

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Regresión del remodelado arterial coronario con un
bloqueante multicanal en un modelo experimental de rata
hipertensa**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laia Pazó Sayós

Directores

María Begoña Quintana Villamandos
María del Carmen González García

Madrid 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**Programa de Doctorado en Investigación en
Ciencias Médico-Quirúrgicas**

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Regresión del remodelado arterial
coronario con un bloqueante multicanal en
un modelo experimental de rata hipertensa**

PRESENTADA POR

Laia Pazó Sayós

DIRECTORES

María Begoña Quintana Villamandos

María del Carmen González García

Madrid, 2017

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

María Begoña Quintana Villamandos, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Anestesiología y Reanimación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

María del Carmen González García, Doctor en Biología, Catedrática de Fisiología en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN QUE:

El trabajo titulado: “**Regresión del remodelado arterial coronario con un bloqueante multicanal en un modelo experimental de rata hipertensa**”, presentado por Doña Laia Pazó Sayós, licenciada en Medicina por la Universidad de Barcelona, ha sido realizado bajo nuestra dirección y consideramos que reúne las condiciones para ser leído y defendido como TESIS DOCTORAL en la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a efectos académicos, expedimos el presente informe en Madrid, a treinta de marzo del año 2017.

M^a Begoña Quintana Villamandos

M^a Carmen González García

Este trabajo ha sido realizado gracias al Proyecto de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III (**FIS PI13/01261**) y los Fondos Feder.

Declaración de conflictos de intereses

Ninguno de los participantes tiene conflictos de intereses relacionados con este trabajo de investigación.

A mi familia y a mis incondicionales

AGRADECIMIENTOS

La consecución de esta Tesis ha sido posible gracias a numerosas personas que me han ayudado, escuchado y apoyado durante todo el proceso:

- A mis directoras de Tesis, Begoña Quintana Villamandos y M^a Carmen González García, que me han enseñado cómo llevar a cabo un Proyecto de Investigación y han sabido reconducirme cuando me extraviaba. Gracias por esto y todas las tardes de risas en el laboratorio.
- A mis padres, por escucharme siempre pese a no entender del todo de qué les hablaba y por animarme a cumplir todos mis objetivos. Y a mis hermanos, por estar siempre ahí.
- A mis incondicionales, Irene, Lidia y Dayana, por aguantarme en los momentos de mayor nerviosismo y escuchar pacientemente mis historias de ratas.
- Gracias también a todo aquel que ha colaborado con el proyecto: Silvia Arribas, Luis Condezo, Emilio Delgado, M^a Jesús Delgado, etc. Especial mención a mis compis de laboratorio: Ana, Pilar, David, Perla y, más recientemente, Raquel.
- Y por último, gracias a todos los que me han animado, tanto dentro del hospital como fuera.

A todos vosotros simplemente....

GRACIAS.

1 Índice

1	Índice	7
2	Índice de Abreviaturas.....	10
3	Resumen.....	15
4	Summary	19
5	Introducción	23
5.1	CARDIOPATÍA HIPERTENSIVA.....	24
5.1.1	DEFINICIÓN DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL.....	24
5.1.2	CARDIOPATÍA HIPERTENSIVA: REPERCUSIÓN CLÍNICA.....	24
5.1.3	CARDIOPATÍA HIPERTENSIVA: VALOR PRONÓSTICO	26
5.2	REMODELADO VASCULAR.....	28
5.2.1	DEFINICIÓN	28
5.2.2	TIPOS DE REMODELADO VASCULAR	30
5.2.3	FISIOPATOLOGÍA DEL REMODELADO VASCULAR	31
5.2.4	EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL REMODELADO VASCULAR.....	44
5.3	DRONEDARONA	45
5.3.1	FARMACOCINÉTICA	47
5.3.2	FARMACODINÁMICA.....	47
5.3.3	INTERACCIONES Y EFECTOS SECUNDARIOS.....	52
5.3.4	EVIDENCIA CLÍNICA DEL USO DE LA DRONEDARONA.....	54
5.4	TRATAMIENTO DEL REMODELADO VASCULAR.....	57
5.4.1	REGRESIÓN DEL REMODELADO VASCULAR.....	57
5.4.2	FÁRMACOS QUE ACTÚAN SOBRE EL REMODELADO VASCULAR.....	58
5.5	LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA COMO MODELO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL	65
5.6	JUSTIFICACIÓN	68
6	Hipótesis y Objetivos.....	70
6.1	HIPÓTESIS.....	71
6.2	OBJETIVOS	71
6.2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	71
6.2.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS	72
6.3	PLANTEAMIENTO.....	72
7	Material y Métodos	74
7.1	MATERIAL.....	75
7.1.1	ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.....	75
7.1.2	FÁRMACO	76

7.1.3	MATERIAL UTILIZADO EN EL ESTUDIO FISIOLÓGICO.....	77
7.1.4	MATERIAL UTILIZADO EN EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA ARTERIAL.....	78
7.1.5	MATERIAL UTILIZADO EN EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN ARTERIAL..	80
7.1.6	MATERIAL UTILIZADO EN EL ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO	81
7.2	MÉTODOS.....	83
7.2.1	TRATAMIENTO.....	83
7.2.2	MÉTODO DEL ESTUDIO FISIOLÓGICO	84
7.2.3	MÉTODO DEL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA ARTERIAL.....	84
7.2.4	MÉTODO DEL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN ARTERIAL.....	90
7.2.5	MÉTODO DEL ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO	92
7.2.6	MÉTODO ESTADÍSTICO.....	100
8	<i>Resultados</i>	103
8.1	EFEECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE LA RATA.....	104
8.2	EFEECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA ARTERIA CORONARIA.....	105
8.2.1	ALTERACIONES EN LA ESTRUCTURA DE LA ARTERIA INTRAMIOCÁRDICA	105
8.2.2	CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LA ARTERIA CORONARIA DESCENDENTE ANTERIOR	110
8.3	EFEECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR DE LA ARTERIA CORONARIA.....	119
8.3.1	RESPUESTA VASODILATADORA DE LA ARTERIA CORONARIA	119
8.3.2	RESPUESTA VASOCONSTRICTORA DE LA ARTERIA CORONARIA	123
8.4	EFEECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LOS BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	125
9	<i>Discusión</i>	129
9.1	DRONEDARONA INDUCE CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA ARTERIA CORONARIA	132
9.2	DRONEDARONA INDUCE CAMBIOS EN LA REACTIVIDAD VASCULAR DE LA ARTERIA CORONARIA	134
9.3	DRONEDARONA INDUCE CAMBIOS EN EL ESTRÉS OXIDATIVO	136
9.4	DÓNDE ESTAMOS Y FUTUROS PROYECTOS	138
9.5	LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO	139
10	<i>Conclusiones</i>	141
11	<i>Bibliografía</i>	143
12	<i>Índice de figuras y tablas</i>	176

2 Índice de Abreviaturas

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
ADMA	Dimetilarginina Asimétrica
ADR-β1/2	Adrenorreceptor β 1/2/3
AP-1	Proteína Activadora-1
AR	Amplex Red
ARA II	Antagonistas de los Receptores de la Angiotensina II
AT1R	Receptores de Angiotensina-II-subtipo 1
AT2R	Receptores de angiotensina-II-subtipo 2
AUC	Curva Dosis Respuesta
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CAM	Moléculas de Adhesión Celular
CEEA	Comité de Ética de Experimentación Animal
CML	Células Musculares Lisas
CSA	<i>“Cross-Sectiona Area”</i>
DA	(arteria coronaria) descendente anterior
DE	Diámetro Externo
DDAH	Dimetilarginina Dimetilaminohidrolasa
DI	Diámetro Interno
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DOCA (ratas)	Ratas tratadas con acetato de desoxicorticosterona

DNTB	2-nitro ácido benzoico
DV	Densidad de Volumen de colágeno
EAP	Edema Agudo de Pulmón
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
FA	Fibrilación Auricular
FFHR	<i>“Fructose-fed Hypertensive Rat”</i>
GMP-C	Guanosín Monofosfato Cíclico
GP	Grosor de Pared
GP/DI	Cociente Grosor de Pared / Diámetro Interno
GSH	Glutación reducido
HTA	Hipertensión Arterial
HO•	Radical Hidroxilo
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
HVI	Hipertrofia Ventricular Izquierda
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
IL-6	Interleucina-6
IC	Insuficiencia Cardiaca
IECA	Inhibidor del Enzima Convertidor de la Angiotensina
ICFSP	Insuficiencia Cardiaca con Función Sistólica Preservada
KHS	<i>“Krebs-Henseleit Solution”</i>
K+-KHS	<i>“Krebs-Henseleit Solution”</i> rica en potasio
MCP- 1	Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1
MMP	Metaloproteasas de la Matriz Extracelular
MR	Mineralocorticoides
MT-MMP	Metaloproteasas de Membrana

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NaOH	Hidróxido de Sodio
NEM	N-etilmaleimida
NF-κB	Factores de Transcripción Nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
NPS	Nitroprusiato
O₂	Oxígeno
O₂^{• -}	Anión Superóxido
PA	Presión Arterial
PAI- I	Inhibidor del Plasminógeno- 1
PAS	Presión Arterial Sistólica
PCR	Proteína C Reactiva
REDOX	Reacciones de Óxido-Reducción
REVERT	<i>“Reversal Ventricular Remodeling with Toprol-X trial”</i>
RNA	Ácido Desoxirribonucleico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SHR	<i>“Spontaneously Hypertensive Rat”</i>
SHR-D	<i>“Spontaneously Hypertensive Rat”</i> tratada con Dronedaron
SOD	Superóxido Dismutasa
SPSHR	<i>“Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats”</i>
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TAC	Capacidad Antioxidante Total
TCA	Ácido Tricloroacético
TGF-β	Factor de Crecimiento Tisular β

VI	Ventrículo Izquierdo
WKY	ratas Wistar-Kyoto
5-HT	5-Hidroxitriptamina o serotonina

3 *Resumen*

Introducción y Objetivos

La hipertensión arterial es un problema en la clínica, que produce un remodelado tanto del ventrículo izquierdo como de la vascularización coronaria. El mal control de los niveles de presión arterial se asocia a un aumento en la incidencia de insuficiencia cardiaca, isquemia miocárdica, arritmias y eventos isquémicos. La actuación sobre el remodelado cardiovascular con algunos fármacos antihipertensivos (ARA-II, IECA, calcioantagonistas y β -bloqueantes) durante un periodo de tratamiento de meses-años, disminuye la morbimortalidad en el paciente con hipertensión arterial. En un estudio experimental previo, realizado en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), nuestro grupo demostró que el esmolol, betabloqueante cardiosselectivo, produce regresión de la hipertrofia ventricular izquierda ¹, así como del remodelado arterial coronario ² tras 48h de tratamiento.

La hipertensión arterial es una de las causas más importantes asociadas a la aparición de la fibrilación auricular, una de las arritmias más frecuentes en la población actual. La dronedarona es un bloqueante multicanal empleado en el tratamiento de la fibrilación auricular. Sin embargo, aún no se ha estudiado su efecto sobre el remodelado arterial.

El presente estudio tiene como objetivo analizar el efecto de la dronedarona sobre el remodelado vascular coronario.

Material y Métodos

Para estudiar el efecto de la dronedarona sobre el remodelado vascular coronario, se diseñó un estudio en el que se usó como modelo experimental la rata espontáneamente hipertensa (SHR) y, como control normotenso, la rata Wistar-Kyoto (WKY), de 10 meses de edad. Las ratas SHR se dividieron de forma aleatoria en dos grupos: un grupo tratado con el fármaco (SHR-D n=24) y un grupo tratado con placebo (SHR n=24). Asimismo, se estableció un grupo control normotenso (WKY n=24). La dronedarona (100 mg/kg/día) se administró durante 2 semanas. Finalizado el tratamiento se estudiaron los siguientes parámetros: 1) Estructura de las arterias intramiocárdicas y de la arteria coronaria descendente anterior, 2) Reactividad vascular de la arteria descendente anterior y 3) Cambios en el estrés oxidativo.

Resultados

Las ratas SHR controles presentaron cambios estructurales arteriales asociados a la hipertensión arterial crónica: aumento del grosor de pared (del grosor y contaje celular de la capa media), de los diámetros interno y externo, del área y de la densidad de colágeno vascular, respecto al control normotenso. Las ratas SHR controles mostraron una mayor respuesta contráctil y una menor capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio, respecto al control normotenso. Por último, se comprobó la existencia de un mayor estrés oxidativo en el grupo hipertenso.

El grupo SHR-D mostró cambios significativos con respecto al grupo SHR control. Se produjo una disminución del grosor de pared y del área de las arterias coronarias a expensas de una disminución tanto del grosor como del contaje celular de las capas media y adventicia, así como una disminución del colágeno vascular. El tratamiento con dronedarona restauró la reactividad vascular, disminuyendo la respuesta vasoconstrictora y mejorando la capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio. Por último, se observaron cambios en el equilibrio oxidante-antioxidante que sugieren una mejora del estrés oxidativo tras la administración de la dronedarona.

Conclusiones

Nuestro estudio demuestra que la dronedarona produce una regresión del remodelado vascular coronario en un modelo experimental de hipertensión arterial.

4 Summary

Introduction and Objectives

Arterial hypertension is a relevant clinical issue as it produces left ventricle and coronary arteries remodeling. Unsatisfactory control of arterial pressure is associated to an increase in the incidence of cardiac failure, myocardial ischemia, arrhythmias and other ischemic events. After a long period (months to years) of treatment with some antihypertensive drugs (such as ARA-II, IECA, calcium antagonists and beta-blockers), it is seen an improvement in morbidity and mortality. In a previous experimental study with spontaneously hypertensive rats (SHR), our group proved that esmolol, a cardioselective betabloker, produces an early regression of left ventricular hipertrophy ¹, as well as coronary artery remodeling ² (after just 48h of treatment).

Arterial hypertension is one of the most important causes of auricular fibrillation (AF) occurrence. Dronedarone is a multichannel blocker used for the treatment of AF. However, its effect on arterial remodeling has not yet been demonstrated.

The present study aims to analyze the effect of dronedarone on coronary vascular remodeling.

Materials and Methods

To study dronedarone's effect on arterial remodeling, we chosed spontaneously hypertensive rats (SHR) as the experimental model and Wistar-Kyoto rats (WKY) as normotensive controls. In both cases we used 10-month-old male rats. SHR rats were randomly assigned to 2 groups: one group received dronedarone (SHR-D n=24) and the other one, normal saline

(SHR n=24). The normotensive control group (WKY n=24) was also treated with normal saline. Dronedarone (100 mg/kg/day) was administered for 2 weeks. Once the treatment was finished, we studied the following variables: 1) Intramyocardial arteries and left anterior descending coronary artery structure, 2) Left anterior descending coronary artery vascular reactivity and 3) Oxidative stress changes.

Results

Hypertensive controls (SHR) showed the characteristic structural changes related to chronic arterial hypertension: increase in wall width and cellularity of the media layer, as well as internal and external diameters, cross-sectional area and collagen density, compared to normotensive controls. We found higher contractile responses in SHR group, as well as, a lower endothelium-dependent vasodilatory capacity, compared to normotensive controls. Furthermore, we stated the existence of a higher oxidative stress in SHR group, compared to WKY.

SHR-D showed significant changes compared to SHR. There was a decrease in wall thickness and area of the coronary arteries at the expense of a decrease in both the thickness and the cell count of middle and adventitial layers, as well as a decrease in vascular collagen. Treatment with dronedarone restored vascular reactivity, decreased vasoconstricting responses and improved endothelium-dependent vasodilatory capacity. Finally, there were changes in the oxidative-antioxidant balance that suggest an improvement of the oxidative stress after the administration of dronedarone.

Conclusions

Our study shows that dronedarone produces a regression of coronary vascular remodeling in an experimental model of arterial hypertension.

5 Introducción

5. INTRODUCCIÓN

5.1 CARDIOPATÍA HIPERTENSIVA

5.1.1 DEFINICIÓN DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La hipertensión arterial (HTA) se define como el hallazgo en repetidas ocasiones, separadas en el tiempo, de unas cifras de presión arterial iguales o por encima de 140/90 mmHg (cifras establecidas por consensos internacionales como patológicas) ³. Este incremento persistente de la presión arterial no es un simple hallazgo, sino que se trata de una enfermedad crónica con múltiples efectos a nivel sistémico.

Tras la realización de numerosos estudios, se calcula que la prevalencia de dicha patología alcanza un 20% de la población a nivel mundial; siendo en España de hasta un 30%. Dicho porcentaje experimenta un incremento exponencial en relación con la edad, llegando a alcanzar valores superiores al 75% en la población de 70-74 años de edad ⁴. Esto la convierte en una de las patologías con mayor prevalencia en la sociedad actual.

5.1.2 CARDIOPATÍA HIPERTENSIVA: REPERCUSIÓN CLÍNICA

Tal como nos demuestra su fórmula matemática, la presión arterial es el resultado del producto del gasto cardiaco por las resistencias periféricas. Es

decir, una elevación en una de estas dos variables producirá hipertensión arterial, si no es compensado por un descenso de la otra.

Inicialmente, encontramos una elevación de la presión arterial, mantenida fundamentalmente por un aumento de la actividad simpática, y, por consiguiente, un aumento del gasto cardiaco ^{5,6}.

A medida que la enfermedad progresa, el gasto cardiaco se normaliza ⁵, por lo que, para conseguir mantener niveles similares de presión arterial, se produce una vasoconstricción que conlleva un aumento de la resistencias periféricas totales ⁷. Esto implica un aumento de la postcarga cardiaca que, con el tiempo, produce una hipertrofia muscular del ventrículo izquierdo (VI). Dicho incremento de grosor ventricular altera la capacidad de relajación del ventrículo y, por consiguiente, disminuye la capacidad de llenado ventricular. Se produce en este momento lo que se conoce como insuficiencia cardiaca diastólica, disfunción diastólica o insuficiencia cardiaca con función sistólica preservada (ICFSP).

Si no se controla la enfermedad, el resultado final será una miocardiopatía hipertensiva dilatada, resultado de una elevación persistente de las presiones intracavitarias. Según la ley de Frank-Starling, dicha dilatación del VI conlleva una disfunción sistólica. La incapacidad para generar un volumen sistólico adecuado conducirá a una congestión venosa retrógrada y edema agudo de pulmón (EAP).

5.1.3 CARDIOPATÍA HIPERTENSIVA: VALOR PRONÓSTICO

El incremento continuo y persistente de la presión arterial (PA) tiene numerosos efectos a nivel sistémico. El corazón, el sistema vascular, el sistema nervioso central y el riñón son órganos diana de esta enfermedad, cuya afectación implica un aumento significativo de la morbimortalidad ⁸.

La afectación cardíaca producida por dicha enfermedad se conoce como cardiopatía hipertensiva. Esta denominación incluye todas aquellas alteraciones secundarias a HTA: disfunción diastólica, hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI), disfunción sistólica, alteraciones en el sistema de conducción cardíaco y enfermedad arterial coronaria.

Debido a su importante repercusión, es esencial disponer de herramientas que permitan una detección de la cardiopatía hipertensiva en fases precoces y una identificación de aquellos pacientes de alto riesgo susceptibles de ser tratados. Numerosos estudios demuestran que un tratamiento precoz y adecuado de dicha patología mejora el pronóstico de estos pacientes ⁹.

La HVI es el sustrato anatómico y fisiopatológico en la génesis de la cardiopatía hipertensiva. Aquello que inicialmente se produjo como mecanismo fisiológico de adaptación a un aumento de postcarga ventricular izquierda, ha demostrado ser un factor de riesgo independiente de eventos cardiovasculares y mortalidad ^{10,11}. De hecho, el riesgo de mortalidad en aquellos pacientes hipertensos con signos electrocardiográficos de sobrecarga ventricular izquierda se eleva entre 1,5 y 6,8 veces en comparación con los pacientes hipertensos que no presentan estos cambios ¹².

Pese a la presencia de signos electrocardiográficos de HVI, ésta se diagnostica fundamentalmente en base a imágenes ecocardiográficas. Un estudio ecocardiográfico demuestra un aumento de un 40% de los eventos cardiovasculares por cada 39 g/m² de aumento de la HVI ¹³. Dichos estudios nos indican también una mayor prevalencia de HVI con la edad: 10-20% en la población menor de 55 años frente a un 20-60% en mayores de 60 años ¹⁴. Encontraremos además un aumento de prevalencia de HVI en pacientes con HTA grave y mal controlada: 12-30% en pacientes con HTA leve-moderada frente a un 90% en casos de HTA muy grave ¹⁵.

Dada la importante morbimortalidad de esta enfermedad, se han llevado a cabo numerosos estudios, experimentales y clínicos, enfocados a identificar mecanismos y opciones terapéuticas capaces de inducir regresión de la HVI. En esta dirección, se ha analizado el efecto de diversos fármacos antihipertensivos [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] sobre la normalización de la masa o el peso ventricular. Los resultados han demostrado que todos ellos, en mayor o menor medida, son capaces de revertir la HVI a través de un proceso conocido como “regresión del remodelado ventricular”. En el caso de los fármacos β -bloqueantes, se dispone por ejemplo del estudio aleatorizado REVERT (acrónimo en inglés de *Reversal of Ventricular Remodeling with Toprol-X trial*) ¹⁶ que evalúa el efecto del tratamiento con metoprolol, a largo plazo, en pacientes asintomáticos con disfunción sistólica del VI. Tal como muestran los resultados de este estudio, el tratamiento con metoprolol produce una reducción de los volúmenes

telesistólico y telediastólico y un aumento en la fracción de eyección del VI, ambos significativos, en el grupo de pacientes tratados con el fármaco en relación al grupo de pacientes sin tratar. Metoprolol ejerce por tanto un efecto cardioprotector frente a la progresión del remodelado ventricular en pacientes asintomáticos con disfunción sistólica y protege frente a la progresión a insuficiencia cardiaca (IC) sintomática. En esta misma dirección, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que otro β -bloqueante, el esmolol, es capaz de revertir la HVI en un modelo experimental de rata espontáneamente hipertensa (SHR, acrónimo del inglés “*spontaneously hypertensive rats*”) así como el remodelado vascular coronario y aórtico ^{1,2,17,18}. La regresión del remodelado cardiovascular se produjo tras la administración de esmolol durante 48h.

5.2 REMODELADO VASCULAR

5.2.1 DEFINICIÓN

La pared vascular está formada por tres capas principales:

- Capa íntima: constituida por células endoteliales.
- Capa media: donde hayamos las células de músculo liso.
- Capa adventicia: formada por fibroblastos.

Las células de estas tres capas interaccionan entre ellas para formar un complejo autocrino-paracrino. La pared del vaso es capaz de detectar señales

intercelulares que se producen debido a cambios en el entorno y, mediante la producción de mediadores locales (factores de crecimiento local, sustancias vasoactivas), ejercer su influencia sobre la estructura y la función del vaso.

