], and a single-vessel occlusion can significantly reduce the blood flow in ischemia [46]. Hypertension is the leading cause of stroke. In the ATHENA study (a randomized double-blind clinical trial), dronedarone reduced the risk of stroke by 36% in 2301 patients receiving dronedarone (1999 with hypertension) when compared to 2327 patients on a placebo (1996 with hypertension) [10]. The mechanisms by which dronedarone might reduce the risk of stroke are a reduction in blood pressure and a decrease in heart rate [10]. Several studies have shown that SDMA is associated with increased carotid wall thickness [18,44,45] and an increase in cardiovascular events (stroke) [42,43]. Therefore, as the present study shows that dronedarone reduces vascular wall thickness and decreases SDMA concentration, it is reasonable to speculate that its effect on vascular remodeling might be the mechanism by which dronedarone reduces the risk of stroke. Further studies are necessary to confirm this hypothesis.

Conclusions and perspectives

Regarding our initial hypothesis, we conclude that dronedarone improves the structure and the passive mechanical properties of the thoracic aorta in hypertensive rats, and that this effect could be associated with the reduction in aortic SDMA concentrations. Dronedarone is currently indicated for the treatment of atrial fibrillation; however, if the results of this study are confirmed in humans, dronedarone could be taken into consideration for the treatment of patients with atrial fibrillation and chronic hypertension.

Supporting information

S1 Table. Geometry, mechanical properties and symmetric dimethylarginine of the aorta in WKY, SHR, SHR-D and SHR-A.
(PDF)

Author Contributions

Conceptualization: Begoña Quintana-Villamandos, María del Carmen González, Emilio Delgado-Baeza.

Data curation: Begoña Quintana-Villamandos, María del Carmen González, María Jesús Delgado-Martos, Perla Yareli Gutiérrez-Arzapalo, Rainer H. Böger, Nicole Lüneburg, David Muñoz, Emilio Delgado-Baeza.

Formal analysis: Begoña Quintana-Villamandos, María del Carmen González, Rainer H. Böger, Nicole Lüneburg, Emilio Delgado-Baeza.

Funding acquisition: Begoña Quintana-Villamandos, Emilio Delgado-Baeza.

Investigation: Begoña Quintana-Villamandos, María del Carmen González, María Jesús Delgado-Martos, Perla Yareli Gutiérrez-Arzapalo, Rainer H. Böger, Nicole Lüneburg, David Muñoz, Emilio Delgado-Baeza.

Methodology: Begoña Quintana-Villamandos, María del Carmen González, Emilio Delgado-Baeza.

Project administration: Begoña Quintana-Villamandos, Emilio Delgado-Baeza.

Resources: Begoña Quintana-Villamandos, María del Carmen González, Emilio Delgado-Baeza.

Software: María Jesús Delgado-Martos, Perla Yareli Gutiérrez-Arzapalo, Rainer H. Böger, Nicole Lüneburg, David Muñoz.

Supervision: Begoña Quintana-Villamandos, María del Carmen González, Emilio Delgado-Baeza.

Validation: Begoña Quintana-Villamandos, María del Carmen González, María Jesús Delgado-Martos, Perla Yareli Gutiérrez-Arzapalo, Rainer H. Böger, Nicole Lüneburg, David Muñoz, Emilio Delgado-Baeza.

Visualization: María Jesús Delgado-Martos, Perla Yareli Gutiérrez-Arzapalo, Rainer H. Böger, Nicole Lüneburg, David Muñoz.

Writing – original draft: Begoña Quintana-Villamandos, María del Carmen González, Emilio Delgado-Baeza.

Writing – review & editing: Begoña Quintana-Villamandos, María del Carmen González, María Jesús Delgado-Martos, Perla Yareli Gutiérrez-Arzapalo, Rainer H. Böger, Nicole Lüneburg, David Muñoz, Emilio Delgado-Baeza.

References

1. Shenasa M, Shenasa H. Hypertension, left ventricular hypertrophy, and sudden cardiac death. *Int J Cardiol* 2017; 237:60–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.03.002> PMID: 28285801
2. Tomek J, Bub G. Hypertension-induced remodelling: on the interactions of cardiac risk factors. *J Physiol* 2017; 595:4027–4036. <https://doi.org/10.1113/JP273043> PMID: 28217927
3. Brown IAM, Diederich L, Good ME, DeLalio LJ, Murphy SA, Cortese-Krott MM, et al. Vascular smooth muscle remodeling in conductive and resistance arteries in hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38:1969–1985. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311229> PMID: 30354262
4. Oktay AA, Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO, Gilliland YE, Shah S, et al. Current perspectives on left ventricular geometry in systemic hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 2016; 59:235–246. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2016.09.001> PMID: 27614172
5. Rehman A, Schiffrin EL. Vascular effects of antihypertensive drug therapy. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12:226–232. <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0117-3> PMID: 20514556
6. Schiffrin EL. Vascular remodeling and endothelial function in hypertensive patients: effects of antihypertensive therapy. *Scand Cardiovasc J Suppl* 1998; 32:15–21.