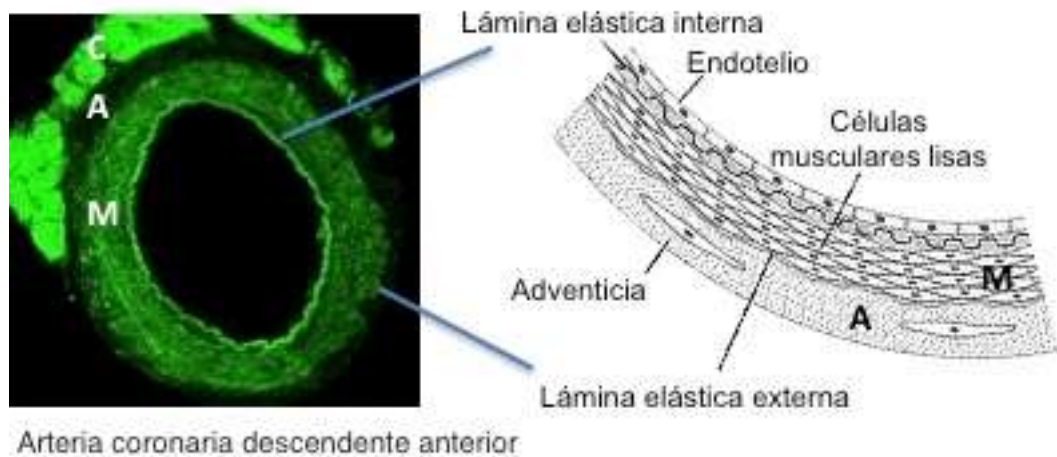


Figura 1. Estructura de la pared arterial. A, capa adventicia; C, cardiomiocitos; M, capa media

En 1989, Baumach y cols ¹⁹ acuñaron el término *remodelado vascular*, en sus estudios con arteriolas piales de ratas espontáneamente hipertensas propensas al accidente cerebrovascular (SPSHRs, acrónimo del inglés *stroke-prone spontaneously hypertensive rats*) para describir la desorganización de los componentes de la pared vascular alrededor de un lumen disminuido. Hacia el año 1994, Gibbons ²⁰ propuso el remodelado vascular como un proceso activo, generalmente adaptativo, caracterizado por cambios estructurales que involucran el crecimiento, muerte, proliferación y migración celular, así como la producción y degradación de sustancias de la matriz extracelular arterial. Todos estos procesos son regulados de forma dinámica por la interacción de factores

de crecimiento, sustancias vasoactivas y estímulos hemodinámicos.

En 1993, Heagerty y cols.²¹ introdujeron el término *índice de remodelado*, que se define como la proporción de cambio del lumen (en porcentaje) que contribuye al remodelado del vaso. Esto nos permite cuantificar el grado de remodelado vascular. De acuerdo a esta definición, un índice elevado sólo se puede evidenciar en arterias de pequeño calibre que, precisamente, son las principales responsables de los efectos del remodelado en el individuo²².

5.2.2 TIPOS DE REMODELADO VASCULAR

Clásicamente, se ha hablado de *remodelado hipertrófico* como aquel que se produce en las arterias de pequeño calibre de pacientes hipertensos y que está asociado a un incremento del grosor de la pared del vaso. Posteriormente, se evidenció la existencia de un *remodelado eutrófico*, es decir, aquel remodelado vascular que no implica cambios en la cantidad o las características de sus componentes.

Actualmente, se reconocen dos tipos de remodelado vascular en las arterias de pequeño calibre^{21, 23, 24, 25}:

- a) **Eutrófico concéntrico**: se objetiva una disminución del lumen interno y externo y un incremento del cociente grosor de pared/diámetro interno, sin variación en la cantidad de material de pared ni en el área de la sección transversal del vaso (*cross-sectional área* o CSA). Es el tipo de

remodelado vascular que predomina en la hipertensión esencial en humanos y que también encontramos en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Se cree que este remodelado se produce como resultado de la combinación de apoptosis celular en la periferia del vaso y vasoconstricción crónica ²⁶.

- b) **Hipertrófico concéntrico**: consistente en el engrosamiento de la pared del vaso hacia el lumen con la consiguiente reducción de su diámetro interno. Este remodelado implica un aumento del área de la sección transversal del vaso y del cociente grosor de pared/diámetro interno del vaso. Se observa frecuentemente en humanos con hipertensión secundaria. Consideramos hipertensión secundaria, por ejemplo, a la hipertensión debida a aldosteronismo primario, existencia de un feocromocitoma ²⁷, aparición de hipertensión renovascular o la hipertensión asociada a diabetes mellitus (DM) ^{28, 29}.

5.2.3 FISIOPATOLOGÍA DEL REMODELADO VASCULAR

Tal y como se ha descrito anteriormente, en la hipertensión los cambios hemodinámicos y su mantenimiento de forma crónica alteran la estructura de la pared vascular. Sin embargo, existen también otros procesos implicados en el remodelado vascular, tales como la apoptosis celular, la inflamación, la fibrosis o el crecimiento celular ²³. Asimismo, los cambios en los componentes de la matriz extravascular son mediadores importantes en el proceso de adaptación

tisular ³⁰. A continuación, se describen algunos de estos procesos que contribuyen al remodelado vascular:

a) **Apoptosis celular**: el papel de los fenómenos apoptóticos en el remodelado vascular no está aún completamente dilucidado. En numerosos estudios se ha evidenciado la existencia de eventos apoptóticos en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos del corazón ³¹, cerebro y riñón ³², así como en las arterias de ratas hipertensas ³³. En uno de estos estudios se constató una reducción de la tasa de apoptosis en las células de músculo liso de arterias de pequeño calibre en SHR jóvenes ³⁴. Esto sugiere que el responsable del aumento en el ritmo de crecimiento de la pared vascular y de las resistencias del vaso en las ratas SHR podría ser la disminución de los fenómenos apoptóticos. En un segundo estudio, se analizó la tasa de apoptosis en ratas SHR de 4 semanas y de 8-12 semanas. Esto permitió constatar la existencia de valores más altos de presión arterial en las ratas de mayor edad, así como un mayor cociente grosor de pared/diámetro interno del vaso y una tasa de apoptosis celular superior ³⁵.

En el desarrollo del remodelado eutrófico concéntrico vascular observado en las SHR podrían coexistir mecanismos de crecimiento y apoptosis celular, de forma que se produjera crecimiento celular en la pared interna del vaso junto con un incremento de la apoptosis focalizada, fundamentalmente, en la parte externa del vaso. Actualmente, se conocen únicamente algunos de los mecanismos implicados en la apoptosis, pero se sabe de la existencia de muchos otros que permanecen desconocidos. Asimismo, se desconoce si la apoptosis es resultado de un proceso primario o

se debe a un mecanismo compensatorio del crecimiento celular concéntrico.

A continuación, describiremos algunos de los principales mecanismos con un papel reconocido en los procesos apoptóticos implicados en el remodelado vascular:

6. Activación de metaloproteasas: se conoce como metaloproteasas a las metaloproteínas de la matriz extracelular (MMP), las cuales son endopeptidasas dependientes de zinc. A nivel vascular, las MMP tiene como función mantener la homeostasis de las estructuras extracelulares que rodean la pared del vaso. Dicha función es ejercida a través de la modulación de interacciones intercelulares, señales de transmisión y liberación de mediadores inflamatorios. Existen diferentes tipos de MMP ³⁶ [colagenasas, gelatinasas, estromelinas y metaloproteasas de membrana (MT-MMP)] cuya síntesis es inducida por ciertas citoquinas así como por interacciones intercelulares y de célula-matriz extracelular, en las que juegan un papel importante las integrinas. De igual manera, las transglutaminasas también parecen influir en el remodelado vascular generando interacciones de los componentes fibrilares extracelulares con sitios de unión específicos en células de músculo liso ³⁷.

7. Rarefacción vascular: consiste en una disminución de la densidad de microvasos periféricos que conduce al cierre de las arteriolas (*arteriolas fantasmas*) y capilares y a la posterior desaparición de estas estructuras. La rarefacción se produce a expensas de la activación de fenómenos apoptóticos encaminados a disminuir la reserva vascular, produciendo

menor débito sanguíneo tisular e incrementando el riesgo de complicaciones isquémicas. Además, la rarefacción favorece también el mantenimiento de unas resistencias periféricas elevadas en la hipertensión arterial. Este fenómeno de rarefacción también se ha evidenciado en las ratas SHR. En estas ratas, se produce una disminución de los niveles de expresión del gen BAX/BCI-2 (implicado en la apoptosis celular) en las arterias intramiocárdicas y un incremento del mismo en las arteriolas y los capilares.

b) Disfunción endotelial: se conoce como disfunción endotelial a la pérdida de función endotelial adecuada. Dicha disfunción es un hallazgo común dentro de las enfermedades vasculares. Su instauración es un paso clave en el desarrollo de la arteriosclerosis. El aumento de las especies reactivas de oxígeno y la disminución de la producción de óxido nítrico (NO) son los mecanismos predominantes de la disfunción endotelial. Cada día hay una mayor evidencia que relaciona enfermedades como la hipercolesterolemia, la hipertensión, el tabaquismo, la DM y otros factores de riesgo cardiovascular con una marcada disfunción endotelial ³⁸. Entre los mecanismos más importantes implicados en el desarrollo de la disfunción endotelial se encuentran los siguientes:

- **Inflamación endotelial:** la activación endotelial induce la expresión de citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular con el fin de interactuar con leucocitos y otras células inflamatorias. El objetivo final de esta interacción es favorecer la aparición de inflamación tisular.

Estudiando el modelo experimental de hipertensión arterial, se ha encontrado un incremento de expresión de moléculas de adhesión (integrinas), proteínas inflamatorias [proteína C reactiva (PCR)] y proteínas con poder trombogénico [proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1 o CCL2) e inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1)]³⁹. Los efectos mediados por la activación endotelial anteriormente detallados favorecen, por un lado, la transformación de la estructura del árbol vascular con un incremento de la proliferación celular, mientras que, por otro lado, reducen la capacidad vasodilatadora endotelio-dependiente. Todos estos procesos predisponen en su conjunto al desarrollo de fenómenos tromboisquémicos con daño tisular asociado⁴⁰.

A continuación se describen los mecanismos inflamatorios más relevantes asociados a la disfunción endotelial en el modelo de hipertensión arterial:

- *Expresión de MCP-1*: MCP-1 forma parte activa del proceso de migración e infiltración endotelial monocito-macrofagocitaria, induciendo la activación de los factores de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) y proteína activadora 1 (AP-1). Esto induce la expresión de la interleucina 6 (IL-6) y la consiguiente activación de la proliferación de las células musculares lisas⁴¹.
- *Incremento niveles de PCR*: este aumento de expresión induce la adhesión y migración leucocitaria, estimulando la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión celular (CAM)⁴². Con frecuencia, el aumento de los

niveles de PCR se asocia a un estado de procoagulabilidad y a una disminución de la biodisponibilidad de NO endotelial por inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial.

➤ *Incremento del número de células inflamatorias en la capa adventicia:* este hecho es considerado una de las principales fuentes de producción de radicales libres de oxígeno implicados en la fisiopatología vascular ⁴³.

- *Estrés oxidativo:* el término estrés oxidativo fue definido por primera vez en 1985 por Sies y cols. ⁴⁴. Es un término que hace referencia a un desbalance entre los productos pro- y anti-oxidantes y que conduce al incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disminución de la biodisponibilidad de NO. El estrés oxidativo se asocia por tanto a una alteración de la capacidad de vasodilatación, así como a una alteración de la homeostasis celular y a daño tisular ⁴⁵. Los estudios clínicos que se han realizado en pacientes con hipertensión arterial muestran que las cifras de presión arterial sistólica y diastólica guardan una relación directa con la producción de biomarcadores de estrés oxidativo y una relación indirecta con los niveles de antioxidantes plasmáticos ^{46, 47, 48}.

A continuación, mostramos los principales procesos de estrés oxidativo implicados en el daño endotelial en el modelo experimental de hipertensión arterial:

➤ *Reducción de la biodisponibilidad de NO:* como molécula señalizadora, el NO participa en diversos procesos biológicos,

incluyendo el control de la presión arterial, la inhibición de la proliferación y migración celular y la prevención de la agregación plaquetaria ⁴⁹ (Fig.2). El NO es un potente vasodilatador producido por el endotelio que induce relajación de las células musculares lisas vasculares. Dicha relajación se produce mediante la activación de la enzima guanilato ciclasa, con la consiguiente generación de guanosín monofosfato cíclico (GMP cíclico o GMPc) y disminución del calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ ⁵⁰. Tal como se ha indicado, la síntesis de NO se lleva a cabo en el endotelio a cargo de la enzima NOS endotelial (eNOS), que transforma la arginina en citrulina mediante una reacción redox en la que participan 5 electrones (Fig.3). El estímulo fisiológico que activa esta producción de NO endotelial y que, por tanto, es responsable de la vasodilatación del endotelio sano es el neurotransmisor acetilcolina (ACh). La vida media del óxido nítrico es de pocos segundos. Debido a que se trata de una molécula altamente liposoluble, el NO presenta una elevada tasa de difusión a través de las membranas celulares.

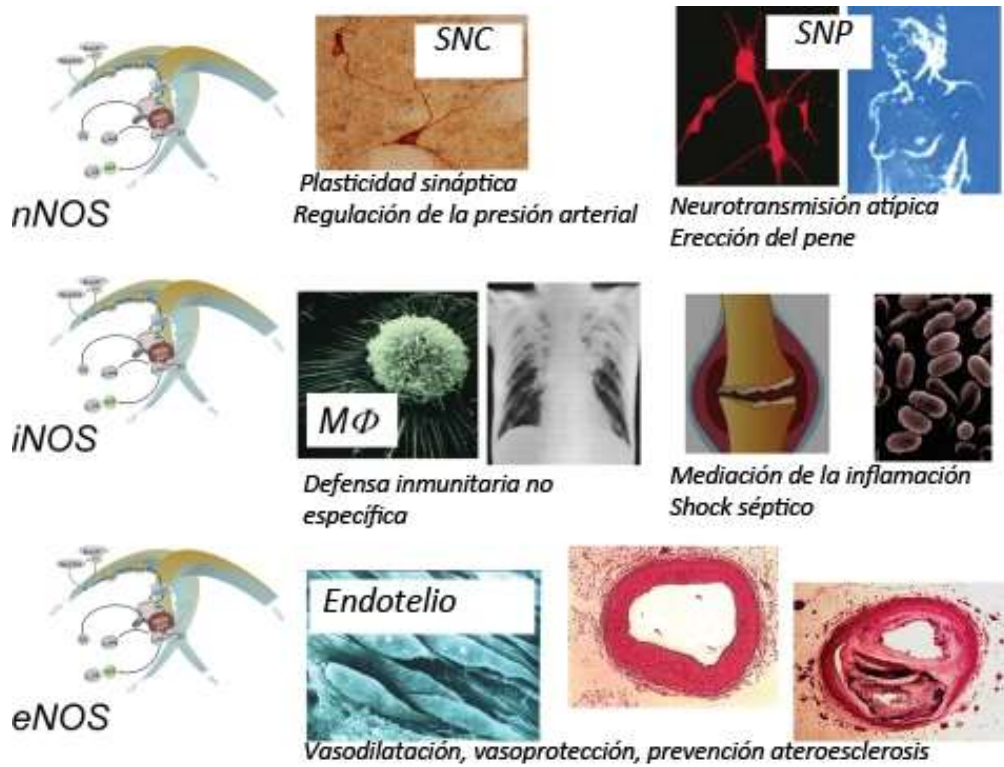


Figura 2. Funciones del óxido nítrico según lugar de síntesis. Extraído de *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Ulrich Förstermann, William C. Sessa. Eur Heart J. 2012; 33(7): 829–837.

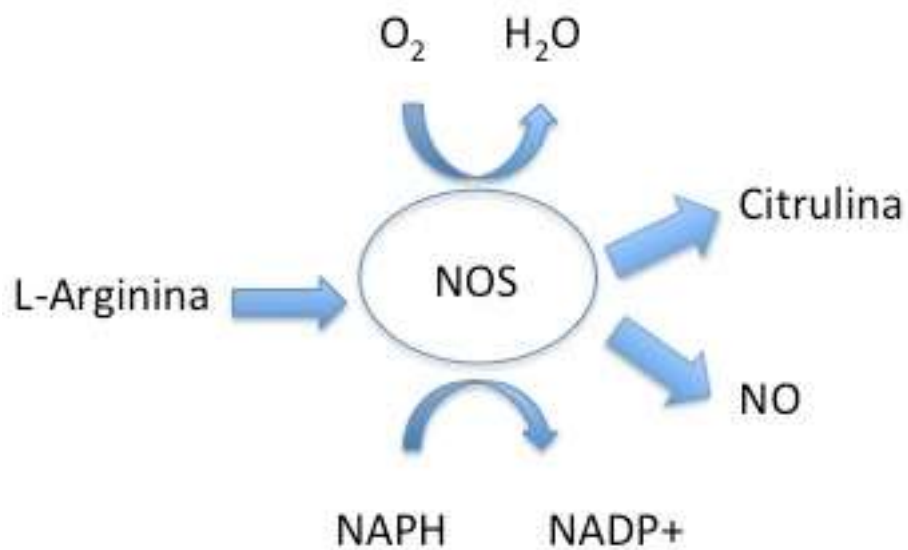


Figura 3. Síntesis de NO.

La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un antagonista competitivo de eNOS que se elimina, mayoritariamente, metabolizada por la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) y, en una pequeña proporción, sin metabolizar por la orina. La mayoría de los factores de riesgo cardiovascular inhiben la actividad de la DDAH y, por tanto, producen un incremento de los niveles de ADMA plasmáticos que interfieren con la generación de NO, incrementando el estrés oxidativo (Fig.4) ^{51, 52}.

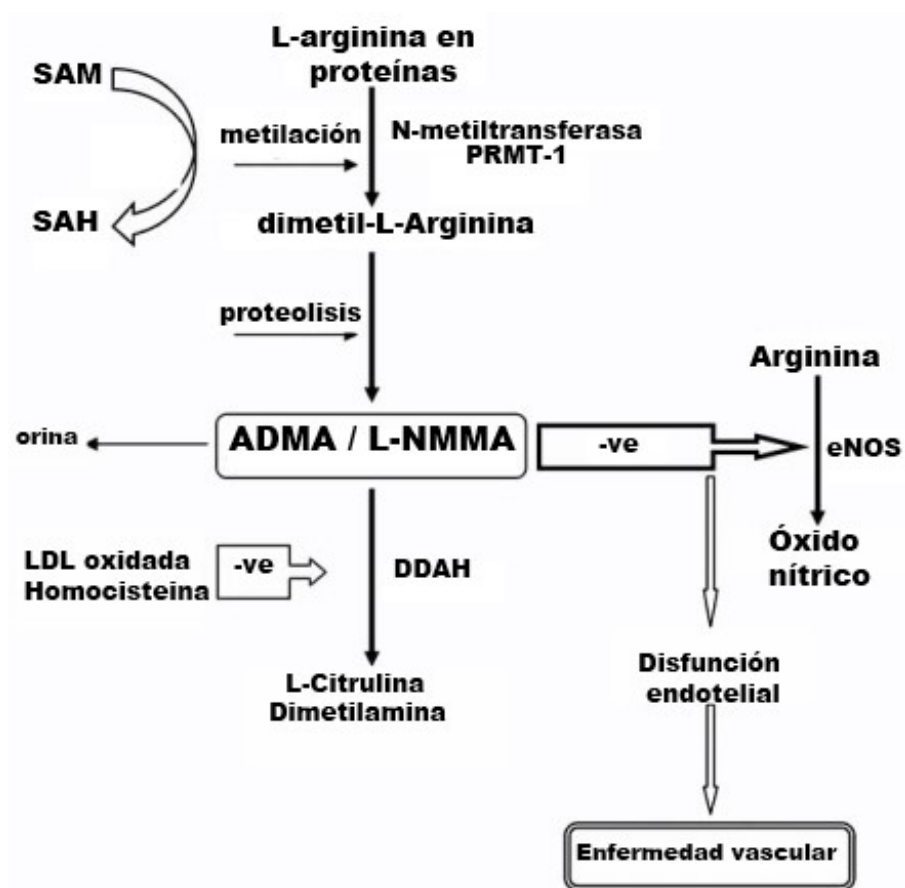


Figura 4. Esquema que muestra el origen y función de la arginina-dimetil-asimétrica o ADMA. Traducido de *The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease*. Latika Sibal, Sharad C Agarwal, Philip D Home, Rainer H Boger. *Curr Cardiol Rev*. 2010; 6(2): 82–90.

- *Aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS):* cuando se ha estudiado el modelo experimental de HTA se ha evidenciado la existencia de un aumento en la producción de ROS. Este hecho favorece el remodelado vascular, la inflamación y la disfunción endotelial ⁵³. Las ROS, derivadas de la molécula de oxígeno (O₂) por reducción química parcial, son moléculas muy reactivas ya que poseen electrones desapareados que les permiten reaccionar con otras moléculas orgánicas a través de procesos de óxido-reducción (REDOX) ⁵⁴. Este grupo incluye a los peróxidos de hidrógeno (H₂O₂), producidos cuando el O₂ es reducido con dos electrones, y las formas reactivas de oxígeno, que abarcan al radical anión superóxido (O₂^{• -}) y al radical hidroxilo (HO[•]). Aunque también se sintetizan en el retículo endoplasmático y el citoplasma, la principal fuente de producción de estos compuestos es la mitocondria. En presencia de ciertos estímulos, todas las células de la pared vascular son capaces de generar ROS. Esto último se produce por ejemplo en la hipertensión arterial ⁵⁵. En esta patología, existe un aumento en la actividad de las enzimas que participan activamente en la producción de ROS (NAPDH, xantina oxidasa y mieloperoxidasa, entre otras).
- *Disminución de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas:* en numerosos estudios con pacientes hipertensos se ha observado una disminución de la expresión de las defensas antioxidantes enzimáticas, tales como la superóxido dismutasa

(SOD), glutatión peroxidasa y catalasa ⁵⁵. Asimismo, se ha constatado también la disminución de otros agentes neutralizantes (scavengers) de ROS no enzimáticos (vitamina E, vitamina C, glutatión) ^{53, 54, 55, 56}. La SOD constituye la primera defensa antioxidante enzimática que presenta la célula para hacer frente al exceso de ROS, y su acción está complementada por la catalasa de forma que ambas enzimas, conjuntamente, puedan transformar el $O_2\bullet -$ en O_2 y H_2O .

- Expresión de moléculas de adhesión celular: el endotelio disfuncionante activa la expresión de integrinas y otras moléculas capaces de atraer leucocitos y otras células inflamatorias hacia la pared del vaso. Durante este proceso, se incrementa de forma específica la expresión de E-selectina, considerada uno de los biomarcadores de daño endotelial más importantes.
- Vasoconstricción: la vasoconstricción crónica se asocia a procesos inflamatorios, activación del depósito de colágeno, acumulación de fibronectina y producción de otros componentes de la matriz extracelular. Todo ello conduce a un remodelado eutrófico concéntrico del vaso. Esta asociación entre vasoconstricción y remodelado fue ensayada in vivo en arterias mesentéricas de ratas expuestas a una perfusión continua de adrenalina durante 7 días ⁵⁶. Al finalizar el tratamiento, se observó un remodelado concéntrico de estas arterias. Este remodelado fue independiente de la presión intravascular generada

dentro de las mismas.

- **Expresión de endotelina-1:** Se han encontrados niveles elevados de endotelina-1 en diversos modelos experimentales de hipertensión. Un ejemplo es el representado por las ratas DOCA (tratadas con acetato de desoxicorticosterona) ⁵⁷. De la misma manera, se ha constatado un aumento de expresión del RNA mensajero de la pre-pro-endotelina-1 en el endotelio de las arterias de pequeño calibre del tejido subcutáneo glúteo en humanos ⁵⁸. El incremento de los niveles de endotelina-1 se asocia a un remodelado vascular hipertrófico, que puede corregirse con antagonistas de la endotelina ⁵⁹. La elevación de la presión arterial y/o de los niveles plasmáticos de aldosterona activan la expresión de endotelina-1 en endotelio ^{60, 61}.

c) Fibrosis de matriz extracelular: en el modelo de hipertensión se produce depósito de material fibrótico alrededor del vaso, principalmente en forma de colágeno. Este depósito altera la relación presión pasiva/diámetro interno del vaso y, en definitiva, induce rigidez en la pared vascular. La acumulación del colágeno se manifiesta, de forma muy clara, a nivel de los vasos coronarios y, en menor medida, alrededor de la aorta ⁶² y de las arterias mesentéricas de ratas SHR ^{63, 64}. Paradójicamente, sin embargo, se ha observado que en pacientes jóvenes con hipertensión leve-moderada, el incremento del depósito de colágeno puede asociarse a una reducción en la rigidez del vaso ⁶⁵. Este último dato indica que el incremento de rigidez de la pared del vaso no es fruto del acúmulo de colágeno en sí, sino más bien del

tipo de reclutamiento de las fibras de colágeno que se desencadena tras la exposición a presiones intravasculares elevadas.

Hay toda una serie de mediadores que activan los procesos de fibrosis vascular. Entre ellos figuran la aldosterona ⁶⁶, la angiotensina II, el factor de crecimiento tisular β (TGF- β) y la endotelina-1 ⁶⁰. La angiotensina II promueve la producción de colágeno de tipo I en las células del músculo liso vascular, mientras que la aldosterona induce el depósito extracelular de colágeno tipo I y tipo II y de fibronectina ⁶⁰. Por otra parte, se ha encontrado una relación inversa entre el depósito de colágeno y el nivel de expresión TGF- β . De esta manera encontramos menores niveles en ratas SHR respecto a ratas normotensas WKY ⁶⁷.

d) Activación del eje renina-angiotensina-aldosterona: la activación del eje renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es otro de los eventos importantes que se producen en el proceso de remodelado vascular ^{68, 69}. Experimentalmente, se ha podido demostrar la asociación entre remodelado vascular y SRAA en un modelo de hipertensión asociada a síndrome metabólico, como es el de la rata hipertensa alimentada con fructosa (FFHR, acrónimo del inglés *Fructose-fed Hypertensive Rat*) ⁷⁰. En este modelo se evidenció un incremento en la expresión de receptores de angiotensina-II-subtipo 1 (AT₁R) y un descenso del subtipo 2 (AT₂R), lo cual se asocia a disfunción endotelial, crecimiento e hipertrofia celular de la pared del vaso.

A continuación, describiremos brevemente algunos de los mecanismos fisiopatológicos que relacionan la activación del SRAA con el remodelado vascular:

- Activación del SRAA: dicha activación se ha relacionado con el aumento del estrés oxidativo y activación de los factores de transcripción AP-1 y NK- κ B, responsables de la amplificación de la respuesta inflamatoria y de la activación de la transcripción de citoquinas y quimiocinas.
- Angiotensina II: esta proteína se encarga de la regulación homeostática del sistema cardiovascular. Por tanto, el incremento crónico de angiotensina II está implicado en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular.
- Aldosterona: la aldosterona interacciona con receptores de mineralocorticoides (MR) provocando así disfunción endotelial, trombosis, hipertrofia vascular y fibrosis cardíaca. Además, está implicada también en el crecimiento y proliferación de las células del músculo liso vascular.

5.2.4 EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL REMODELADO VASCULAR

Lo que caracteriza a la HTA es la perpetuación de presiones elevadas en el interior del vaso, mantenidas inicialmente a expensas del aumento del gasto cardíaco y, posteriormente, a expensas de un incremento de las resistencias vasculares periféricas totales ⁵. El remodelado vascular en la HTA surge al inicio 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 infarto agudo de miocardio (IAM) y otros eventos tromboembólicos sistémicos. En el 100% de los pacientes con HTA en estadio I se observa una alteración estructural del árbol vascular. Dicha alteración es fruto de la evolución natural del remodelado de las arterias coronarias. Conforme avanza el remodelado vascular, a la alteración estructural se le suma la disfunción endotelial y la HVI (presentes sólo en el 60% y el 45% de los pacientes, respectivamente, durante esta fase precoz de la enfermedad) ⁷¹.

Las alteraciones estructurales que se producen en los vasos de pequeño calibre tienen un importante valor pronóstico en el paciente hipertenso. Se ha demostrado, de forma contundente, que los pacientes con mayor cociente grosor de pared/diámetro interno (GP/DI) presentan un aumento en la incidencia de eventos cardiovasculares, en forma de infarto o accidente cerebrovascular ^{72,73}. Actualmente, la búsqueda de terapias eficaces para revertir estas alteraciones morfológicas constituye una de las prioridades en el campo de la investigación cardiovascular.

5.3 DRONEDARONA

Dronedarona es un fármaco antiarrítmico, de aparición relativamente reciente, derivado de la amiodarona. Al igual que ésta, se trata de un derivado del benzofurano que actúa como bloqueante de múltiples canales iónicos, lo

que le confiere sus propiedades como antiarrítmico. Se distingue de la amiodarona por la ausencia de dos grupos de yodo, responsables en ésta última de la toxicidad tiroidea o pulmonar. Presenta además un grupo metilsulfonamida, que reduce la afinidad lipofílica del compuesto y con ello su vida media (Fig.5). La dronedarona es por tanto un fármaco con una menor vida media que la amiodarona y una tasa de efectos secundarios disminuida.

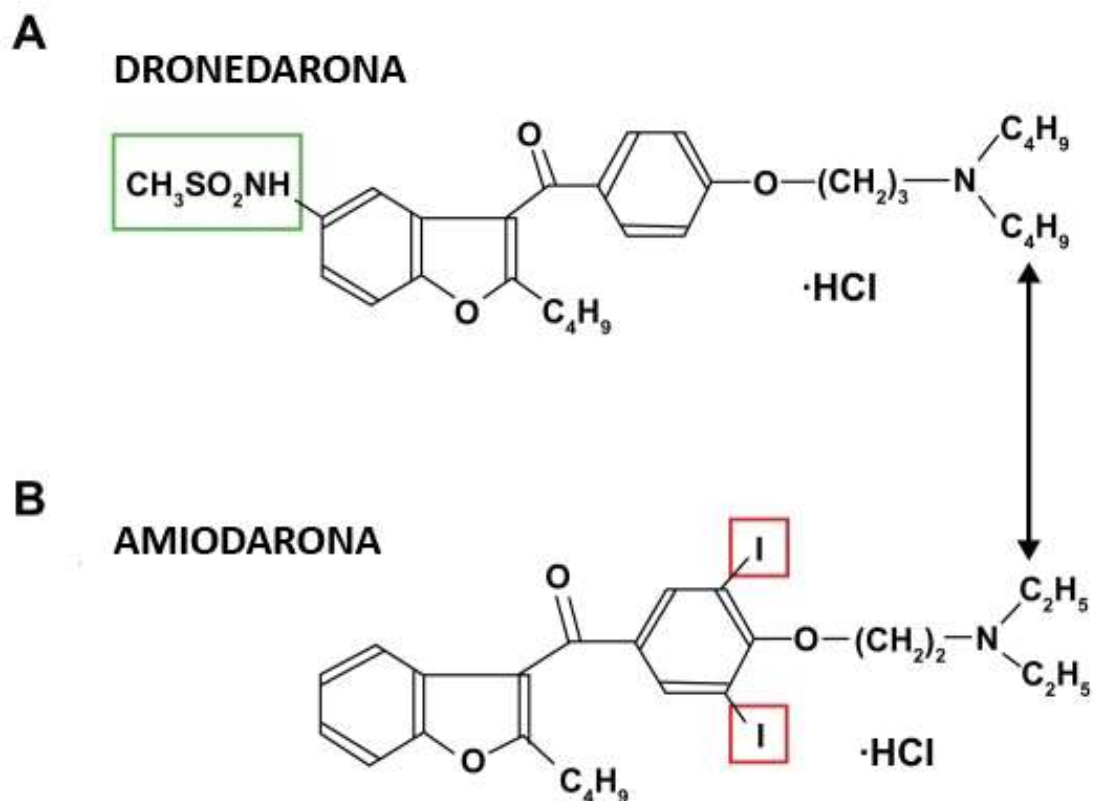


Figura 5. Estructura química de la dronedarona y de la amiodarona. Extraído de *Dronedaron: current evidence for its safety and efficacy in the management of atrial fibrillation*. Patrick A Schweizer, Rüdiger Becker, Hugo A Katus, Dierk Thomas. *Drug Des Devel Ther*. 2011;5: 27–39.

5.3.1 FARMACOCINÉTICA

La dronedarona es un fármaco con una rápida absorción por vía oral (70-94%), especialmente si se acompaña de la ingestión de alimentos. Sin embargo, su biodisponibilidad global es tan solo del 15% debido al importante metabolismo de primer paso hepático que sufre. Presenta un metabolito activo, la N-desbutil-dronedarona, aunque mucho menos potente.

La concentración pico de dronedarona se consigue a las 4h de su ingesta y, dada su menor liposolubilidad, su vida media es de tan solo 24h (a diferencia de la amiodarona, que presenta una vida media mucho mayor, de hasta semanas). Con la administración de la dosis habitual de 400 mg dos veces al día, el estado de equilibrio se alcanza en 7 días. Presenta una elevada unión a proteínas (98%) y su eliminación se lleva a cabo a través de la excreción fecal de productos del metabolismo por el citocromo CYP3A4 hepático

⁷⁴.

5.3.2 FARMACODINÁMICA

De forma similar a la amiodarona, la dronedarona actúa sobre múltiples corrientes iónicas, lo que altera las propiedades electrofisiológicas de la membrana de las células cardíacas. Los principales canales sobre los que actúa son los siguientes ^{75, 76}:

- La corriente de calcio de tipo L (I_{CaL}).

- Los componentes rápido (I_{Kr}) y lento (I_{Ks}) de la corriente rectificadora tardía de potasio.
- El canal de entrada rectificador de potasio (I_{K1}).
- La corriente de potasio dependiente de acetilcolina ($I_{K, ACh}$).
- La corriente de entrada de sodio (I_{Na}).
- La corriente de marcapasos (I_f).

La inhibición de los canales anteriores por parte de la dronedarona se traduce en los siguientes efectos a nivel cardíaco (Fig.6):

- a) Inhibición de la actividad auricular reentrante: la dronedarona prolonga la duración del potencial de acción al inhibir canales de potasio, como los componentes rápido y tardío de la corriente rectificadora de potasio y los canales K2P⁷⁷, lo que le confiere propiedades antiarrítmicas de la clase III de Vaughan-Williams. Al retrasar la entrada de potasio en la célula, la repolarización se prolonga, por lo que la célula tarda más en salir del período refractario y, por tanto, en estar preparada para una nueva despolarización. Esta prolongación del potencial de acción auricular dificulta que se pueda mantener la actividad de un circuito de reentrada⁷⁸. Sin embargo, este mismo efecto a nivel ventricular podría causar la aparición de los llamados postpotenciales precoces, es decir, actividad ventricular espontánea que se traduce en forma de extrasistolia ventricular o arritmias del tipo de la *torsade de pointes*⁷⁹.

La dronedarona inhibe la corriente despolarizadora de calcio de tipo L (I_{CaL}), por lo que también tiene un efecto como fármaco antiarrítmico de clase IV. Este efecto contrarrestaría el efecto facilitador de los postpotenciales precoces mencionado anteriormente e impediría una prolongación excesiva de la repolarización.

La corriente de potasio dependiente de acetilcolina ($I_{K, Ach}$) está mediada por la actividad parasimpática a través de receptores muscarínicos y acelera la repolarización celular. Por tanto, puede facilitar el mecanismo de reentrada. La inhibición por parte de la dronedarona de esta corriente podría ser beneficiosa en pacientes con FA crónica en los que se ha descrito una activación mantenida de la misma sin necesidad de estímulo parasimpático ⁸⁰. La entrada mantenida de potasio hace que el potencial basal de membrana pase a un estado hiperpolarizado que hace que la célula sea más excitable ⁸¹.

- b) Inhibición del automatismo auricular: la actividad ectópica auricular es uno de los mecanismos asociados a la aparición de fibrilación auricular (FA) en tejidos predispuestos ⁸². Al inhibir la corriente de entrada de sodio (I_{Na}), que es la principal corriente iónica despolarizadora, se reduce la excitabilidad celular y, por tanto, la tasa de ectopias. Este efecto se engloba dentro de la clase Ic de Vaughan-Williams. Cabe destacar que este último efecto es más potente en aquellas células que ya se encuentran parcialmente despolarizadas, lo cual hace que la dronedarona tenga mayor efecto sobre las células auriculares, que poseen un menor potencial de membrana que las ventriculares. De igual

manera, esta inhibición de la corriente iónica de sodio en células ventriculares podría correlacionarse con el empeoramiento en la clase funcional de pacientes con insuficiencia cardíaca.

Al inhibir la corriente de marcapasos I_f , la dronedarona tiene un efecto cronotrópico negativo. Presenta también un efecto dromotrópico negativo, ya que enlentece la conducción a través del nodo auriculoventricular, aumenta el intervalo PR en ritmo sinusal y reduce la respuesta ventricular en pacientes con FA. En esto podría estar también implicado su efecto de inhibición sobre la corriente de marcapasos.

La dronedarona inhibe tanto la corriente de calcio I_{CaL} como la actividad de la corriente de intercambio Na^+/Ca^{2+} (I_{NCX}). Ambas corrientes iónicas presentan una actividad aumentada en pacientes con FA. En estos pacientes se produce una mayor salida de calcio del retículo sarcoplasmático al citoplasma, hecho que implica un mayor intercambio de calcio por sodio y, por tanto, una mayor corriente de entrada de sodio en la célula cardíaca. Este es uno de los mecanismos implicados en la aparición y mantenimiento de las arritmias auriculares, así como también se ha asociado al remodelado auricular ⁸³. Como contrapartida, este mismo efecto de inhibición de la disponibilidad de calcio implica una acción inotrópica negativa, que podría resultar perjudicial en determinados pacientes.

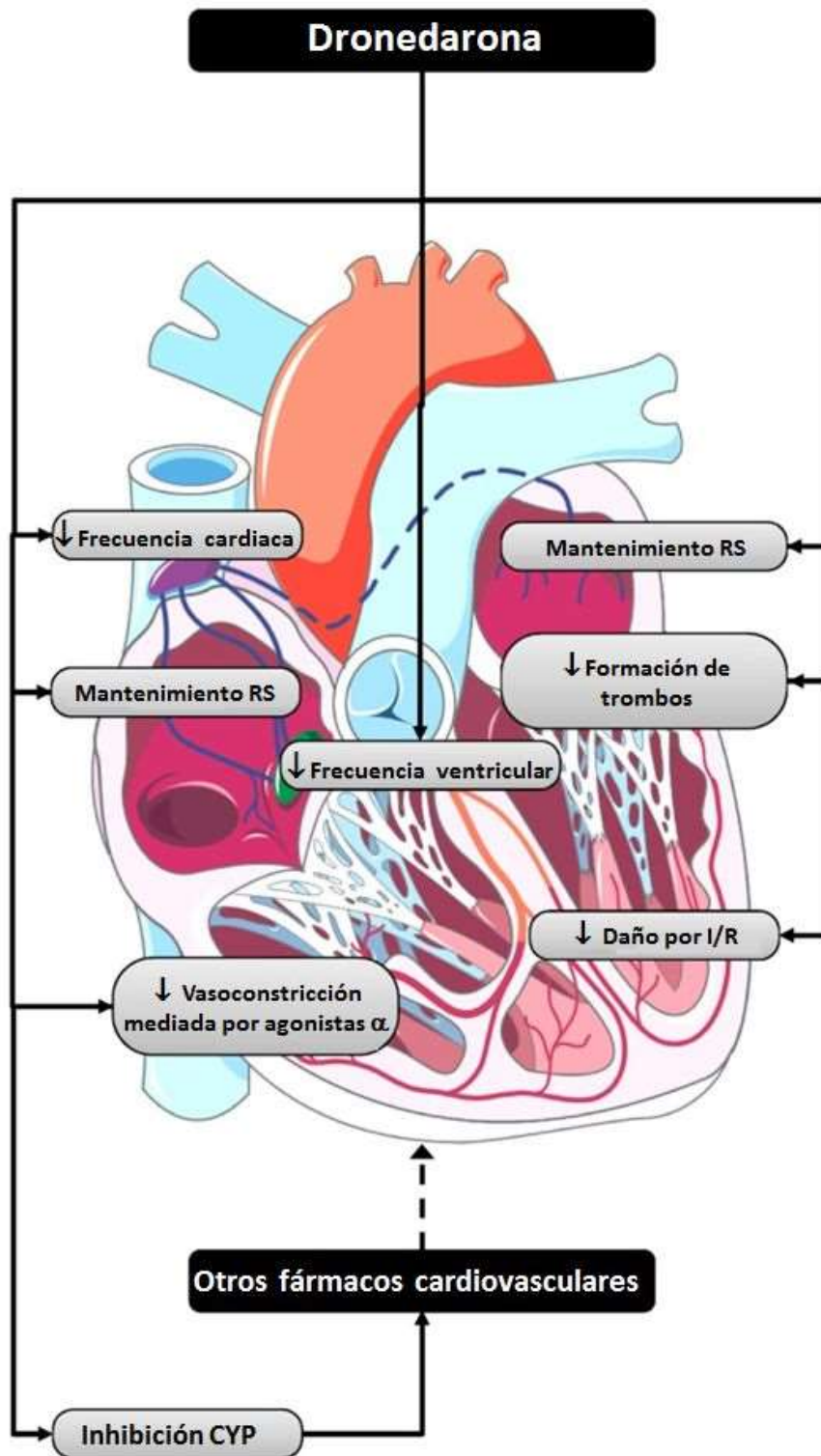


Figura 6. Acciones de la dronedarona. Extraído de *Pleiotropic Effects of Antiarrhythmic Agents: Dronedrona in the Treatment of Atrial Fibrillation*. Jordi Heijman, Gerd Heusch, Dobromir Dobrev. Clin Med Insights Cardiol. 2013;7: 127–140.

5.3.3 INTERACCIONES Y EFECTOS SECUNDARIOS

La dronedarona presenta una serie de interacciones farmacológicas debidas a que actúa con inhibidor del citocromo CYP3A4, de la glicoproteína P y del citocromo CYP2D6. A continuación, referiremos algunas de las más relevantes:

- El ketoconazol, como inhibidor del CYP3A4, puede incrementar de forma significativa los niveles plasmáticos de la dronedarona. Por este motivo, se debe evitar el tratamiento simultáneo con dronedarona y antifúngicos, antibióticos macrólidos o inhibidores de la proteasa. Sin embargo, hay combinaciones con inhibidores moderados del citocromo, como el verapamilo o el diltiazem, cuya asociación con dronedarona está permitida, aunque debe hacerse bajo un estricto control.
- Tal como se ha referido anteriormente, la dronedarona inhibe la glicoproteína P, implicada en la metabolización de la digoxina. Por ello, si fuera necesario combinar ambos fármacos, deberían usarse menores dosis de digoxina y monitorizar sus niveles plasmáticos.
- De la misma manera, dronedarona aumenta hasta 4 veces los niveles plasmáticos de simvastatina, por su acción sobre CYP3A4. Habrá que vigilar por tanto la aparición de efectos secundarios y de miopatía.
- Los nuevos fármacos anticoagulantes (dabigatrán, rivaroxabán o apixabán) se verán también afectados por su combinación con

dronedarona y deberán usarse con cautela. Sin embargo, no se han visto cambios en los niveles de INR con warfarina o acenocumarol ⁸⁴.

- Por su acción sobre el citocromo puede aumentar también discretamente la biodisponibilidad del metoprolol.
- Aunque su efecto proarrítmico es bajo, se debe evitar su asociación con fármacos que puedan prolongar el QT.

En cuanto a los efectos secundarios, la dronedarona presenta un perfil de seguridad mejorado respecto a la amiodarona:

- Los efectos secundarios más frecuentes son los gastrointestinales (náuseas, vómitos y diarrea) y cutáneos (rash), aunque con una intensidad leve habitualmente.
- La dronedarona puede producir bradicardia y prolongación del intervalo QT.
- La dronedarona puede producir un falso incremento de los niveles de creatinina por la inhibición del transporte tubular de la misma.
- Se han comunicado varios casos de hepatotoxicidad grave que han suscitado el diseño de numerosos estudios al respecto. Por ello, debería monitorizarse la función hepática en todo paciente en tratamiento crónico con dronedarona ^{85, 86}.

5.3.4 EVIDENCIA CLÍNICA DEL USO DE LA DRONEDARONA

La dronedarona es un fármaco de primera línea para mantener el ritmo sinusal tras la cardioversión de la fibrilación auricular, sea paroxística o persistente, de acuerdo con las Guías de Práctica Clínica de la Sociedad Europea de Cardiología ⁸⁷ y del *American Heart/American College of Cardiology* ⁸⁸.

Recomendaciones	Clase de recomendación	Nivel de evidencia
Dronedarona se recomienda en pacientes con fibrilación auricular recurrente como un agente antiarrítmico moderadamente efectivo para el mantenimiento del ritmo sinusal.	I	A
Tras la cardioversión, se puede considerar mantener un tratamiento antiarrítmico de corta duración (4 semanas) en pacientes seleccionados (por ej. aquellos en riesgo de complicaciones asociadas al tratamiento).	IIb	B
No se recomienda el uso de dronedarona en pacientes con fibrilación auricular permanente.	III	B

Tabla 1. Recomendaciones de uso de la dronedarona. Extraída y traducida de las recomendaciones del *American Heart/American College of Cardiology*.

La dronedarona es un fármaco que debe ser pautado y supervisado por profesionales con experiencia en el manejo de antiarrítmicos, según la Ficha Europea de Características del Producto. Es decir, es un fármaco que requiere

seguimiento por un cardiólogo. Si durante el tratamiento aparece un nuevo episodio de FA y se desestima la reversión del ritmo, deberá abandonarse el uso de dronedarona.

La Agencia Europea del Medicamento, en base a los resultados del estudio ANDROMEDA, contraindica este fármaco en pacientes con insuficiencia cardíaca con clase NYHA III o IV o disfunción ventricular moderada o en pacientes inestables hemodinámicamente. Por otra parte, el uso de dronedarona en la insuficiencia cardíaca de clase NYHA I o II se reservaría únicamente para aquellos casos en que no hubiera otra alternativa.

En el caso de la hipertrofia ventricular izquierda o la cardiopatía isquémica, la dronedarona se ha considerado segura ya que no se ha asociado a efectos proarrítmicos relevantes.

La aprobación del uso de dronedarona motivó el desarrollo de numerosos estudios para explorar sus acciones y posibles efectos secundarios.