7. Agabiti-Rosei E, Rizzoni D. Regression of small resistance artery structural alterations in hypertension by appropriate antihypertensive treatment. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12:80–85. <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0093-7> PMID: 20424941
8. Singh BN, Conolly SJ, Crijns HJ, Roy D, Kowey PR, Capucci A, et al. Dronedarone for maintenance of sinus rhythm in atrial fibrillation or flutter. *N Engl J Med* 2007; 357:987–999. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054686> PMID: 17804843
9. Hohnloser SH, Crijns HJ, Van Eickels M, Gaudin C, Page RL, Torp-Pedersen C, et al. Effect of dronedarone on cardiovascular events in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009; 360:668–678. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0803778> PMID: 19213680
10. Connolly SJ, Crijns HJ, Torp-Pedersen C, van Eickels M, Gaudin C, Page RL, et al. Analysis of stroke in ATHENA: a placebo-controlled, double-blind, parallel-arm trial to assess the efficacy of dronedarone 400 mg BID for the prevention of cardiovascular hospitalization or death from any cause in patients with atrial fibrillation/atrial flutter. *Circulation* 2009; 120:1174–1180. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.875252> PMID: 19752319
11. Heijman J, Heusch G, Dobrev D. Pleiotropic effects of antiarrhythmic agents: dronedarone in the treatment of atrial fibrillation. *Clin Med Insights Cardiol* 2013; 7:127–140. <https://doi.org/10.4137/CMC.S8445> PMID: 23997577
12. Sobrado LF, Varone BB, Machado AD, Nearing BD, Zeng D, Belardinelli L, et al. Dronedarone's inhibition of If current is the primary mechanism responsible for its bradycardic effect. *Electrophysiol* 2013; 24:914–918.
13. Hodeige D, Heyndrickx JP, Chatelain P, Manning A. SR 33589, a new amiodarone-like antiarrhythmic agent: anti-adrenoreceptor activity in anaesthetized and conscious dogs. *Eur J Pharmacol* 1995; 279:25–32. PMID: 7556379
14. Quintana-Villamandos B, Gomez de Diego JJ, Delgado-Martos MJ, Muñoz-Valverde D, Soto-Montenegro ML, Desco M et al. Dronedarone produces early regression of myocardial remodeling in structural heart disease. *PLoS One* 2017; 12:e0188442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188442> PMID: 29161309
15. Schwedhelm E, Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7:275–285. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.31> PMID: 21445101
16. Gore MO, Lüneburg N, Schwedhelm E, Ayers CR, Anderssohn M, Khara A, et al. Symmetrical Dimethylarginine Predicts Mortality in the General Population Observations From the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:2682–2688. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301219> PMID: 24008162
17. Kiechl S, Lee T, Santer P, Thompson G, Tsimikas S, Egger G, et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. *Atherosclerosis* 2009; 205:261–265. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.040> PMID: 19100547
18. Mels CMC, Schutte AE, Huisman HW, Smith W, Kruger R, van Rooyen JM, et al. Asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine prospectively relates to carotid wall thickening in black men: the SABPA study. *Amino Acids* 2017; 49:1843–1853. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2483-5> PMID: 28831582
19. Quintana-Villamandos B, González MC, Delgado-Martos MJ, Condezo-Hoyos L, Böger RH, Lüneburg N, et al. Short-term esmolol attenuates remodeling of the thoracic aorta in hypertensive rats by decreasing concentrations of ADMA down-regulated by oxidative stress. *Eur J Pharmacol* 2016; 791:502–509. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.09.020> PMID: 27639298
20. Yokoyama H, Averill DB, Brosnihan KB, Smith RD, Schiffrin EL, Ferrario CM. Role of blood pressure reduction in prevention of cardiac and vascular hypertrophy. *Am J Hypertens* 2005; 18:922–929. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2005.01.009> PMID: 16053988
21. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1998; 96:379–394.
22. Angus JA, Wright CE. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; 44:395–407. PMID: 11325582
23. Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, Schulze F, Riederer U, Böger RH. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 851:211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.052> PMID: 17194630
24. Schwedhelm E, Tan-Andresen J, Maas R, Riederer U, Schulze F, Böger RH. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of asymmetric dimethylarginine in human plasma. *Clin Chem* 2005; 51:1268–1272+51. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.046037> PMID: 15976109