Durante la realización del estudio ATHENA ⁸⁹, se observó una reducción significativa de los ingresos por síndrome coronario agudo. Este efecto podría deberse a que la reducción de la frecuencia cardíaca implica una reducción del consumo de oxígeno y un aumento de la duración de la diástole, que favorecería el flujo coronario. Este fármaco tiene también un efecto antihipertensivo debido a su acción bloqueadora de los receptores α adrenérgicos y, por el mismo motivo, podría reducir la vasoconstricción asociada a isquemia miocárdica en paciente con patología coronaria. Por último, en un estudio experimental se sometió a cerdos a isquemia por bajo flujo controlado en la arteria coronaria descendente anterior y se comprobó el

efecto de la dronedarona sobre la reducción del tamaño del infarto ⁹⁰. El mecanismo no es bien conocido, pero podría estar asociado con la capacidad del fármaco de reducir una acumulación tóxica de calcio intracelular.

Uno de los subestudios del ensayo ATHENA ⁸⁹ sugirió que la dronedarona podría reducir la incidencia de ictus, efecto que no ha sido descrito para ningún otro fármaco antiarrítmico. Se desconocen los mecanismos implicados, aunque algunos de ellos podrían deberse al propio efecto antiarrítmico del fármaco o a la reducción tanto de la presión arterial como de la frecuencia cardíaca. Además, también se ha evidenciado una reducción del tamaño del infarto cerebral tras la oclusión controlada durante una hora de la arteria cerebral media en un modelo de ratas ⁹¹.

Otro efecto interesante, es su utilidad frente a la enfermedad de Chagas. Al igual que la amiodarona, la dronedarona tiene un efecto antiparasitario directo al interferir con el metabolismo del calcio y la síntesis de esteroides de membrana de *Trypanosoma cruzi* ⁹². Sin embargo, quizás más inesperado, resulta el efecto inhibitor todavía más potente sobre el crecimiento de *Leishmania mexicana* ⁹³.

5.4 TRATAMIENTO DEL REMODELADO VASCULAR

5.4.1 REGRESIÓN DEL REMODELADO VASCULAR

El hecho de que la vasoconstricción crónica sea un mecanismo de remodelado arterial concéntrico permite hipotetizar que la vasodilatación inducida por antihipertensivos debería producir el efecto contrario, es decir, un remodelado arterial excéntrico. Dicho remodelado se traduciría en una disminución del daño tisular y los fenómenos isquémicos asociados a la HTA ⁵. Esta hipótesis parece suficientemente sustentada por estudios in vivo realizados en arteria mesentérica de ratas con hipertensión inducida por adrenalina. En estas ratas la infusión de amlodipino produjo reversión del remodelado del vaso ⁹⁴.

Pese a que los anteriores resultados han sido corroborados en estudios posteriores con otros fármacos hipotensores, los mecanismos fisiopatológicos implicados en la reversión del remodelado vascular con este tipo de fármacos no han sido aún completamente esclarecidos.

Según el tipo de fármaco vasodilatador empleado, se han hallado efectos muy dispares sobre las resistencias vasculares periféricas. La expresión de diferentes subtipos de NADPH oxidasas (nox1, nox2 y nox4), y sus correspondientes subunidades, en células de músculo liso y endotelio podría explicar la diferente eficacia mostrada por los distintos fármacos vasodilatadores en relación con la normalización de la estructura vascular ⁹⁵. Así, varios estudios que utilizan métodos pletismográficos muestran una

normalización de la estructura del vaso de pequeño calibre en pacientes tratados con calcio-antagonistas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAS) o antagonistas del receptor de la angiotensina II (ARA-II), pero no en los tratados con β -bloqueantes ⁹⁶.

5.4.2 FÁRMACOS QUE ACTÚAN SOBRE EL REMODELADO VASCULAR

Ensayos clínicos prospectivos y randomizados realizados en pacientes hipertensos sugieren que el tratamiento antihipertensivo previene la aparición de eventos cardiovasculares y que, en dicho efecto protector, juega un papel determinante la capacidad del anterior tratamiento para revertir el remodelado vascular. Se ha demostrado que, en este grupo poblacional, la simple normalización de la tensión arterial sin una regresión del remodelado asociada (por ejemplo, tras la exposición a nitroglicerina) no mejora el pronóstico ⁹⁷. Como mostramos a continuación, la evidencia sugiere que la regresión del remodelado vascular en la HTA se manifiesta de distinta manera en función del vasodilatador empleado y del tipo de arteria estudiada:

a) **Regresión del remodelado en vasos de gran calibre**: algunos fármacos hipotensores como los calcio-antagonistas, IECA, ARA-II o la espironolactona, parecen alterar las propiedades estructurales de las arterias de gran calibre o de conducción. Los calcioantagonistas, como el nifedipino ⁹⁸ y el amlodipino ⁹⁹, los IECA ⁹⁹ y los ARA-II, estimulan la apoptosis de las células

musculares lisas de la aorta torácica de la rata SHR. Por otra parte, la hidralazina, a pesar de su acción hipotensora, no consiguió demostrar dicho efecto ¹⁰⁰. Se conoce poco sobre la fisiopatología que relaciona la apoptosis con el remodelado vascular y los datos son contradictorios. Algunos estudios indican que la apoptosis se manifiesta de forma cíclica, durante periodos limitados de tiempo ^{101,102}. Sin embargo, otros estudios encuentran un incremento mantenido de la apoptosis durante 12 meses de tratamiento con enalapril y amlodipino ⁹⁸ y a lo largo de 16 semanas con quinapril ¹⁰³.

Algunos fármacos antihipertensivos (β -bloqueantes, nitratos, calcio-antagonistas, IECA, ARA-II y la espironolactona) disminuyen la rigidez de la pared vascular ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Un estudio preclínico publicado recientemente por nuestro grupo de investigación muestra el efecto de un β -bloqueante cardioselectivo, el esmolol, sobre el remodelado de la aorta torácica ¹⁶. La administración del esmolol durante 48h produjo regresión del remodelado estructural (disminución del grosor de la pared y del área del vaso), así como disminución de la rigidez de la aorta.

Dentro de los mecanismos conocidos implicados en la regresión del remodelado vascular, se encuentran los siguientes:

- Reversión de la rigidez: los nitratos consiguen dicho efecto a través de su efecto vasodilatador ¹⁰⁴. Sin embargo, el resto de fármacos anteriormente mencionados logran aumentar la complianza vascular a través de mecanismos antifibróticos, particularmente mediante la inhibición del TGF- β 1. Esta

disminución de la rigidez del vaso genera una disminución en la impedancia, con un retraso en la reflexión de la onda de pulso y, en consecuencia, una reducción de la presión de pulso a nivel central en la aorta.

- Bloqueo del SRAA: los IECA y ARA-II actúan bloqueando el eje renina-angiotensina-aldosterona y así, evitan la activación del AT₁R y, por tanto, reducen el [Ca²⁺]_i y la actividad de Pyk-2 y NADPH oxidasa. Con este efecto actúan también en otros mecanismos de remodelado vascular. Adicionalmente, la aldosterona induce un aumento del depósito de colágeno. Por tanto, la administración de su antagonista, el fármaco eplerenona, reduce la rigidez de todo tipo de arterias, tanto las de gran ¹⁰⁷ como las de pequeño calibre ¹⁰⁸.
- Cambios en la distensibilidad del vaso: los β-bloqueantes como el atenolol producen cambios en la distensibilidad del vaso ¹⁰⁹. Se produce además una reducción de la frecuencia cardíaca que incrementa la presión de pulso, así como una vasoconstricción periférica ¹¹⁰. Esto podría explicar, en parte, la menor eficacia de los β-bloqueantes para prevenir los eventos cardiovasculares en comparación con los fármacos inhibidores del SRA ¹¹¹.

b) Regresión del remodelado en vasos de pequeño calibre:

- Cambios en la estructura de los vasos: los cambios en el remodelado de las arterias de pequeño calibre subcutáneas parecen reflejar, de manera fidedigna, los cambios que se producen en otros vasos de pequeño calibre, como las coronarias ¹¹²⁻¹¹⁴. Diversos estudios han demostrado que los IECA ¹¹⁵⁻¹¹⁷, ARA-II ^{118,119} y algunos calcioantagonistas ^{120,121} normalizan la estructura de arterias de pequeño calibre en tejido subcutáneo glúteo de los pacientes con HTA. En cambio, otro estudio revela que el verapamilo aumenta el número de células musculares lisas apoptóticas en arterias coronarias de SHR ¹⁰⁰. Además, se ha demostrado que eplerrenona reduce la rigidez de arterias de pequeño calibre en pacientes hipertensos ¹⁰⁸; dicho efecto es el resultado de la reducción del depósito de colágeno y del cociente colágeno/elastina en la pared del vaso producidos por el fármaco. El bloqueo del SRAA (con IECA, ARA- II) también mejoró el remodelado en las arterias de pequeño calibre de los sujetos con DM-2 ^{122,123}. Recientemente, un agonista selectivo del receptor AT₂R, el compuesto 21, ha mostrado su capacidad para reducir el depósito de colágeno alrededor de la aorta y las coronarias, así como para reducir la rigidez de vasos de pequeño calibre a la vez que mejora la disfunción endotelial en el modelo de ratas espontáneamente hipertensas con propensión al accidente cerebrovascular (SPSHR, acrónimo del inglés *Stroke-prone spontaneously hypertensive rat*). Este último efecto se vio potenciado al asociar un tratamiento paralelo con ARA-II, independientemente del

efecto observado sobre la presión arterial ¹²⁴. En la literatura encontramos que, los β -bloqueantes como el atenolol, no parecen mejorar la estructura de los vasos de pequeño calibre ¹²⁵. Sin embargo, estudios preclínicos realizados por nuestro grupo de investigación muestran la regresión del remodelado de las arterias intramiocárdicas ¹⁷ y de las arterias coronarias ¹⁸ tras 48h de tratamiento con esmolol (β -bloqueante cardioselectivo).

- Cambios en la función de los vasos: diversos estudios parecen indicar que la terapia antihipertensiva mejora la función deteriorada de las arterias de pequeño calibre causada por la HTA. Todos los datos recogidos parecen coincidir en que la normalización de la función endotelial depende, en gran medida, del tipo de fármaco antihipertensivo más que de su efecto sobre la presión arterial. De esta manera, se ha descrito que la administración de enalapril o amlodipino produce mejoría de la relajación inducida por Ach ⁶⁴. Similares resultados han sido observados con los ARA-II ^{118, 119, 126} y los calcio-antagonistas ^{120, 121}. Sin embargo, cuando se analiza toda la literatura, se obtienen resultados muy variables. Aunque el tratamiento agudo con IECA no mostró una mejoría de la función endotelial in vivo ^{127, 128}, el tratamiento crónico durante 2 años con cilazapril sí fue capaz de producir una normalización in vitro en la función de arterias de pequeño calibre humanas ¹²⁹. Asimismo, los ARA-II han mostrado su capacidad para normalizar la función endotelial en un modelo experimental de DM precoz ¹³⁰. Sin

embargo, en la DM tipo-2 asociada a hipertensión, la terapia multimodal con ARA-II asociados a calcio-antagonistas no mostró beneficio alguno en la función vascular, a pesar de que las alteraciones estructurales del vaso fueron parcialmente corregidas ¹²³. Con respecto a los β -bloqueantes, el esmolol produjo mejoría de la relajación inducida por Ach ¹⁷. Sin embargo, se observó un fracaso del tratamiento con atenolol a la hora de producir mejoría de la función endotelial en varios estudios ^{21, 123, 131}. Esta falta de efecto podría explicarse porque los mecanismos mediados por este fármaco pueden ser diferentes en la capa media y en el endotelio vascular. Otra explicación podría ser que la disfunción endotelial sea más resistente a este tipo de terapia antihipertensiva, incluso en situación de normalización de la tensión arterial ^{115,118}. No obstante, recientemente se ha observado que el nevilolol, un antagonista del ADR- β_1 y agonista del ADR- $\beta_{2,3}$, mejoraba la disfunción endotelial de la arteria pulmonar en un modelo de hipertensión arterial pulmonar en humanos ¹³². Los efectos de antioxidantes (vitaminas E y C, carotenos, etc) sobre el remodelado arterial han sido evaluados en un modelo experimental de hipertensión con resultados poco satisfactorios ^{133,134}. Entre las posibles explicaciones a esta falta de efecto de los antioxidantes se encuentra que la formación de los scavengers de ROS puede ser demasiado tardía, cuando ya ha ocurrido el daño tisular. Estudios clínicos, ensayando inhibidores de la xantina oxidasa ¹¹⁰ y N-acetilcisteína, han demostrado una mejoría en la función endotelial y el poder hipotensor en pacientes hipertensos con enfermedad renal crónica y con hipertensión pulmonar ¹¹⁰⁻¹¹². Recientemente, la imperatorina OW1

¹³⁵ ha demostrado producir regresión del remodelado vascular en un modelo de rata con hipertensión renovascular.

- Efecto sobre las arteriolas: las arteriolas, con un diámetro interno <100µm, están implicadas en el aumento de las resistencias vasculares observado en el paciente hipertenso ¹³⁶. Tal como ha sido descrito en las arteriolas piales de las ratas SPSHRs ¹⁹, la hipertensión induce procesos de remodelado eutrófico en las arteriolas de mayor calibre. La rarefacción es un tipo de remodelado vascular asociado a hipertensión que implica reducción en la densidad de los vasos de pequeño calibre y es responsable de un 15-30% del aumento de la resistencia arterial periférica en esta patología ¹³⁷. Aunque el efecto de los fármacos antihipertensivos sobre la rarefacción no ha sido aún demostrado en hipertensión humana, sí que existe evidencia de dicho efecto en modelos experimentales ¹³⁸. Así, los IECA han demostrado su capacidad para revertir la rarefacción a través de la reducción de los niveles de angiotensina II y mecanismos de vasodilatación arterial. La activación de los receptores AT₁R se ha asociado al desarrollo de rarefacción a través de mecanismos pro-apoptóticos, mientras que los AT₂R parecen participar en la vasodilatación arterial y la corrección de la rarefacción ¹³⁹. Adicionalmente, algunos investigadores han sugerido un efecto antiangionénico del receptor AT₂R, cuyo papel en la regresión del remodelado permanece aún por resolver ¹⁴⁰.

5.5 LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA COMO MODELO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Dada la complejidad de la fisiopatología de la hipertensión esencial humana, los modelos experimentales de hipertensión han sido muy útiles para identificar los mecanismos que intervienen en el desarrollo y/o el mantenimiento de esta patología, a la vez que son un excelente instrumento donde ensayar el efecto antihipertensivo de nuevos fármacos. Entre los modelos animales de hipertensión esencial destaca el de la rata espontáneamente hipertensa o SHR. Esta cepa de roedor fue desarrollada por el grupo de Okamoto mediante la selección y el cruce de ratas de la cepa WKY que presentaban una presión arterial elevada ¹⁴¹. La cepa WKY se estableció, en 1971, como control normotenso y también se desarrolló a partir de una colonia WKY a través del cruce entre animales de la misma camada ¹⁴². La diferencia genética entre las ratas SHR y WKY es sustancial, comparable a la máxima divergencia que existe entre personas no relacionadas ¹⁴³⁻¹⁴⁵.

El modelo SHR ha resultado ser un excelente modelo experimental para el estudio de la hipertensión esencial humana debido a las similitudes entre ambas. Cabe destacar la predisposición genética a una elevada presión arterial sin etiología conocida, el incremento de las resistencias periféricas y una respuesta similar tras el tratamiento con fármacos antihipertensivos ^{146,147}. Es más, en este modelo experimental de hipertensión se observa a lo largo de la vida una progresión de alteraciones hemodinámicas similares a las que se observan en los pacientes hipertensos. Así, la rata muestra una fase de *pre-*

hipertensión, seguida de una etapa de desarrollo de la misma que culmina con un período en el que la hipertensión está ya bien establecida. Al igual que sucede en el ser humano, durante las primeras fases de la hipertensión, el modelo experimental muestra aumento del gasto cardíaco, sin cambios en las resistencias periféricas. A esto se sigue una normalización del gasto cardíaco y un incremento de las resistencias periféricas totales cuando la hipertensión ya se ha establecido ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

Al igual que en humanos, en la cepa SHR existen diferencias de género en el desarrollo de la hipertensión, alcanzando los machos valores mayores de presión arterial que las hembras ¹⁵¹. Estos últimos datos sugieren la existencia de un dimorfismo sexual en lo que respecta a la hipertensión arterial en SHR ¹⁵²⁻¹⁵⁴. Más aún, estudios ecocardiográficos han encontrado diferencias en la estructura del ventrículo izquierdo del macho con respecto a la hembra. Así, aunque en ambos sexos aparece HVI, únicamente en el macho se observa dilatación del ventrículo izquierdo y aumento de la rigidez ventricular ¹⁵⁵. Las diferencias observadas en la función cardíaca entre ambos sexos de SHR se han explicado en base a diferencias anatómicas en el ventrículo izquierdo (los músculos papilares de la hembra tienen un mayor capacidad de acortamiento por lo que generan mayor tensión por unidad de masa) ^{156,157}. El corazón de la hembra tiene, a diferencia del macho, una mayor reserva hipertrófica adaptativa que retrasa la instauración de la insuficiencia cardíaca ¹⁵⁸. De hecho, algunos autores no han podido observar insuficiencia cardíaca en las hembras (durante los dos años y medio de edad) ¹⁵⁵. En base a todo lo anterior, es la rata SHR macho, y no la hembra, la utilizada como modelo experimental de HTA crónica humana ¹⁵⁵.

Un factor importante a la hora de estudiar los cambios en la estructura y función cardíaca es la edad de la SHR macho. Esta rata presenta hipertrofia ventricular izquierda a la edad de 4 semanas, disminución de la función sistólica a las 8 semanas y disfunción diastólica a los 3 meses ¹⁵⁹. A los 11 meses de edad la rata SHR adulta presenta una hipercontractilidad (aumento de la función sistólica) que refleja aumento progresivo de la hipertrofia ventricular manteniendo la disfunción diastólica ¹⁶⁰. Por último, a los 18-24 meses aparece el estadio de insuficiencia cardíaca ¹⁶¹.

Al igual que se ha observado en humanos, la cepa SHR, utilizada como modelo de hipertrofia miocárdica, presenta alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos y glucosa a nivel miocárdico. La hipertrofia ventricular se asocia a una disminución significativa en el transporte y oxidación de ácidos grasos, así como a alteraciones en el complejo enzimático del ciclo de Krebs ^{162,163}. De hecho, el corazón de este modelo experimental presenta una importante supresión de la oxidación de ácidos grasos y un aumento de la oxidación de la glucosa ¹⁶⁴. La rata WKY muestra un metabolismo de ácidos grasos mayor que la SHR, aunque dicho metabolismo disminuye con la edad en ambas cepas ¹⁶⁵. La SHR tiene un déficit del transportador de ácidos grasos CD36 (cromosoma 4) cuya misión es el transporte de éstos hacia el interior de la célula ¹⁶⁶. Este déficit compromete la utilización de ácidos grasos y aumenta el metabolismo de la glucosa ¹⁶⁵. La administración de una dieta con ácidos grasos, que no requiere el transportador CD36, suprime el incremento del metabolismo de la glucosa y la hipertrofia miocárdica en la SHR ¹⁶⁶. Estudios recientes confirman que la reducción de la oxidación de los ácidos grasos es consecuencia de la hipertrofia ventricular, ya que el déficit de enzimas, como la carnitín-palmito

transferasa 1, se produce en la rata SHR a los 4 meses de edad ¹⁶⁷ y la hipertrofia ventricular aparece a las 4 semanas.

5.6 JUSTIFICACIÓN

Justificación de la hipótesis y objetivos que se plantean en la presente tesis:

- En clínica humana, la actuación precoz sobre el remodelado cardiovascular con fármacos antihipertensivos disminuye la morbilidad y la mortalidad en pacientes con HTA.
- Los fármacos antihipertensivos producen regresión del remodelado arterial coronario en modelos experimentales de hipertensión. Sin embargo, este efecto únicamente se ha demostrado tras tratamientos de larga duración (meses/años).
- Nuestro grupo de investigación, ha demostrado recientemente que el esmolol produce regresión del remodelado de las arterias coronarias, tras 48h de tratamiento, en la rata SHR (modelo experimental de hipertensión arterial primaria, HVI y remodelado coronario) ^{17,18}.
- La dronedarona es un antiarrítmico con capacidad para bloquear múltiples canales iónicos, por lo que tiene diversos efectos cardiológicos ⁸². Su mecanismo de acción nos indujo a pensar que podría tener un efecto precoz sobre el remodelado en las arterias coronarias.

- Previamente a este trabajo de tesis, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la administración de la dronedarona durante 14 días, produce regresión precoz de la HVI en las SHR ¹⁶⁸.

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

6 Hipótesis y Objetivos

6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

6.1 HIPÓTESIS

Como hipótesis de trabajo planteamos, que la administración de la dronedarona (bloqueante multicanal) produce regresión precoz del remodelado de la arterias coronarias (H_1), asumiendo como hipótesis nula (H_0) el hecho de que el fármaco no produzca dicho efecto.

6.2 OBJETIVOS

6.2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar si la administración de la dronedarona, durante 14 días, induce regresión del remodelado vascular coronario en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) utilizadas como modelo experimental de hipertensión arterial esencial humana.

6.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Estudiar el efecto de la dronedarona sobre la estructura arterial coronaria.
- Estudiar el efecto de la dronedarona sobre la capacidad funcional de la arteria coronaria.
- Estudiar el efecto de la dronedarona sobre diversos biomarcadores de estrés oxidativo y calcular un indicador global de estrés oxidativo (OXY-SCORE).

6.3 PLANTEAMIENTO

Para abordar los objetivos propuestos se planteó el siguiente diseño experimental:

Como animal de experimentación se seleccionó la rata genéticamente hipertensa (SHR) y la rata Wistar-Kyoto (WKY) como su control normotenso, escogiendo ratas macho de 10 meses de edad de ambas cepas. Las SHR se distribuyeron, de manera aleatoria, en dos grupos según recibieran dronedarona (100 mg/kg/24h, vía oral) durante 14 días, o placebo (suero fisiológico). Se utilizó como grupo control el constituido por ratas WKY a las que se les administró placebo (suero fisiológico), también durante 14 días. Se incluyeron 24 animales por grupo experimental. En esta tesis se han

combinado las técnicas de análisis de función y de estructura vascular que se relacionan a continuación:

a) Determinación de parámetros fisiológicos: Medición de presión arterial sistólica y frecuencia cardíaca.

b) Evaluación de la estructura arterial coronaria por técnicas histológicas microscópicas: El estudio histológico nos permitió determinar el diámetro interno y externo, el grosor de la pared, la relación grosor pared/diámetro interno y el área de sección de la arteria intramiocárdica ¹⁷. El estudio de microscopía confocal nos permitió analizar las variables anteriores así como la composición de la pared (capas media y adventicia) de la arteria coronaria descendente anterior ¹⁸.

c) Análisis de la función arterial coronaria: El miógrafo de alambre nos permitió estudiar la respuesta vasoconstrictora (5-HT) y vasodilatadora (Ach y NPS) de la arteria coronaria descendente anterior ^{17,18}.

d) Estudio de biomarcadores de estrés oxidativo: Para identificar los mecanismos implicados en el efecto de la dronedarona sobre la regresión del remodelado de las arterias coronarias se determinaron diversos biomarcadores de estrés oxidativo en plasma (carbonilos, capacidad antioxidante total, tioles, proteína tioladas, índice de proteínas tioladas, GSH y actividad de la SOD).

7 Material y Métodos

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 MATERIAL

7.1.1 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

En el presente estudio se utilizaron ratas macho adultas de 10 meses de edad, de las cepas: *Wistar Kyoto* (WKY) como ratas normotensas (WKY/NHsd, Laboratorio Harlan S.A. Castellar del Valles, Barcelona) y *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) como ratas hipertensas (SHR/NHsd, Laboratorio Harlan S.A. Castellar del Valles, Barcelona). Ambas cepas fueron criadas y estabuladas en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (nº de Registro EX/021-U) bajo condiciones ambientales controladas: temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad de 44-55% y ciclo de 12h de luz y 12h de oscuridad. La alimentación se realizó con pellets de pienso AO4 (PANLAB S.L.) y agua *ad libitum*.

Tanto la cría como manipulación de los animales se llevó a cabo siguiendo la normativa legal establecida por la Directiva 2010/63/UE y RD 53/2013 sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. La fase experimental se realizó en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (nº de Registro ES 280790000087) y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Los animalarios de ambos centros están incluidos 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). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEAA) y el Comité de Investigación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, así como por el Órgano habilitado y la Comunidad de Madrid (PROEX 223/14).

Se emplearon un total de 72 ratas distribuidas en tres grupos: WKY control normotenso, SHR control hipertenso y SHR tratada con dronedarona (SHR-D):

Grupos	WKY	SHR	SHR-D
Nº de animales	24	24	24

Tabla 2. Distribución del número de animales por grupos experimentales.

7.1.2 FÁRMACO

El fármaco seleccionado para estudio fue el hidrocloreuro de dronedarona (MULTAQ, Sanofi-Aventis Groupe, Francia), en forma de comprimidos de 400mg. La dosis administrada fue de 100mg/kg peso vía oral una dosis cada 24h. La duración del tratamiento fue de 14 días.

7.1.3 MATERIAL UTILIZADO EN EL ESTUDIO FISIOLÓGICO

- Balanza de tres barras (OHAUS, Florham Park, N.Y. 07932, U.S.A.) para el pesado de los animales pequeños.
- Estufa para animal pequeño (J&P Selecta S.A. Barcelona, España)
- Para la medición de la presión arterial y la frecuencia cardíaca se usó el pletismógrafo NIPREM 645 (CIBERTEC S.A., España). Dispone de una banda neumática y un detector de radiación infrarroja que transforma la señal térmica en eléctrica, la cual es registrada por un ordenador con el software NIPREM 1.5 para el análisis de los datos. Medición de la PAS mediante pletismografía (Fig. 7).

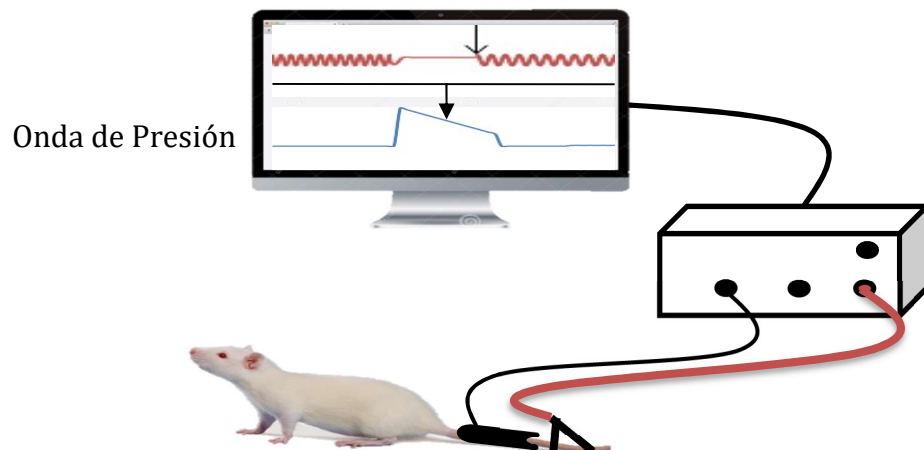


Figura 7. Medición de la presión arterial sistólica mediante pletismografía.

7.1.4 MATERIAL UTILIZADO EN EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA ARTERIAL

a) ESTUDIO HISTOLÓGICO

Equipos utilizados para el procesamiento histológico

- Baño termostático Selecta Mod Precisdig.
- Dispensador de parafina “Dispenser” para 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.
- DePeX (Gurr, England,Prod. 361254D).
- Portas (Menzel-Glaser 24 x 32 mm, 24 x 40 mm).
- Plantilla puntos-rayas con bordes de inclusión-exclusión, según diseño original de Gundersen y cols ¹⁶⁹.
- 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:

- Tampón formalina al 4%.
- Etanol 70°, 96° y 100° (absoluto).
- Acetato de butilo.
- Xilol.
- Parafina: Parafín M.P 55-58°C (Panreac, Ref. 256993)

Soluciones y reactivos utilizados para la tinción de Orceína:

- Orceína (Panreac, Cód. 261324. Cód. 251324.1604): 5 gr.
- Etanol 100°: 50 cc.
- Alcohol clorhídrico 1% (etanol 70% 1 L y Ácido clorhídrico 10 cc).

Soluciones y reactivos utilizados para la tinción de Rojo Sirio-

Ácido Pícrico:

- Rojo Sirio 0,5 gr.
- Ác. Pícrico.
- Solución saturada de Ác. Pícrico.
- Solución de trabajo: se mezcla Rojo Sirio 0,5 gr. en 100 ml de Ác. Pícrico saturado.

- Ác. clorhídrico 0,1 M (0,1 N).
- Batería para Hematoxilina-Eosina.

b) ESTUDIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL

- Marcador nuclear DAPI (1:500 de la solución 5 mg/mL, Life technologies).
- Citifluor (AF2, Aname, España).
- Microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), acoplado a un microscopio invertido con fuentes de láser argón y helio-neón.
- MetaMorph Image Analysis Software (Universal Imaging, Co., UK)

7.1.5 MATERIAL UTILIZADO EN EL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN ARTERIAL

- Fármacos: Acetilcolina (Ach), 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT) y nitroprusiato (NPS).
- Solución Krebs-Henseleit modificada.
- Material de disección para las arterias coronarias.
- Miógrafo de alambre myograph (Multi Myograph System, model 610M; Danish Myo-Technology) (Fig.8).

- Programa adquisición de datos: Powerlab (AD-Instruments, Castle Hill, Australia)



Figura 8. Foto del miógrafo de alambre usado y detalle del montaje de un segmento de arteria coronaria descendente anterior.

7.1.6 MATERIAL UTILIZADO EN EL ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Reactivos usados para el estudio del estrés oxidativo:

- Sal disódica del ácido batocuproinedisulfónico (BCS) Sigma-Aldrich B1125-1G
- Sulfato de cobre Sigma-Aldrich C-7631
- Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) Sigma-Aldrich 23,881-3
- 5,5-ditiobis (2-nitro ácido benzoico) (DNTB) Sigma-Aldrich D8130-1G

- L-Glutation reducido (GSH) G4251-300MG Sigma-Aldrich
- O-ftalaldehido (OPT) 9253 Fluka
- Guanidina Sigma-Aldrich G4505-100G
- Etanol Sigma-Aldrich 147559
- Acetato de etilo Sigma-Aldrich 324027
- Cloruro de vanadio Sigma-Aldrich 20,827-2
- Albúmina de suero de bovino (BSA) Sigma-Aldrich A7906-10G
- Reactivo de Bradford (colorante de azul Coomassie) Protein Assay 161-0700 Bio-Rad
- Tris base Roche 10708976001
- Ninhydrina Sigma-Aldrich 151173-10G
- N-etilmaleimida (NEM) E3876 Sigma-Aldrich
- Ácido tricloroacético (TCA) Sigma-Aldrich T6399-100G
- Ditioteitrol (DTT) D0632 Sigma-Aldrich
- Ácido iodoacético (IAA) Sigma-Aldrich 14386-10G
- Hidrindantina Fluka 53940-10G
- Dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma-Aldrich D8418-50ML
- Dinitrofenilhidrazina (DNPH) Sigma-Aldrich D199303-25G
- Hidróxido de sodio Sigma-Aldrich S5881-500G
- coelenterazina (CTZ) C3355 Sigma-Aldrich
- superóxidodismutasa (SOD) de bovino S9697 Sigma-Aldrich
- hipoxantina (Hx) S9697 Sigma-Aldrich
- Tritón (KPET) Sigma-Aldrich T8787-50ML

Equipos utilizados para el estudio del estrés oxidativo:

- Centrifuga MEDIFRIGE (P Selecta)
- Lector de placas multidetección Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc., Potton, UK)
- Baño maría (Unitronic 320 OR)
- Incubador IG150
- pH-metro XS pH 510 (EUTECH Instruments)
- Sistema de agua desionizada Ultra pure Water Milli-Q Plus (Millipore).

7.2 MÉTODOS

7.2.1 TRATAMIENTO

Se administró el fármaco (100 mg/kg) vía oral, mediante una sonda, una dosis diaria durante 14 días.

7.2.2 MÉTODO DEL ESTUDIO FISIOLÓGICO

Se midió la presión arterial no invasiva y la frecuencia cardiaca en el animal consciente. Previo a la toma de la PAS, se mantuvo a cada animal durante 20 min a 37°C sin humedad para producir la vasodilatación de las arterias caudales. Posteriormente se colocaron el manguito del esfigmomanómetro y la pinza-sensor en la cola del animal. La medición de la PAS se realizó por pletismografía (método no invasivo). Esta técnica puede ocasionar estrés en el animal, lo que podría resultar un sesgo en la recogida de datos, por lo que durante 3 días se realizaron 10 mediciones consecutivas en cada animal, escogiéndose las medidas del último día.

Transcurrido el periodo de tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante decapitación. Finalmente se extrajo el corazón para el estudio de la estructura y función arterial. Un grupo de animales se destinó para la obtención de sangre mediante punción intracardiaca para el estudio del estrés oxidativo.

7.2.3 MÉTODO DEL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA ARTERIAL

a) MÉTODO HISTOLÓGICO

Se emplearon 18 ratas: WKY (n=6), SHR (n=6), SHRD (n=6), para la realización del análisis morfométrico de las arterias intramiocárdicas (estructura y colágeno).

Tras extraer el corazón y fijar la pieza con formaldehído al 4%, se realizaron cortes transversales del ventrículo izquierdo desde el aparato subvalvular hasta el ápex. Cada corte 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, tras lo que se realizaron cortes histológicos seriados de 5 μm de grosor. Unos cortes se tiñeron con la tinción de orceína para el estudio de la estructura de las arterias intramiocárdicas y otros cortes con la tinción de rojo sirio para el estudio del colágeno vascular (capa adventicia).

Método de la tinción con Orceína:

Se desparafinó en la estufa a 60 °C y se pasó a Xilol. Posteriormente, se procedió a la hidratación de las preparaciones 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. Tras lo cual, 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 arteria intramiocárdica mediante el microscopio óptico Leica DMLB (objetivo 40x) equipado con la cámara digital Sony CCD IRIS.

La zona subepicárdica fue diferenciada microscópicamente de la intramiocárdica siguiendo el método descrito por Lunkenheimer y cols. ¹⁷⁰. Se localizó la rama intramiocárdica de la arteria obtusa marginal (rama de la arteria circunfleja). El análisis morfométrico de las arterias intramiocárdicas se realizó mediante el método de Gundersen y cols. ¹⁶⁹.

Se estudió el Diámetro Externo (DE, μm) y el Diámetro Interno (DI, μm) del vaso. A partir de estas medidas se determinaron las siguientes variables según estudios previos realizados por Yokoyama y cols. ¹⁷¹:

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

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

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

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

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

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

Método del Rojo Sirio:

Se desparafinó en la estufa a 60 °C, y se pasó a Xilol. A continuación, se procedió a la hidratación de las preparaciones en concentraciones decrecientes de alcoholes, con posterior lavado con agua destilada o agua corriente. Se colocaron los cortes en cámara oscura con unas gotas de la tinción de rojo de picrosirio durante 1 hora, tras la cual se lavaron en agua corriente. Se sumergió la muestra en ácido clorhídrico 0,1N y se lavó con agua corriente. Por último,

se tiñó la muestra con Hematoxilina, con posterior deshidratación en concentraciones crecientes de alcoholes hasta llegar a Xilol para montar las preparaciones con DePeX para estudio.

La tinción de las muestras con rojo de picrosirio permitió visualizar y cuantificar la cantidad de colágeno de la arteria intramiocárdica (capa adventicia) mediante el microscopio óptico Leica DMLB (objetivo 20x) equipado con la cámara digital Sony CCD IRIS. Se obtuvo la densidad de volumen (%) del colágeno (puntos en las zonas de la adventicia con polarización positiva / puntos totales en la capa adventicia) usando el método de Gundersen y cols¹⁶⁹.

b) MÉTODO DE MICROSCOPIA CONFOCAL

La microscopía confocal es un tipo de microscopio que utiliza la incidencia de luz polarizada sobre la muestra para estudiar la fluorescencia que ésta emite en un plano focal determinado.

Se emplearon 27 ratas: WKY (n=9), SHR (n= 9), SHR-D (n=9), para estudiar la estructura de la arteria descendente anterior izquierda mediante microscopía confocal.

Procesamiento arterial

Tras la disección de la arteria descendente anterior, se prepararon

segmentos de 1mm de longitud. El procesamiento del vaso se realizó siguiendo el método empleado en trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación ^{18,172}.

Inicialmente se fijaron los segmentos arteriales con paraformaldehído al 4%. De cada segmento se obtuvieron dos cortes transversales o anillos y el segmento restante se cortó longitudinalmente en dos partes iguales y se tiñó con el colorante nuclear DAPI (1:500 de una solución 5 mg/mL). Los segmentos longitudinales se lavaron durante 10 min en solución salina, posteriormente se sumergieron en la solución con DAPI durante 15 min y finalmente se realizaron dos lavados con solución salina de 10 min cada uno. Una vez completada la tinción, se procedió al montaje de los anillos y segmentos en portas usando Citifluor para su posterior estudio mediante microscopía confocal.

Visualización y cuantificación

Los segmentos longitudinales se montaron de la siguiente manera: uno con la capa adventicia hacia arriba para poder visualizarla y el otro con la capa endotelial hacia arriba para permitir el estudio de la capa media. Se analizaron 3 regiones por cada sección longitudinal y por arteria de forma aleatoria, visualizando cada una de ella mediante microscopio confocal con objetivo 20x y zoom 8, a la longitud de onda 405 nm excitación, 410-475 nm emisión. De cada región se capturaron las imágenes correspondientes a cortes seriados (de 1 μ m de grosor) de la adventicia (desde su parte externa hasta la primera célula de la zona media) y de la media (desde el endotelio hasta la primera célula de la

zona adventicia). De este modo se pudo determinar el grosor de ambas capas. Gracias a la tinción de los núcleos con el colorante DAPI se pudo realizar el conteo celular de cada una de las capas.

El análisis cuantitativo de la estructura del vaso se realizó con el software de análisis de imagen MetaMorph, descrito en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación ^{18, 172}.

Se cuantificaron los siguientes parámetros en los segmentos longitudinales del vaso:

- Grosor de las capas media y adventicia (μm): las células de la capa media (células musculares lisas o CML) se diferencian morfológicamente y por su disposición de las células de la capa adventicia. Teniendo en cuenta que la distancia entre secciones es de $1\mu\text{m}$, podemos establecer el grosor de ambas capas contando el número de planos en los que aparecen sus células correspondientes (área de conteo $8731,03\mu\text{m}^2$).
- Número de células y densidad de las mismas: se contó el número de núcleos correspondientes a cada capa presentes en las imágenes confocales seriadas. El resultado se expresó por milímetro de longitud, es decir, como densidad celular por capa (número de células/mm longitud capa, número células/mm³).

Los anillos arteriales (dos anillos por segmento y rata) fueron visualizados con el microscopio confocal, objetivo 20x, a la longitud de onda de 488 nm excitación, 515 nm emisión, capturándose una imagen de cada anillo. Esto permitió cuantificar el perímetro interno del vaso. Esta variable permitió

calcular el diámetro interno (DI, μm). El diámetro externo (DE, μm) se cuantificó sumando grosor de pared (GP μm , media + adventicia) y diámetro interno. Y ambos diámetros permitieron el cálculo del área del vaso (CSA μm^2 , media + adventicia).

7.2.4 MÉTODO DEL ESTUDIO DE LA FUNCIÓN ARTERIAL

Se emplearon 27 ratas: WKY (n=9), SHR (n=9), SHRD (n=9), para estudiar la función de la arteria descendente anterior izquierda mediante el miógrafo de alambre.

El método empleado para el estudio de la función arterial fue el realizado por nuestro grupo de investigación en estudios previos ¹⁷.

Los corazones se extrajeron inmediatamente tras la eutanasia de las ratas mediante decapitación. El corazón se mantuvo a 4°C en una solución oxigenada de Krebs-Henseleit (KHS) con la siguiente composición (en mmol/L): 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄·7H₂O, 2,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 11,1 glucosa, 0,01 Na₂EDTA, ajustada a pH 7,4. Se disecó la arteria coronaria descendente anterior izquierda bajo el microscopio. Eliminado el tejido circundante, la arteria fue seccionada en segmentos de aproximadamente 2mm de longitud. Dichos segmentos se montaron en un miógrafo de alambre conectado a un Sistema Powerlab de adquisición de datos y se mantuvieron en solución oxigenada KHS a 37°C. A continuación, se llevó a cabo el proceso de normalización de las arterias que permitió establecer el diámetro de luz efectivo

(0,9 L100), correspondiente al tono basal del vaso. 0,9 L100 es el diámetro interno del vaso en condiciones de máxima relajación y bajo una presión transmural de 100 mm Hg. Tras 30 minutos de estabilización para asegurar la integridad funcional de la arteria, se estimuló con una solución KHS con alto contenido de potasio (K+-KHS, 120 mmol/L).

Tras un periodo de estabilización, se procedió a la realización de las curvas dosis-respuesta de Ach (10^{-9} a 10^{-4} mol/l) en segmentos arteriales precontraídos con 5-HT (3×10^{-7} mol/l). La respuesta vasodilatadora se expresó como porcentaje de relajación respecto a la contracción máxima inducida por 5-HT en cada segmento. Posteriormente, tras un nuevo periodo de lavado de 30 minutos, se procedió a la realización de las curvas dosis-respuesta a 5-HT (10^{-9} a 3×10^{-5} mol/l). La respuesta vasoconstrictora a 5-HT se expresó como porcentaje de contracción en relación a la respuesta máxima de la arteria a K+-KHS. Por último, para estudiar la vasodilatación independiente de endotelio, se procedió a realizar curvas dosis-respuesta de nitroprusiato (NPS 10^{-9} a 10^{-4} mol/l) en segmentos precontraídos con 5-HT (3×10^{-7} mol/l) (Fig.9).

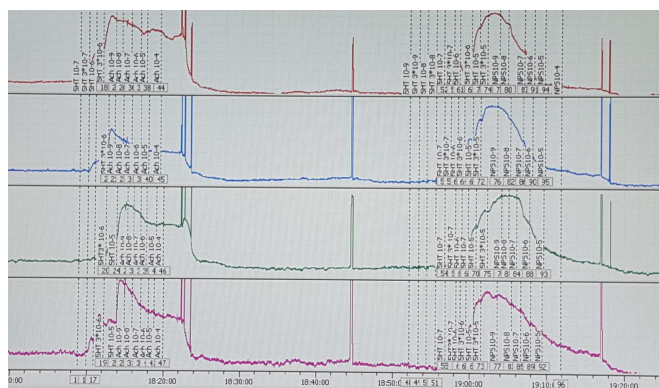


Figura 9. Ejemplo de las curvas obtenidas tras la contracción arterial al administrar dosis crecientes de serotonina.

7.2.5 MÉTODO DEL ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Se emplearon 27 ratas: WKY (n=9), SHR (n=9), SHRD (n=9), para el estudio del estrés oxidativo en el plasma.

a) Preparación del plasma:

Las muestras de sangre se sometieron a centrifugación a 900 g durante 10 minutos a 4°C. El plasma obtenido se almacenó a -80°C en alícuotas de 200 µL hasta su posterior uso.

b) Cuantificación de la capacidad antioxidante plasmática:

- Método CUPRAC-BCS:

Existen diferentes métodos, basados en la reducción del cobre, que son aptos para medir la capacidad antioxidante total (TAC) de fluidos biológicos. Estos métodos difieren entre sí en el tipo de quelante utilizado para formar un complejo con el cobre monovalente que absorbe luz entre 450-490 nm. En el método CUPRACBCS, los antioxidantes no enzimáticos presentes en la muestra reducen el Cu^{2+} a Cu^{+} ; el cobre monovalente forma un complejo con la sal disódica del ácido batocuproinedisulfónico (BCS) que absorbe luz a 490 nm.

Protocolo experimental:

El protocolo experimental, descrito por Campos y cols ¹⁷³, ha sido modificado con la dilución de la muestra de plasma directamente en tampón fosfato. La reacción se desarrolla en placa de 96 pocillos; en cada pocillo se mezclan 10 μ L de plasma y 190 μ L de tampón fosfato (10 mM, pH=7,4) conteniendo 0,25 mM de BCS. Tras un periodo de 10s, se mide la absorbancia inicial (A_i) del pocillo a 490 nm en un lector de placas. Posteriormente, se adiciona al pocillo 50 μ L de solución acuosa de CuSO_4 (0,5 mM) y se incuba la mezcla por un periodo adicional de 5 min a T^a ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese periodo, se vuelve a medir la absorbancia final (A_f) a 490 nm.

Cálculos:

Para el cálculo del valor TAC de cada muestra se emplea el valor de la diferencia entre A_f y A_i , así como la recta de regresión resultante de aplicar, el anterior protocolo, a concentraciones crecientes (0, 0,25, 0,50, 1, 1,5 y 2 mM) de un análogo de la vitamina E utilizado como referente de actividad antioxidante, el trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2- carboxílico). El valor TAC de cada muestra de plasma fue expresado en mmoles de trolox/L utilizando la recta estándar de trolox.

- Cuantificación de tioles totales en plasma:

Para este tipo de análisis se empleó el reactivo de Ellman [5,5-ditiobis (2-nitro ácido benzoico) o DNTB] utilizando placas de 96 pocillos. Los grupos tioles, presentes en las proteínas o en los compuestos de bajo peso molecular,

reaccionan con el DTNB que es reducido a tiol ácido 5- tionitrobenzoico (TNB), de color amarillo, que puede ser medido y cuantificado a 412 nm en un espectrofómetro UV/Vis.