25. Christiansen CB, Torp-Pedersen C, Køber L. Efficacy and safety of dronedarone: a review of randomized trials. *Expert Opin Drug Saf* 2010; 9:189–199. <https://doi.org/10.1517/14740330903514105> PMID: [20001756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20001756/)
26. Tandros R, Nattel R, Andrade JG. Dronedarone: Basic Pharmacology and Clinical Use. *Card Electrophysiol Clin* 2016; 8:453–465. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2016.02.008> PMID: [27261834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27261834/)
27. Lee EJ, Kim J. Evaluation of dronedarone as a therapeutic option for patients with atrial fibrillation. *J Clin Pharm Ther* 2014; 39:112–117. PMID: [24738113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24738113/)
28. Schepers E, Glorieux G, Dhondt A, Leybaert L, Vanholder R. Role of symmetric dimethylarginine in vascular damage by increasing ROS via store-operated calcium influx in monocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:1429–1435. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn670> PMID: [19059932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19059932/)
29. Martinez-Quinones P, McCarthy CG, Watts SW, Klee NS, Komic A, Calmasini FB, et al. Hypertension induced morphological and physiological changes in cells of the arterial wall. *Am J Hypertens* 2018; 31:1067–1078. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpy083> PMID: [29788246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29788246/)
30. deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 29:340–349. PMID: [9039125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9039125/)
31. Giummelly P, Lartaud-Idjouadiene I, Marque V, Niederhoffer N, Chillon JM, Capdeville-Atkinson C, et al. Effects of aging and antihypertensive treatment on aortic internal diameter in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34:207–211. PMID: [10454442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10454442/)
32. Su JZ, Chen SC, Wu KG, Chen DG, Rui HB, Wang XY, et al. Wang H.J. Effects of perindopril, propranolol, and dihydrochlorothiazide on cardiovascular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1999; 20:923–928. PMID: [11270993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11270993/)
33. Vaja V, Ochodnický P, Kreněk P, Klimas J, Bajuszová Z, Kyselovic J. Rapid large artery remodeling following the administration and withdrawal of calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol* 2009; 619:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.003> PMID: [19683522](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19683522/)
34. Marchand EL, Der Sarkissian S, Hamet P, deBlois D. Caspase-Dependent cell death mediates the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 2003; 92:777–784. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000065619.36118.20> PMID: [12623880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12623880/)
35. Wang Y, Cao W, Cui J, Yu Y, Zhao Y, Shi J, et al. Arterial Wall Stress Induces Phenotypic Switching of Arterial Smooth Muscle Cells in Vascular Remodeling by Activating the YAP/TAZ Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2018; 51:842–853. <https://doi.org/10.1159/000495376> PMID: [30466081](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30466081/)
36. Fernandes-Santos C, de Souza Mendonça L, Mandarim-de-Lacerda CA. Favorable cardiac and aortic remodeling in olmesartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Heart Vessels* 2009; 24:219–227. <https://doi.org/10.1007/s00380-008-1104-3> PMID: [19466524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19466524/)
37. Andrade GP, Cintra MM, Alves PM, Barbosa Neto O, Rossi e Silva RC, Dias da Silva VJ, et al. Remodeling of elastic layer of aortic artery after training by swimming in spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013; 238:7–11.
38. Lüneburg N, Lieb W, Zeller T, Chen MH, Maas R, Carter AM, et al. Genome-wide association study of L-arginine and dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for symmetric dimethylarginine. *Circ Cardiovasc Genet* 2014; 7:864–872. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000264> PMID: [25245031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25245031/)
39. Böger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003; 4:23–28. PMID: [14664899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14664899/)
40. Böger RH, Endres HG, Schwedhelm E, Darius H, Atzler D, Lüneburg N, et al. Asymmetric dimethylarginine as an independent risk marker for mortality in ambulatory patients with peripheral arterial disease. *J Intern Med* 2011; 269:349–361. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02322.x> PMID: [21175900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21175900/)
41. Siegerink B, Maas R, Vossen CY, Schwedhelm E, Koenig W, Böger R, et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginine and risk of secondary cardiovascular disease events and mortality in patients with stable coronary heart disease: the KAROLA follow-up study. *Clin Res Cardiol* 2013; 102:193–202. <https://doi.org/10.1007/s00392-012-0515-4> PMID: [23073705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23073705/)
42. Lüneburg N, von Holten RA, Töpper RF, Schwedhelm E, Maas R, Böger RH. Symmetric dimethylarginine is a marker of detrimental outcome in the acute phase after ischaemic stroke: role of renal function. *Clin Sci (Lond)* 2012; 122:105–111.
43. Schulze F, Carter AM, Schwedhelm E, Ajjan R, Maas R, von Holten RA, et al. Symmetric dimethylarginine predicts all-cause mortality following ischemic stroke. *Atherosclerosis* 2010; 208:518–523. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.039> PMID: [19700158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19700158/)
44. Bahls M, Friedrich N, Atzler D, Felix SB, Nauck MA, Böger RH, et al. L-Arginine and SDMA Serum Concentrations Are Associated with Subclinical Atherosclerosis in the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Plos One* 2015; 10:e0131293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131293> PMID: [26098562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26098562/)

45. Riccioni G, Scotti L, D'Orazio N, Gallina S, Speziale G, Speranza L, et al. ADMA/SDMA in elderly subjects with asymptomatic carotid atherosclerosis: values and site-specific association. *Int J Mol Sc.* 2014; 15:6391–6398.
46. Nishimura N, Schaffer CB, Friedman B, Lyden PD, Kleinfeld D. Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:365–370. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609551104> PMID: [17190804](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17190804/)