Protocolo experimental:

El protocolo comienza con la adición a los pocillos de 10 μ L de plasma o de diluciones crecientes (0mM; 0,03125mM; 0,0625mM; 0,125mM; 0,25mM y 0,5mM) de glutatión reducido (GSH) para confeccionar la curva estándar. Como control negativo se incluyó un pocillo conteniendo 5 μ L de plasma y 100 μ L de tampón fosfato (100 mM, pH=7.4), con el objeto de corregir la contribución de las muestras de plasma al valor final de la absorbancia. Todos los pocillos, tanto los correspondientes a las muestras de plasma como los de la curva estándar o del control negativo, se realizaron por duplicado. A continuación, utilizando una micropipeta multicanal, se adicionó 100 μ L de DNTB (0,5 mM en tampón fosfato) a cada pocillo conteniendo las muestras o el GSH, pero no a los controles negativos. Se agitó la placa, protegida de la luz, en un agitador 3D durante 1 minuto y, seguidamente, se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. Al cabo de este tiempo, fue leída la absorbancia a 412 nm en un lector de placas Synergy HT™.

Cálculos:

El nivel de tioles totales se expresó en mM GSH/mg de proteína, valor que fue calculado a partir de la recta de calibrado del GSH y del contenido de proteína del plasma, medido según el micro-método de Bradford.

- Cuantificación de glutatión reducido (GSH):

El nivel de GSH se cuantificó empleando un método espectro-fluorimétrico, basado en la reacción específica entre el o-ftalaldehido (OPT) y el GSH, que produce una intensa señal de fluorescencia (Hissin, Hilf 1976 ¹⁷⁴).

Protocolo experimental:

Se mezclaron 10 μL de plasma con 12,5 μL de HPO_3 (25%) y 37 μL de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0). La mezcla se incubó a 4°C durante 10 minutos para favorecer la precipitación de proteínas plasmáticas. A continuación, se separó el sobrenadante mediante centrifugación a 2100 g x 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se hizo reaccionar en una placa multipocillo 10 μL del sobrenadante, convenientemente diluido, con 10 μL de OPT (0.1% p/v en metanol) y 180 μL de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0). Se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos y en ausencia de luz. La fluorescencia se midió en un lector de placa Synergy™ HT con λ excitación=360 \pm 40 nm y λ emisión= 460 \pm 40 nm y una sensibilidad de 75.

Cálculos:

La concentración de GSH (μg GSH/mg de proteína) se estimó a partir de la recta de calibrado de GSH preparado en el rango de 0-10 ng/ μL y del contenido de proteína del plasma (método de Bradford).

- Determinación de la actividad SOD mediante el método SOSA
(Superoxide Anion Scavenging Activity):

El método SOSA mide la capacidad de los antioxidantes presentes en una muestra de eliminar anión superóxido. Para ello, se usa la coelenterazina (CTZ) como sonda de detección de anión superóxido. La CTZ es oxidada para producir un anión excitado, la coelenteramida (CTA), que emite luz azul. La inhibición de la luminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de antioxidantes que contiene la muestra (Saleh, Plieth 2010 ¹⁷⁵).

Protocolo experimental:

En primer lugar se adicionó la muestra/blanco/SOD seguido por la adición de la sonda de luminiscencia (CTZ), xantina oxidasa y finalmente el sustrato hipoxantina (Hx). Tras 30 segundos de reacción a temperatura ambiente, se midió la señal de luminiscencia (luminómetro de placa GloMax). La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato 100 mM, pH=7.4 (KPP), el cual se usó para disolver la SOD, diluir la muestra y la sonda de luminiscencia. Para disolver la xantina oxidasa y la hipoxantina se usó 0.1mM EGTA en KPP y 0.4 % v/v Tritón (KPET).

Cálculos:

Los valores de luminiscencia de las muestras/SOD se convirtieron a valores de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de luminiscencia} = 1 - \text{Luminiscencia}_{\text{muestra/SOD}} / \text{Luminiscencia}_{\text{blanco}}$$

El valor de la SOSA se estimó a partir de la recta de calibrado de SOD (inhibición de luminiscencia frente log SOD) y se expresó en mU SOD/mg de

proteína. El contenido de proteína de las muestras se midió mediante el método de Bradford.

- Determinación del contenido de proteínas plasmáticas:

Se empleó el método de Bradford siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. De este modo, se hicieron reaccionar 10 μL de la muestra diluida con 200 μL del reactivo de Bradford (colorante de azul Coomassie, Bio-Rad, España) diluido 5 veces. Tras 5 minutos de reacción, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Biotek, Rochester, VT, USA). La concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en la muestra se estimó a partir de la recta de calibración con concentraciones crecientes (rango 0,1-0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de albumina de suero bovino (BSA).

c) Determinación de actividad oxidante del plasma (de forma indirecta)

- Determinación de proteínas tioladas:

Para el análisis de la concentración de proteínas tioladas se usó el método descrito por D. Giustarini y cols ^{176,177}, que se basa en la detección de las proteínas tioladas mediante un método de espectrofotometría por unión al reactivo ninhydrina, que emite a una determinada longitud de onda.

Protocolo experimental:

Para ello, se mezclaron 30µl de plasma con 30µl de N-etilmaleimida (NEM) 4mM. Tras 2 minutos se acidificó la mezcla con 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 6%. A continuación, se procedió a una centrifugación 1000g a 4°C durante otros 2 minutos, seguido de un lavado del pellet con TCA 6% 3 veces. El pellet de proteína se resuspendió usando 100 µl de tampón fosfato 0,1M y pH=7,4 y 2 µl de ditioneitol (DTT) 50mM. Tras 20 minutos de agitación, se añadieron 20 µl de ácido iodoacético (IAA) y se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se desproteinizó la muestra mediante tratamiento con 6 µl de TCA 60% y se centrifugó a 10000g a 4°C durante 2min. Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron con tampón acetato 2,5M pH=5,5 y el reactivo de ninhidrina preparado previamente (0,032g de ninhidrina + 0,0048g de hidrindantina + 0,6ml dimetilsulfóxido (DMSO) + 0,4ml de tampón 2,5M). Las muestras se calentaron a 100°C durante 10 min y fueron analizadas mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 570nm.

- Determinación del índice de proteínas tioladas:

El índice de proteínas tioladas es la relación molar entre la concentración de proteínas tioladas respecto a la concentración de tioles libres en plasma. Es decir, elemento asociado a oxidación / elemento asociado a la capacidad antioxidante ^{176,177}.

- Cuantificación de carbonilos:

La cuantificación de carbonilos se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Mesquita et al ¹⁷⁸.

Protocolo experimental:

Se mezclaron 30 µl de plasma con 30 µl de dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10mM en ácido clorhídrico (HCl) 2,5M. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se añadieron 15 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 6M y se procedió a su agitación para disolver la proteína. 10 min después, se analizó la muestra mediante espectrofotometría con una longitud de onda de excitación de 450nm.

d) Determinación del parámetro OXY-SCORE:

El Oxy-Score es un indicador integral que tiene en cuenta la naturaleza multifactorial del estrés oxidativo. El OXY-SCORE se ha calculado teniendo en cuenta biomarcadores de defensa antioxidantes determinados en el plasma (SOD, GSH, tioles y TAC) y biomarcador de daño oxidativo (carbonilos), de acuerdo con la metodología previamente descrita (Veglia et al. 2010 ¹⁷⁹).

$$Oxy - Score = \Sigma \text{ antioxidantes} - \text{daño oxidativo}$$

Protocolo experimental:

Tras analizar la normalidad de los biomarcadores mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, aquellos que no siguieron una distribución normal se normalizaron mediante una transformación logarítmica. La normalidad de los parámetros transformados se constató mediante el análisis estadístico

Kolmogorov-Smirnov. Al ser parámetros con distintas unidades, se tuvo que proceder a una estandarización para poder realizar el sumatorio. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$Z_{ij} = X_{ij} - \mu_j \sigma_j$$

Donde: Z_{ij} es el valor estandarizado del parámetro j del sujeto experimental i ; X_{ij} es el valor del parámetro j original o normalizado mediante transformación logarítmica; μ_j es el promedio del parámetro j y σ_j es la desviación estándar del parámetro j en los sujetos control.

El Σ antioxidantes se obtuvo a partir del promedio de los parámetros individuales. Así, se calculó el Oxy-Score para cada grupo experimental, expresándolo como el valor promedio \pm SEM.

Un Oxy-Score positivo indica una preponderancia de la capacidad antioxidante frente a la oxidante. Mientras que un Oxy-Score negativo se traduce como un predominio de daño oxidativo.

7.2.6 MÉTODO ESTADÍSTICO

Tamaño muestral:

Por razones propias del modelo experimental, se decidió incluir un total de 72 ratas en una proporción 1:2 control/problema y de esta manera se aseguró tener un mínimo de 24 ejemplares por grupo a estudiar.

Estadística descriptiva:

Para las variables cuantitativas continuas se calculó la media como medida de tendencia central y el error estándar de la media, como medida de dispersión.

Estadística inferencial:

En el caso de las variables continuas se analizó, en primer lugar, si la variable seguía una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov). En caso afirmativo, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) y, en caso negativo, se procedió a la transformación de las variables para buscar la normalidad de las mismas. En aquellos supuestos donde no hubo distribución normal se utilizaron los test no-paramétricos. El ANOVA de medidas repetidas se aplicó para estudiar si existían diferencias significativas en los parámetros de función vascular (curvas dosis-respuesta de Ach, 5-HT y NPS) intragrupo e intergrupo. El ANOVA seguido del test post-hoc de Bonferroni fue utilizado para estudiar si existían diferencias significativas entre los tres grupos de estudio en lo que respecta a los parámetros fisiológicos, estructurales (microscopía óptica y microscopía confocal) y de estrés oxidativo analizados. Para comparar la respuesta vasoconstrictora a la 5-HT y vasodilatadora a la Ach de los segmentos de arteria coronaria descendente anterior entre los tres grupos de estudio, algunos resultados fueron expresados como área bajo la curva dosis-respuesta (AUC).

Los valores se expresaron como media \pm error estándar de la media. 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 $(1 - \beta) = 80\%$.

Todos los datos obtenidos fueron introducidos y analizados con el paquete estadístico SPSS 20.0 (IBM Corp, Armonk, New York, USA) para Windows y S-PLUS 6.1.

8 *Resultados*

8. RESULTADOS

8.1 EFECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE LA RATA

El peso de los animales, la frecuencia cardiaca y la presión arterial sistólica aparecen recogidos en la Tabla 3.

El peso de las ratas WKY fue significativamente superior al de los grupos SHR y SHR-D. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en este parámetro entre los grupos SHR y SHR-D.

Las ratas SHR y WKY presentaron valores similares de frecuencia cardíaca (FC), sin embargo las tratadas con dronedarona mostraron una FC significativamente inferior a la observada en los otros dos grupos no tratados.

Las ratas SHR de 10 meses de edad utilizadas en el presente estudio mostraron una elevación significativa de la presión arterial sistólica (PAS) con respecto a las ratas WKY de la misma edad. La dronedarona redujo significativamente la misma con respecto a su grupo control SHR. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en este parámetro entre los grupos SHR-D y WKY.

	WKY (n=9)	SHR (n=9)	SHR-D (n=9)	Valor P ANOVA
Peso (g)	431.40 ± 3.21	381.63 ± 7.21 ^{**}	360.16 ± 3.41 ^{***}	<0.001
Frc (lat/min)	410 ± 10	397 ± 26	271 ± 31 ^{***,++}	<0.001
PAS (mmHg)	128 ± 12	179 ± 21 ^{**}	140 ± 11 ⁺⁺	<0.001

Tabla 3. Peso, frecuencia cardiaca y presión arterial de los tres grupos. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 vs. WKY; ++p<0.01 y +++p<0.001 vs. SHR. Valores se presentan como media ± SEM.

8.2 EFECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA ARTERIA CORONARIA

8.2.1 ALTERACIONES EN LA ESTRUCTURA DE LA ARTERIA INTRAMIOCÁRDICA

Los resultados correspondientes al estudio histológico de las arterias intramiocárdicas (rama intramiocárdica de la arteria obtusa marginal) se muestran en las Figuras 10 y 11.

En la Figura 10 podemos observar los parámetros que definen la geometría del vaso intramiocárdico, obtenidos mediante microscopía óptica:

Los diámetros externo (DE) e interno (DI) de la arteria fueron significativamente menores en la rata WKY que en las ratas SHR y SHR-D. La administración de dronedarona produjo una disminución significativa del DE en el grupo SHR-D respecto al grupo SHR control (Fig. 10A). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el DI entre los grupos SHR-D y SHR (Fig.10B).

Si analizamos las Figuras 10C y 10D, se constata un mayor grosor de pared (GP) así como una mayor área de la sección de corte (CSA) arterial en el grupo SHR respecto al grupo WKY. La administración de dronedarona produjo una disminución de ambos parámetros respecto al grupo SHR. Los valores de GP y CSA en el grupo SHR-D fueron totalmente superponibles a los obtenidos en el grupo WKY.

La Figura 10E muestra los resultados de la relación entre el grosor de la pared y el diámetro interno del vaso. No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados.

La Figura 10F muestra una mayor densidad de volumen del colágeno (DV) en las ratas SHR respecto a las WKY. La administración de dronedarona produjo una disminución de este parámetro con respecto a las ratas SHR control. El valor de DV del colágeno obtenido en el grupo SHR-D fue totalmente superponible al obtenido en el grupo WKY.

En la Figura 11 podemos observar cortes histológicos representativos de la arteria intramiocárdica del ventrículo izquierdo de cada uno de los grupos del

estudio, preparados mediante tinción con orceína y visualizados mediante microscopía óptica. En dichas imágenes podemos observar cambios previamente descritos: reducción del GP del grupo SHR-D respecto al grupo SHR control, siendo similar dicho parámetro en las ratas SHR-D y WKY.

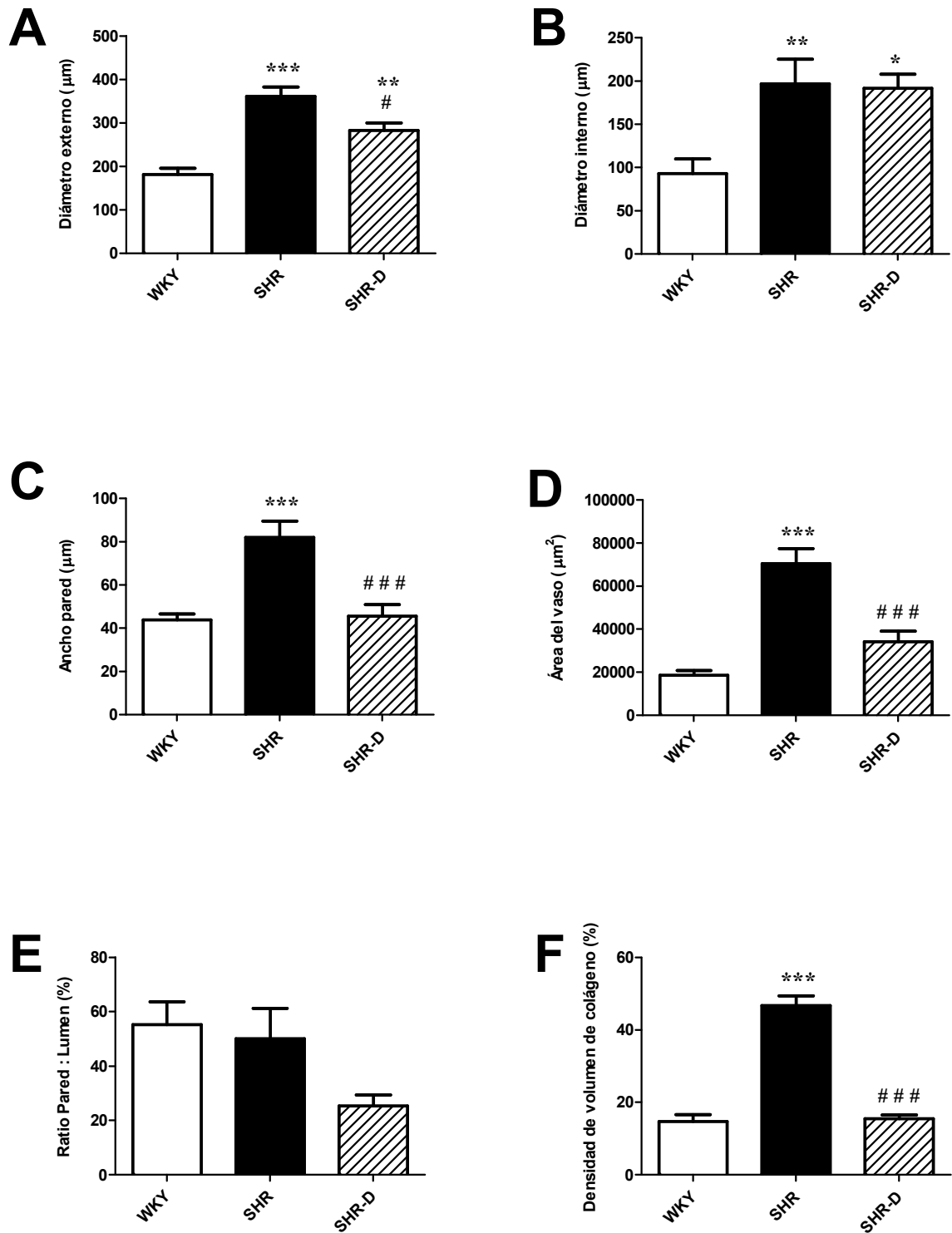


Figura 10. Análisis histológico de diversos parámetros estructurales de la arteria intramiocárdica (de la arteria obtusa marginal) del ventrículo izquierdo de rata. A) Diámetro externo, B) Diámetro interno, C) Grosor de pared, D) Área de la sección de corte arterial, E) Relación entre el grosor de la pared y el diámetro interno (lumen) del vaso y F) Densidad de volumen del colágeno. Los parámetros fueron analizados en tres grupos de ratas: normotensas (WKY), hipertensas no tratadas (SHR) e hipertensas tratadas con dronedarona (SHR-D). Los datos representan la media \pm SEM de 7 animales por grupo. □ p < 0,05, ◻◻ p < 0,01 y ◻◻◻ p < 0,01 vs. WKY; # p < 0,05, ## p < 0,01 y ### p < 0,001 vs. SHR.

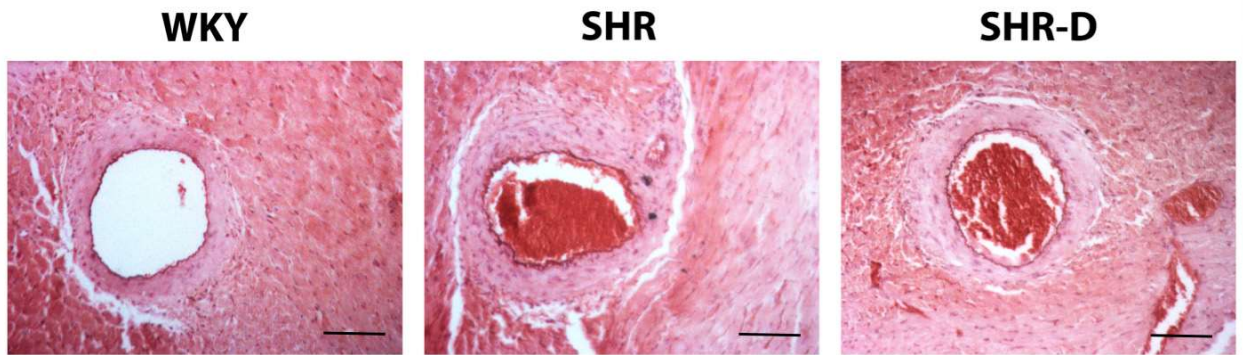


Figura 11. Cortes histológicos representativos de la arteria intramiocárdica del ventrículo izquierdo de una rata normotensa (WKY) y de dos ratas hipertensas, una de ellas recibió placebo (SHR) y la otra dronedarona (SHR-D). Tinción con Orceína, objetivo 10x (10 micras).

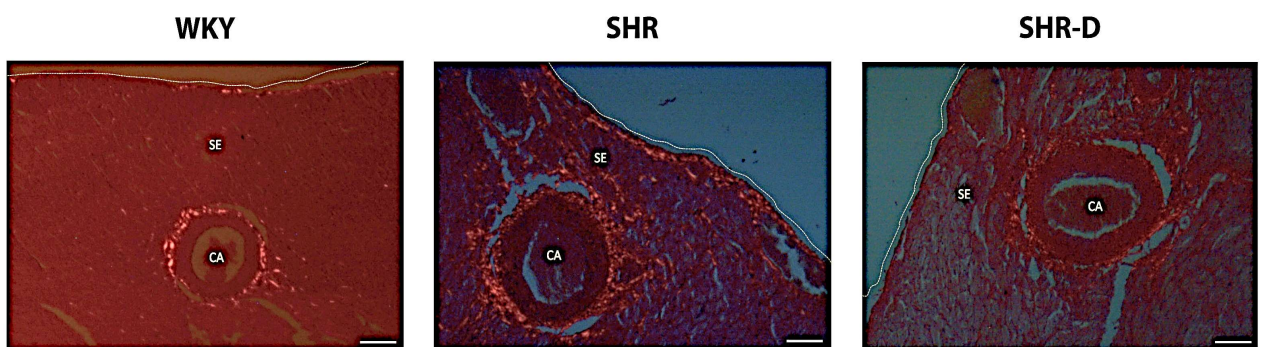


Figura 12. Cortes histológicos representativos de la arteria intramiocárdica del ventrículo izquierdo de una rata normotensa (WKY) y de dos ratas hipertensas, una de ellas recibió placebo (SHR) y la otra dronedarona (SHR-D). Se muestra la densidad de colágeno mediante tinción Rojo Sirio, objetivo 4x (100 micras). SE: subepicardio. CA: arteria coronaria.

8.2.2 CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LA ARTERIA CORONARIA DESCENDENTE ANTERIOR

Cambios en la geometría de la arteria descendente anterior

La Figura 13 muestra los cambios en la estructura de la arteria descendente anterior (DA) observados mediante microscopía confocal.

El DE de la DA fue significativamente mayor en la rata SHR con respecto a la rata WKY, sin embargo, la administración de dronedarona produjo una disminución significativa de dicho parámetro. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el DE entre los grupos WKY y SHR-D (Fig. 13A).

El DI de la DA fue significativamente mayor en la SHR con respecto al grupo WKY. No encontramos diferencias significativas entre los grupos SHR y SHR-D (Fig.13B).

El GP y CSA (media + adventicia) de la DA fueron significativamente mayores en el grupo SHR con respecto al grupo WKY, sin embargo, la administración de dronedarona produjo una disminución significativa de ambos parámetros en el grupo SHR-D con respecto a al grupo SHR (Fig.13C y D). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre CSA entre los grupos WKY y SHR-D.

La Figura 13E muestra la relación GP/DI de la DA en los tres grupos de ratas. El valor obtenido fue similar en las ratas WKY y SHR, reduciéndose en las ratas tratadas con dronedarona con respecto al grupo control normotenso. No encontramos diferencias significativas en la relación GP/DI entre los grupos SHR y SHR-D.

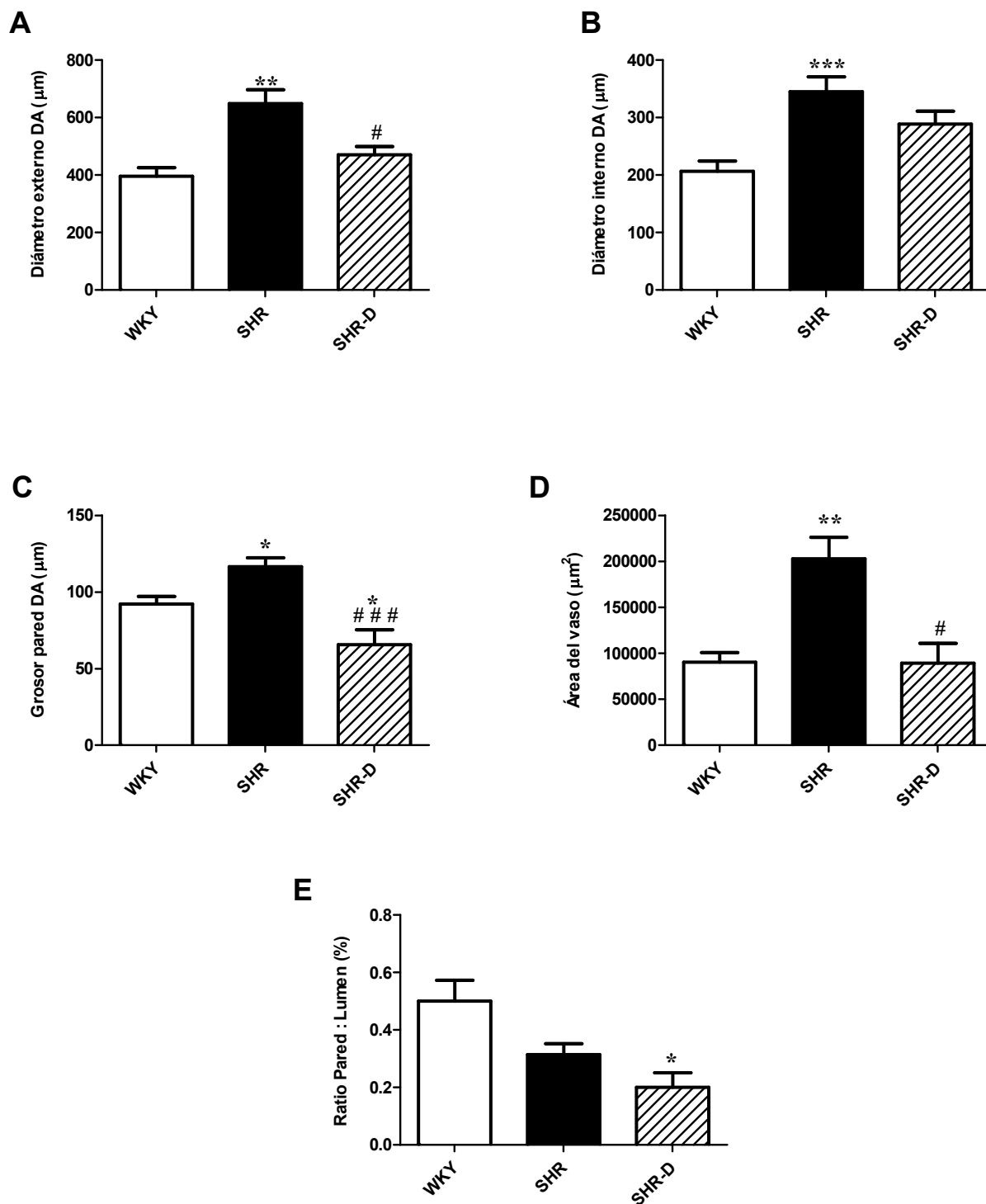


Figura 13. Valores medidos por microscopía confocal de la arteria coronaria descendente anterior de WKY, SHR y SHR-D. A) Diámetro externo B) Diámetro interno C) Grosor de la pared D) Área del vaso E) Ratio Pared/Lumen. Los datos representan la media \pm SEM de 9 animales por grupo. □ $p < 0,05$, ◻◻ $p < 0,01$ y ◻◻◻ $p < 0,001$ vs.WKY; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ vs. SHR.

Cambios en la estructura de la capa media de la arteria descendente anterior

Las Figuras 14, 15 y 16 muestran los cambios en la estructura de la capa media o muscular de la DA observados mediante microscopía confocal.

En las figuras 15A, 15B y 15C se muestra el GP, número de células y densidad celular de la capa media o muscular de la DA en los tres grupos, obtenidos mediante cortes longitudinales de segmentos de la DA capturados mediante microscopía confocal:

El GP de la capa media arterial fue significativamente mayor en las ratas SHR con respecto a las WKY. La administración de dronedarona produjo una disminución significativa de dicho parámetro en las SHR-D. De hecho, la reducción fue de tal magnitud que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el GP entre los grupos WKY y SHR-D (Fig. 15A).

La Figura 16 muestra imágenes confocales representativas de las proyecciones de los núcleos celulares presentes en la capa media de la DA de las ratas WKY, SHR y SHR-D. Estas imágenes se obtuvieron a partir de cortes longitudinales del segmento arterial que fueron teñidos con el colorante nuclear 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Tras el análisis de imágenes consecutivas correspondientes a planos contiguos (Stacks) de la capa media se pudo determinar el número de células existentes en dicha capa arterial. En dicha

figura, se aprecia que las ratas WKY presentan un número de células en la capa media significativamente menor que el encontrado en las SHR no tratadas. El tratamiento con dronedarona redujo significativamente el recuento celular hasta valores indistinguibles de los observados en ratas WKY.

Por último, no se observaron diferencias significativas en la densidad celular, entre los tres grupos de ratas de estudio (Fig.15C).

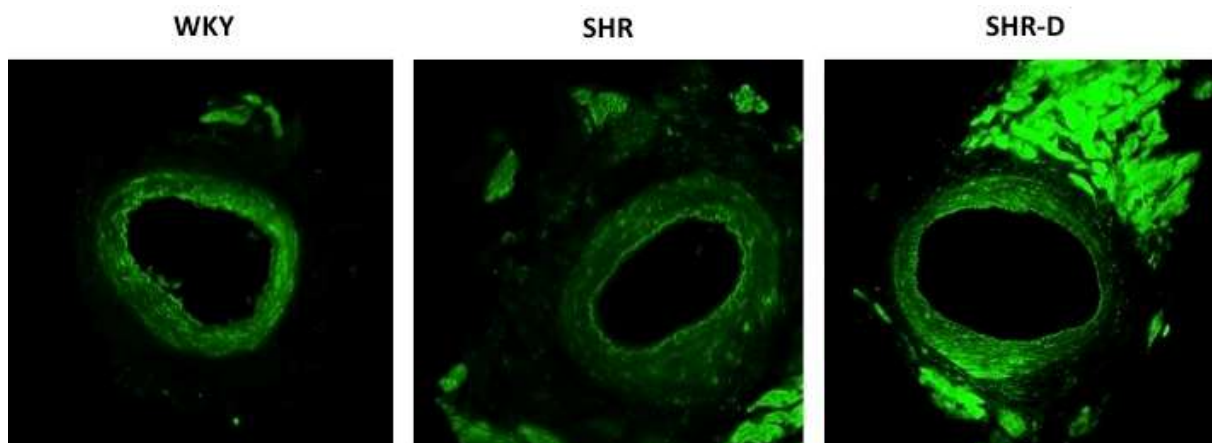


Figura 14. Imágenes representativas de cortes transversales de la arteria coronaria descendente anterior de una rata normotensa (WKY) y dos ratas hipertensas, una de ellas recibió placebo (SHR) y la otra dronedarona (SHR-D). Microscopía confocal, 20x.

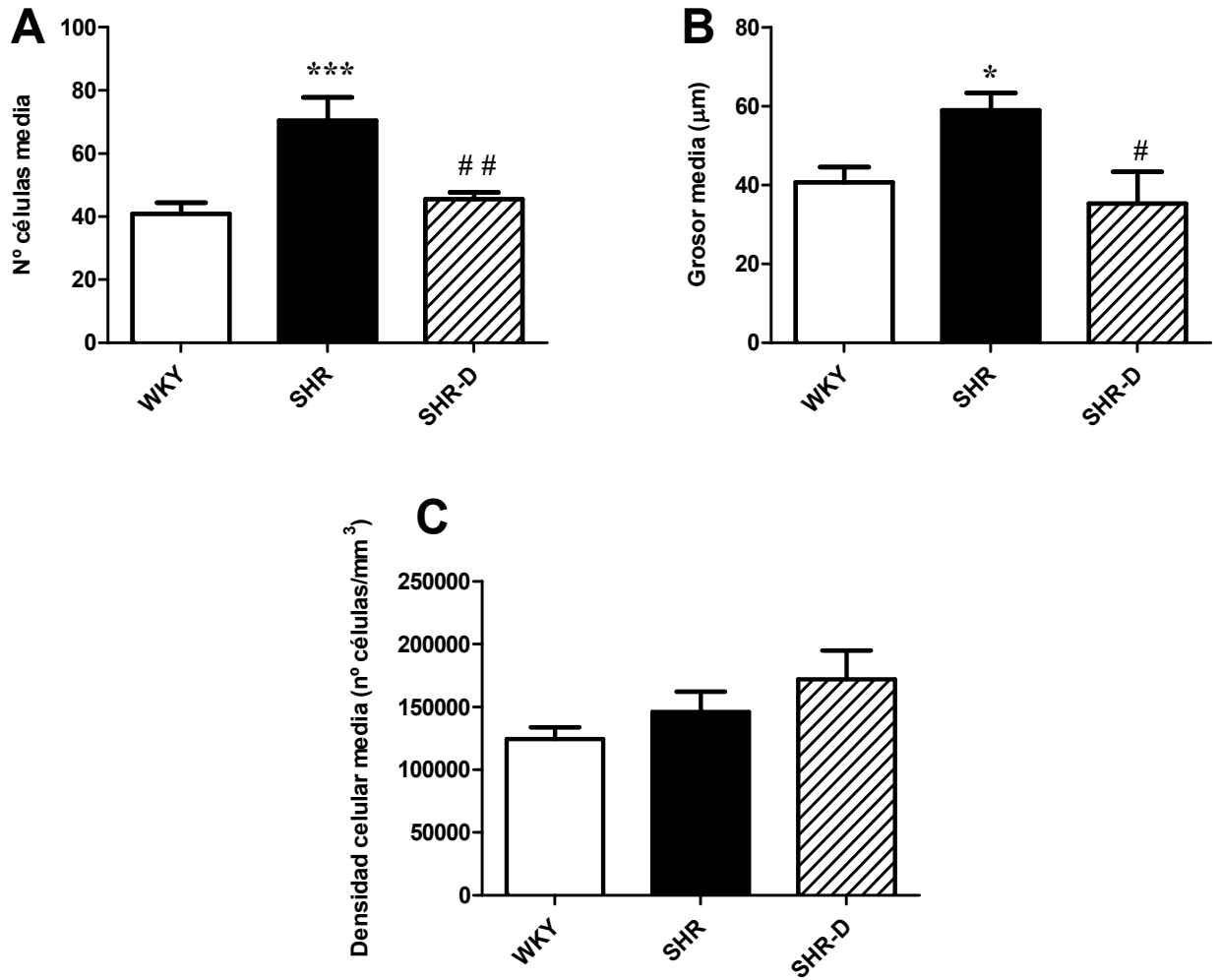


Figura 15. Valores medidos por microscopía confocal en la capa media (o muscular) de la arteria coronaria descendente anterior de WKY, SHR y SHR-D. A) Número de células de la capa media, B) grosor de la capa media y C) densidad celular de la capa media. Los datos representan la media \pm SEM de 7 animales por grupo. \square $p < 0,05$, $\square\square$ $p < 0,01$ y $\square\square\square$ $p < 0,001$ vs. WKY; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ respecto a SHR.

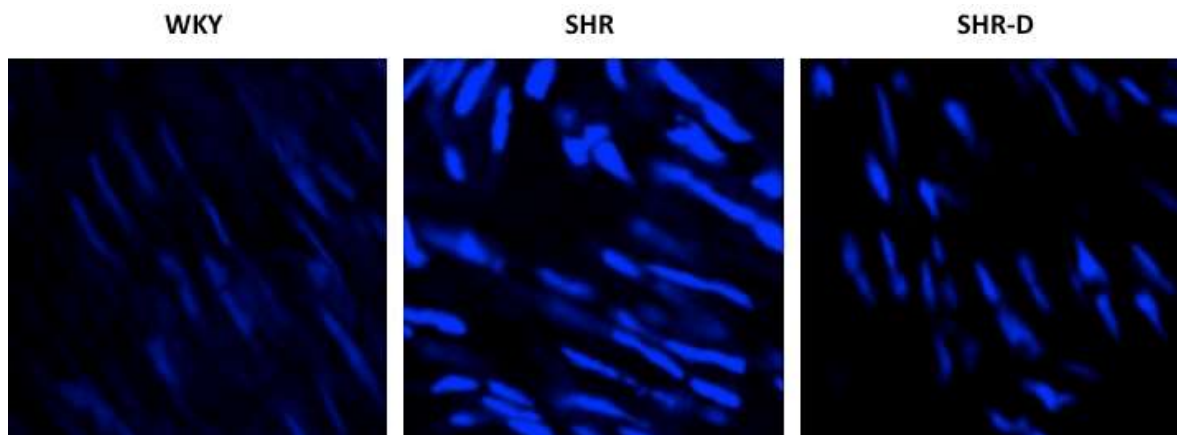


Figura 16. Imágenes representativas de los núcleos celulares de la capa media de la arteria coronaria descendente anterior de una rata normotensa (WKY) y dos ratas hipertensas, una tratada con placebo (SHR) y la otra con dronedarona (SHR-D). Microscopía confocal, tinción DAPI, x20z8.

Cambios en la estructura de la capa adventicia de la arteria descendente anterior

Las Figuras 17 y 18 muestran los cambios en la estructura de la adventicia de la DA observados mediante microscopía confocal.

En las Figuras 17A, 17B y 17C se muestra el GP, número de células y densidad celular de la capa adventicia de la DA en los tres grupos, obtenidos mediante cortes longitudinales de segmentos de la DA capturados mediante microscopía confocal:

El GP de la capa adventicia arterial fue significativamente menor en el grupo tratado con dronedarona con respecto a los otros dos grupos (WKY y SHR) (Fig.17A).

La Figura 18 muestra imágenes confocales representativas de las proyecciones de los núcleos celulares presentes en la capa adventicia de la DA de las ratas WKY, SHR y SHR-D. En dicha figura, se aprecia que las ratas WKY presentan un número de células en la capa adventicia significativamente menor que el encontrado en las SHR no tratadas. El tratamiento con dronedarona redujo significativamente el recuento celular hasta valores indistinguibles de los observados en ratas WKY.

Por último, la densidad celular fue significativamente mayor en el grupo de las ratas tratadas con dronedarona con respecto a los otros dos grupos de estudio (WKY y SHR) (Fig.17C).

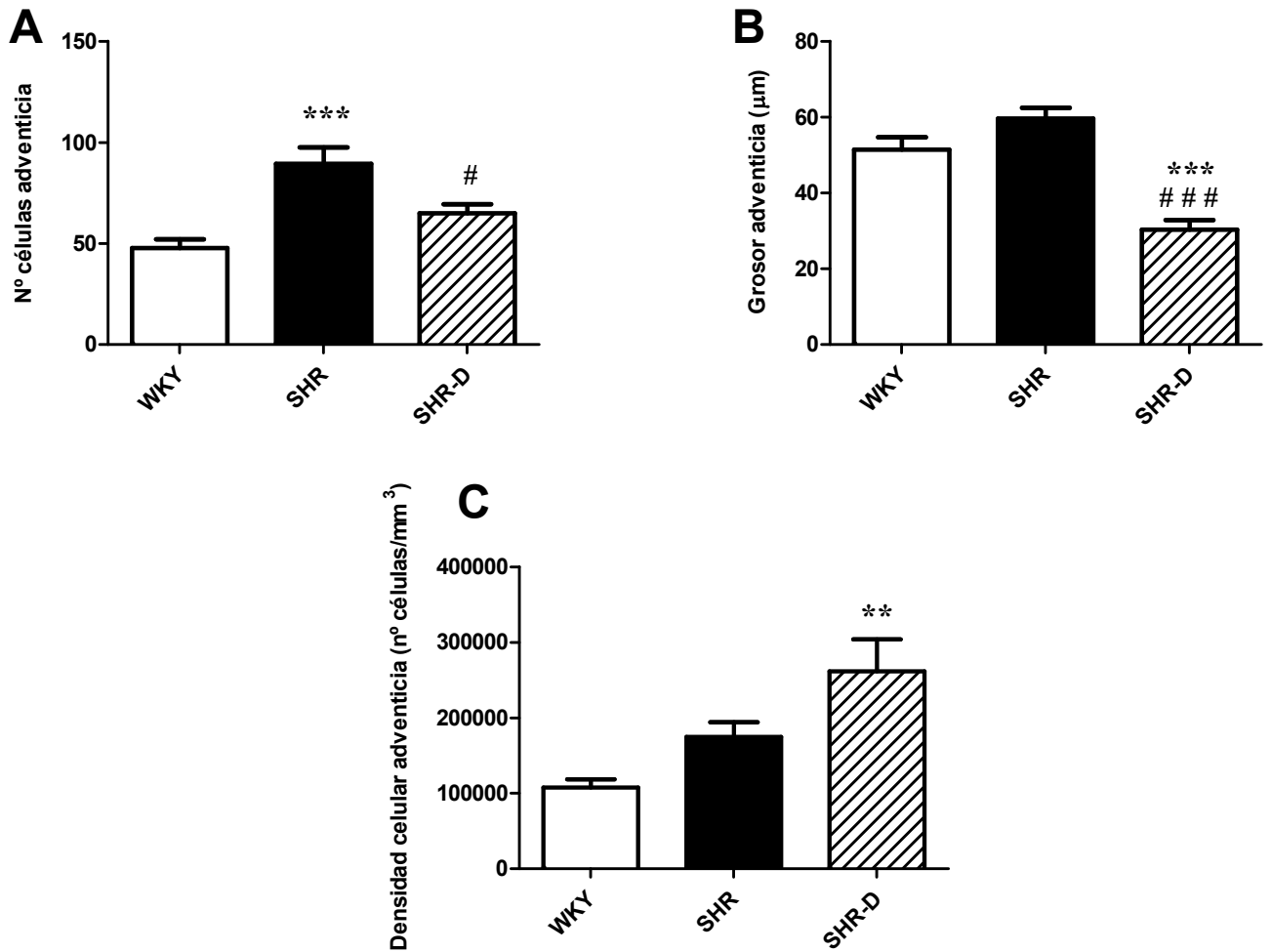


Figura 17. Valores medidos por microscopía confocal en la capa adventicia de la arteria coronaria descendente anterior de WKY, SHR y SHR-D. A) Número de células de la capa adventicia, B) grosor de la capa adventicia y C) densidad celular de la capa adventicia. Los datos representan la media \pm SEM de 7 animales por grupo. □ $p < 0,05$, □□ $p < 0,01$ y □□□ $p < 0,001$ vs. WKY; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ vs. SHR.

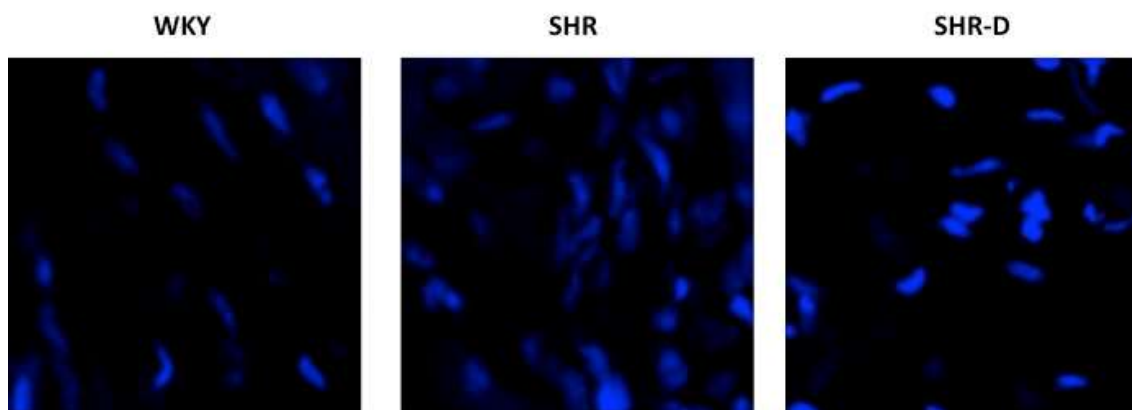


Figura 18. Imágenes representativas de los núcleos celulares de la capa adventicia de la arteria coronaria descendente anterior de una rata normotensa (WKY) y dos ratas hipertensas, una tratada con placebo (SHR) y la otra con dronedarona (SHR-D). Microscopía confocal, tinción DAPI, x20z8.

8.3 EFECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR DE LA ARTERIA CORONARIA

El estudio funcional de la arteria coronaria descendente anterior, tanto en lo que afecta a su capacidad vasodilatadora como vasoconstrictora en respuesta a distintos fármacos, se llevó a cabo utilizando un miógrafo de alambre, tal como se especifica en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

8.3.1 RESPUESTA VASODILATADORA DE LA ARTERIA CORONARIA

La respuesta vasodilatadora de la arteria coronaria se estudió mediante la curva dosis-respuesta obtenida con concentraciones crecientes de acetilcolina

(Ach, 10^{-9} a 10^{-4} mol/l) y nitroprusiato (NPS, 10^{-9} a 10^{-4} mol/l) en segmentos precontraídos con 5HT (3×10^{-7} mol/l).

La respuesta de la arteria a Ach nos muestra la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio (Fig.19). Se pudo observar una menor capacidad vasodilatadora de la DA en el grupo SHR respecto a WKY para todas las concentraciones. Tras tratamiento con dronedarona, se constató una mejora de la respuesta vasodilatadora en SHR-D respecto a SHR y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre SHR-D y WKY. El área bajo la curva (AUC) vasodilatación-respuesta mediada por Ach fue significativamente mayor en las ratas WKY que en las SHR sin tratar ($215,5 \pm 16$ vs $65,8 \pm 9$; $p < 0,00000002$), así como en las SHR-D respecto a las SHR ($156,2 \pm 25$ vs. $65,8 \pm 25$, $p = 0,001$) (Fig.20). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el AUC entre las ratas SHR-D y WKY ($p = 0.062$).

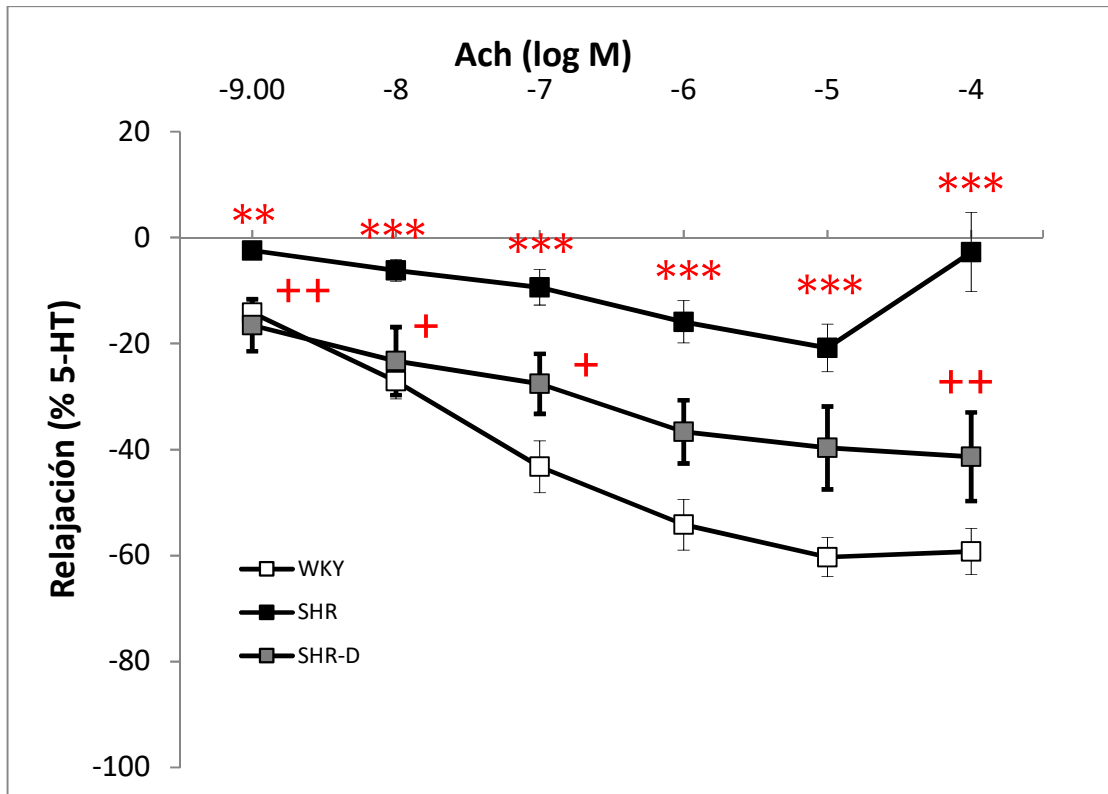


Figura 19. Respuesta vasodilatadora de la arteria coronaria descendente anterior (DA) a concentraciones crecientes de Ach en WKY, SHR y SHR-D, en segmentos precontraídos con 5HT. La vasodilatación inducida por cada concentración de Ach fue expresada como porcentaje de la respuesta máxima de la arteria a una concentración dada de 5HT. Los valores representan media \pm SEM de 5 ratas por grupo. *p < 0,05 ; **p < 0,01 y ***p < 0,001 vs. WKY +p < 0,05 ; ++p < 0,01 vs.SHR.

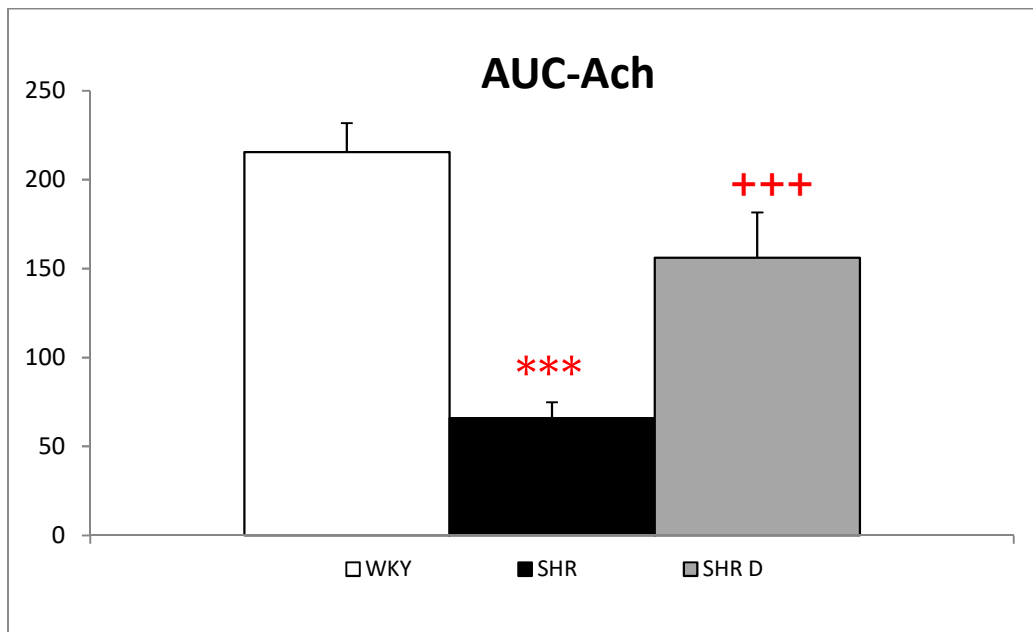


Figura 20. Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de Ach en los tres grupos experimentales.***p < 0,001 vs. WKY; ++p < 0,01 vs. SHR.

La respuesta vasodilatadora de la DA a dosis crecientes de NPS nos muestra la vasodilatación no dependiente de endotelio (Fig.21). No se encontraron diferencias significativas en este tipo de respuesta vasodilatadora entre los tres grupos de ratas ($AUC_{WKY} = 232,3 \pm 19$; $AUC_{SHR} = 228,3 \pm 23$; $AUC_{SHR-D} = 297,4 \pm 29$) (Fig. 22).

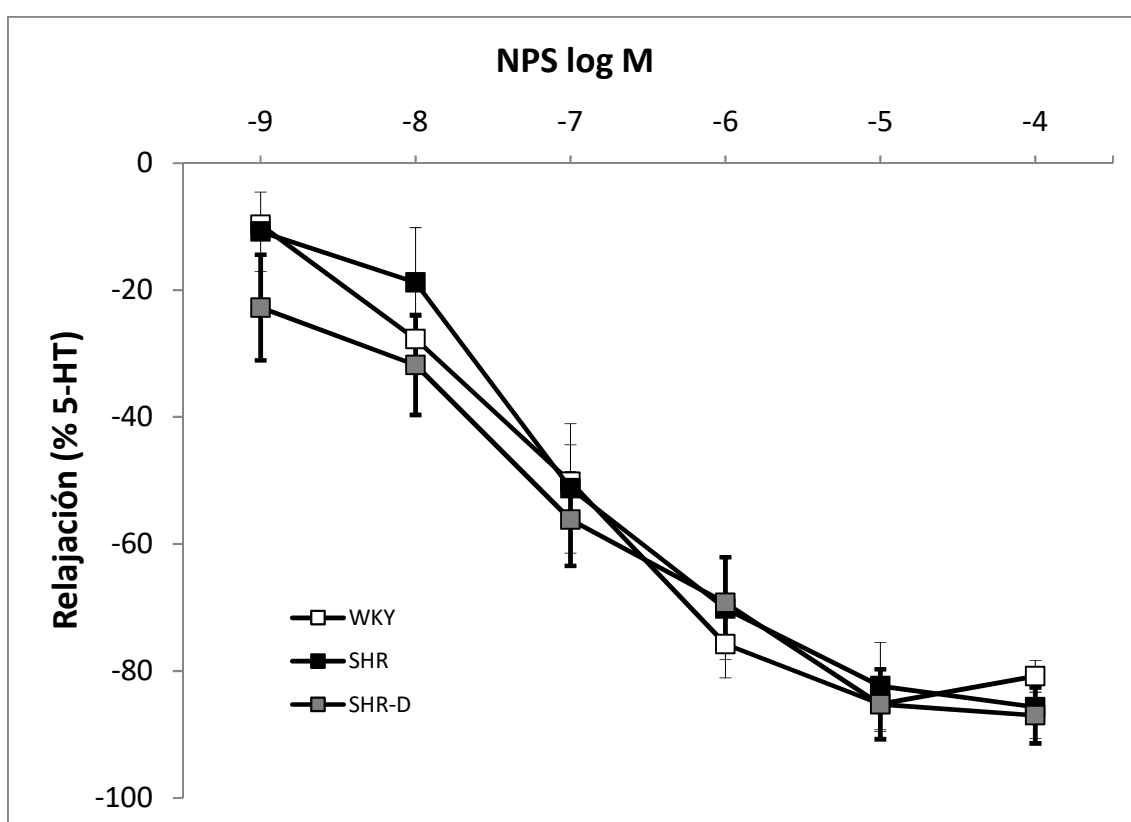


Figura 21. Respuesta vasodilatadora de la arteria coronaria descendente anterior (DA) a concentraciones crecientes de NPS en WKY, SHR y SHR-D, en segmentos precontraídos con 5HT. La vasodilatación inducida por cada concentración de NPS fue expresada como porcentaje de la respuesta máxima de la arteria a una concentración dada de 5HT. Los valores representan media \pm SEM de 5 ratas por grupo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

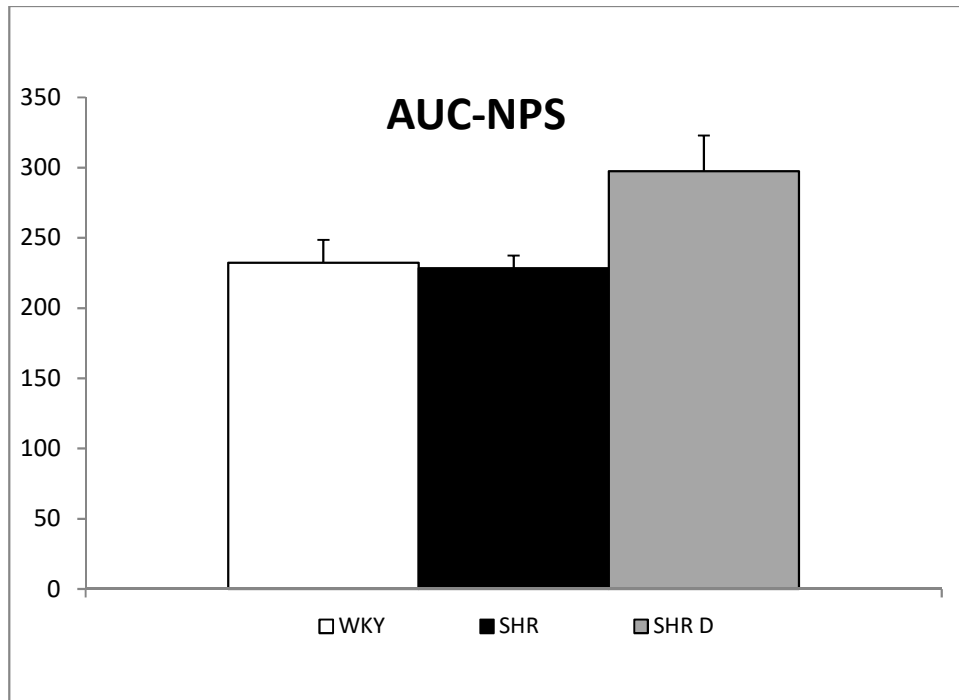


Figura 22. Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de NPS en los tres grupos experimentales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

8.3.2 RESPUESTA VASOCONSTRICTORA DE LA ARTERIA CORONARIA

La respuesta vasoconstrictora de la arteria coronaria inducida por concentraciones crecientes de 5-HT (10^{-9} - 3×10^{-5} mol/l) fue mayor en las ratas SHR no tratadas que en ratas WKY, observándose diferencias estadísticamente significativas a concentraciones mayores o iguales a 3×10^{-8} mol/L. Sin embargo, en el grupo SHR-D se observó una respuesta vasoconstrictora menor que en el grupo SHR a concentraciones iguales o superiores a 10^{-7} mol/L, sin apreciar diferencias estadísticamente significativas entre SHR-D y WKY. A bajas concentraciones no se vieron diferencias entre ninguno de los tres grupos (Fig.23). Finalmente el AUC, reflejo de la capacidad

vasoconstrictora de 5-HT, fue significativamente mayor en SHR sin tratar (168,06 ± 26) que en ratas WKY (40,91 ± 12; $p = 0,00005$) o ratas SHR-D (76,20 ± 17; $p = 0,011$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el AUC entre las ratas WKY y SHR-D ($P = 0,141$) (Fig.24).

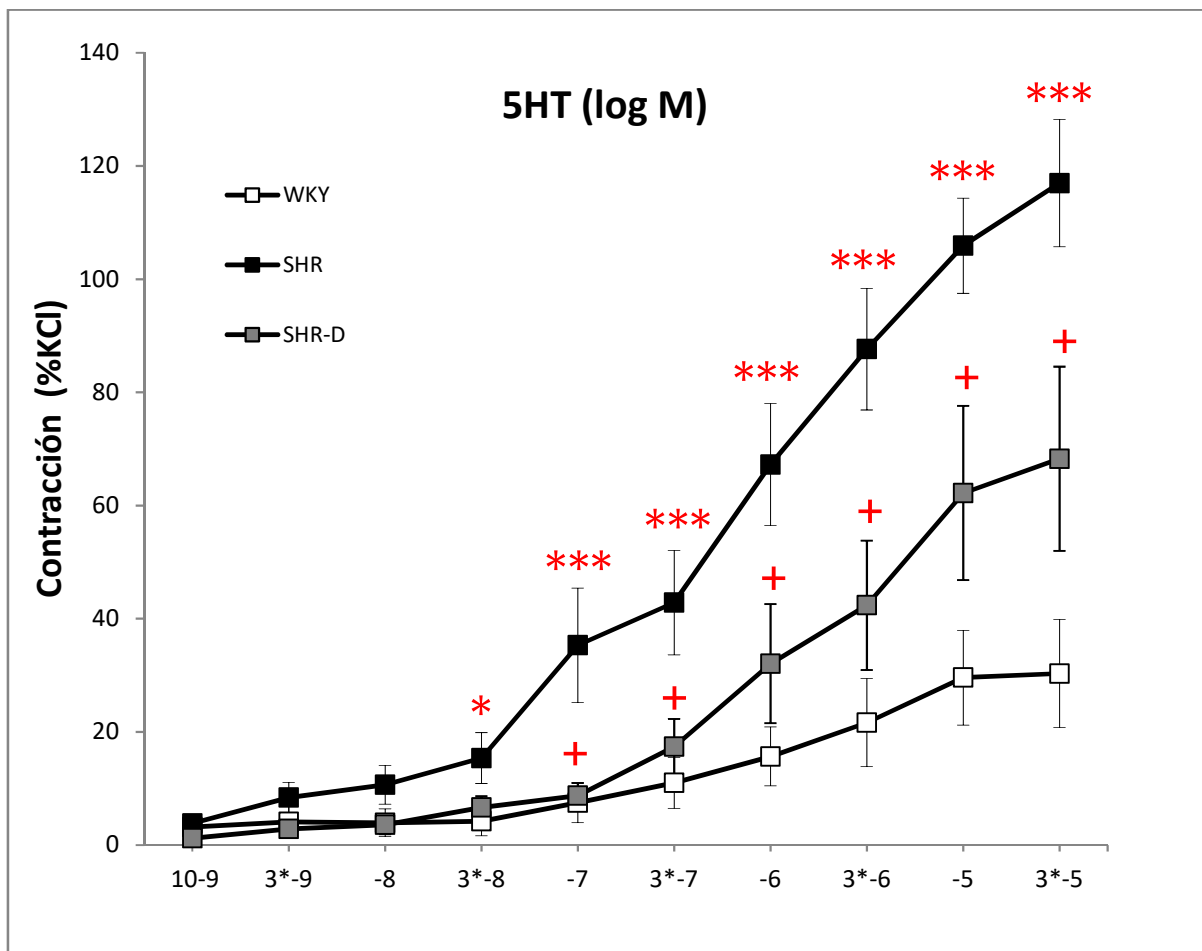


Figura 23. Respuesta vasoconstrictora de la arteria coronaria descendente anterior (DA) a concentraciones crecientes de 5-HT en WKY, SHR y SHR-D. La vasoconstricción inducida por cada concentración de 5-HT fue expresada como porcentaje de la respuesta máxima de la arteria ante un pulso con alto K⁺-KHS. Los valores representan media ± SEM de 5 ratas por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs. WKY. + $p < 0,05$ vs. SHR.

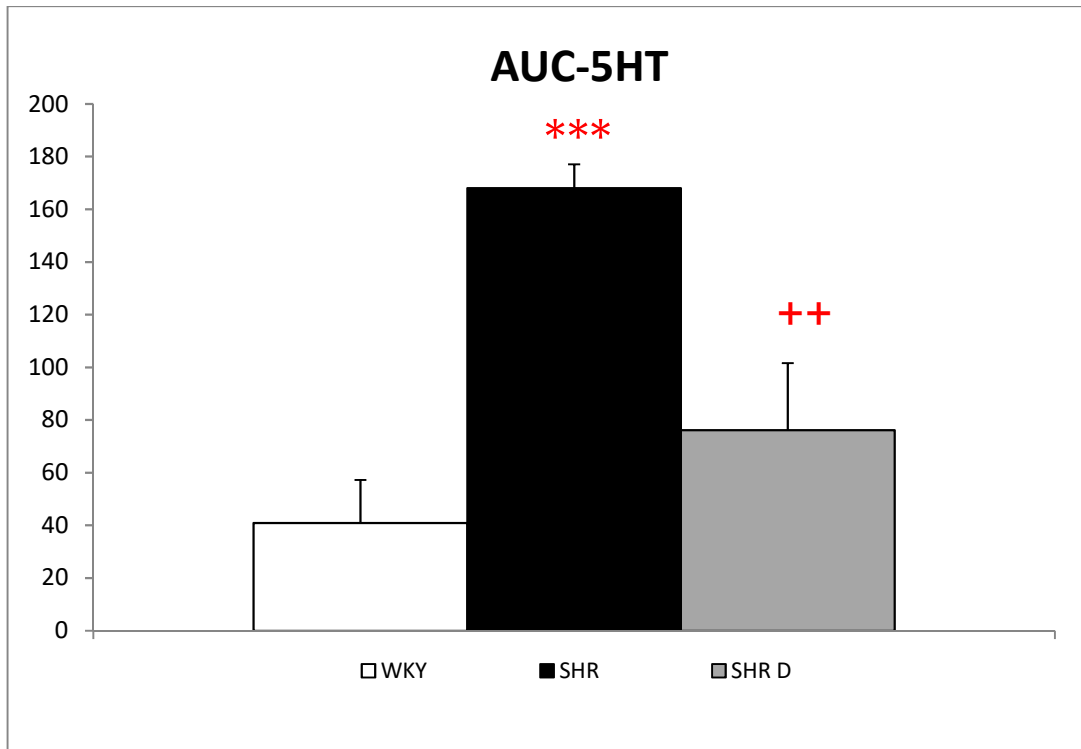


Figura 24. Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de 5-HT en los tres grupos experimentales.***p < 0,001 vs. WKY; ++p < 0,01 vs. SHR.

8.4 EFECTO DE LA DRONEDARONA SOBRE LOS BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Las Figuras 25, 26 y 27 muestran los resultados obtenidos tras realizar la determinación de diversos biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo en los tres grupos de ratas objeto de estudio, así como el resultado del cálculo del Oxy-Score.

La dronedarona no produjo diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de defensa antioxidante (TAC, GSH y SOD) (Fig.25). No se

observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de carbonilos en los tres grupos de estudio (Fig.25).

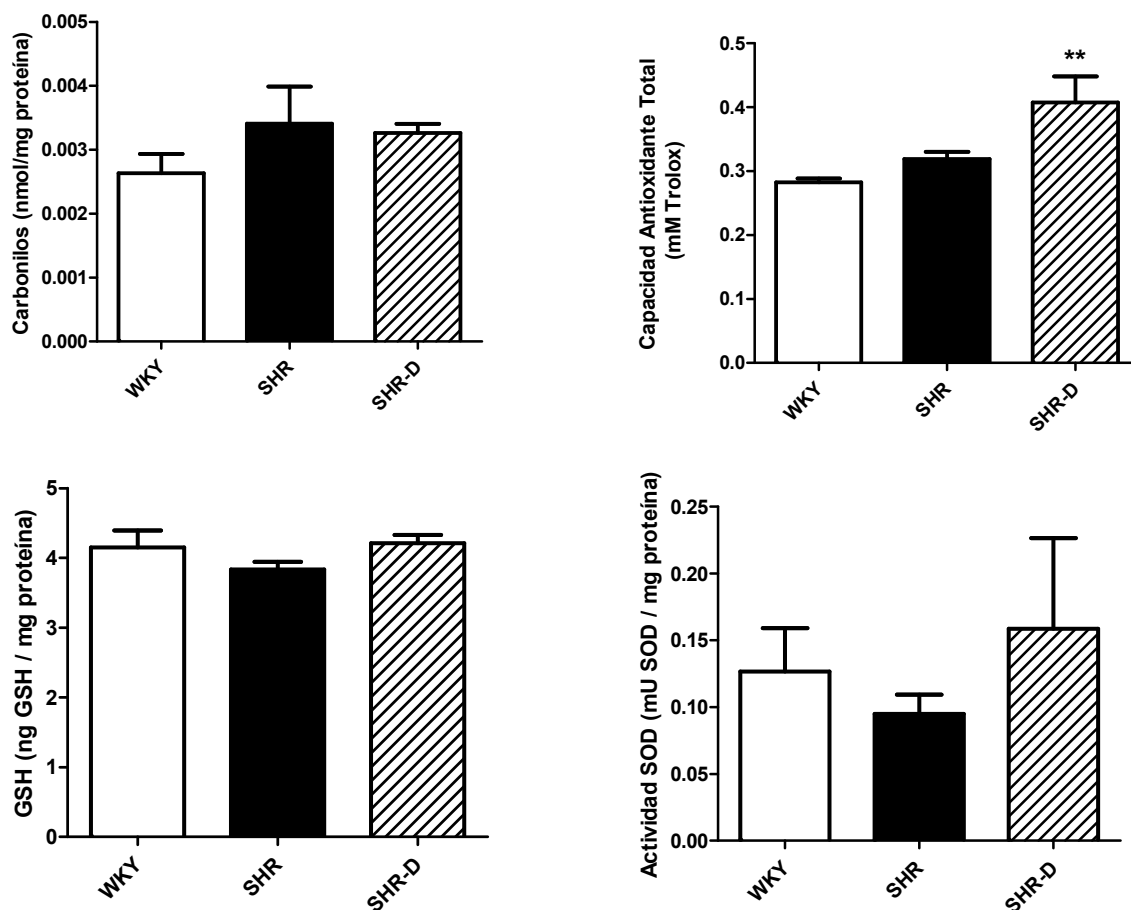


Figura 25. Análisis de biomarcadores de estrés oxidativo en cada uno de los tres grupos experimentales (WKY, SHR, SHR-D). A) Concentración de carbonilos, B) Capacidad Antioxidante Total (TAC), C) Concentración de GSH y D) Actividad SOD. Valores expresados como MEDIA \pm SEM. * p < 0,05 ** p > 0,01 *** p < 0,001 vs. WKY. # p < 0,05 vs. SHR.

No se observaron diferencias significativas en la concentración de tioles entre los tres grupos, pero sí hubo una mayor concentración de proteínas tioladas en el grupo SHR respecto al grupo WKY. Tras tratamiento con

dronedarona hubo una tendencia a la disminución de forma que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos SHR-D y WKY. Por último, al realizar el índice de proteínas tioladas, se observó un índice mayor en las ratas SHR respecto a las WKY que, tras tratamiento con dronedarona, disminuyó hasta equipararse al grupo de ratas normotensas (WKY). (Fig.26).

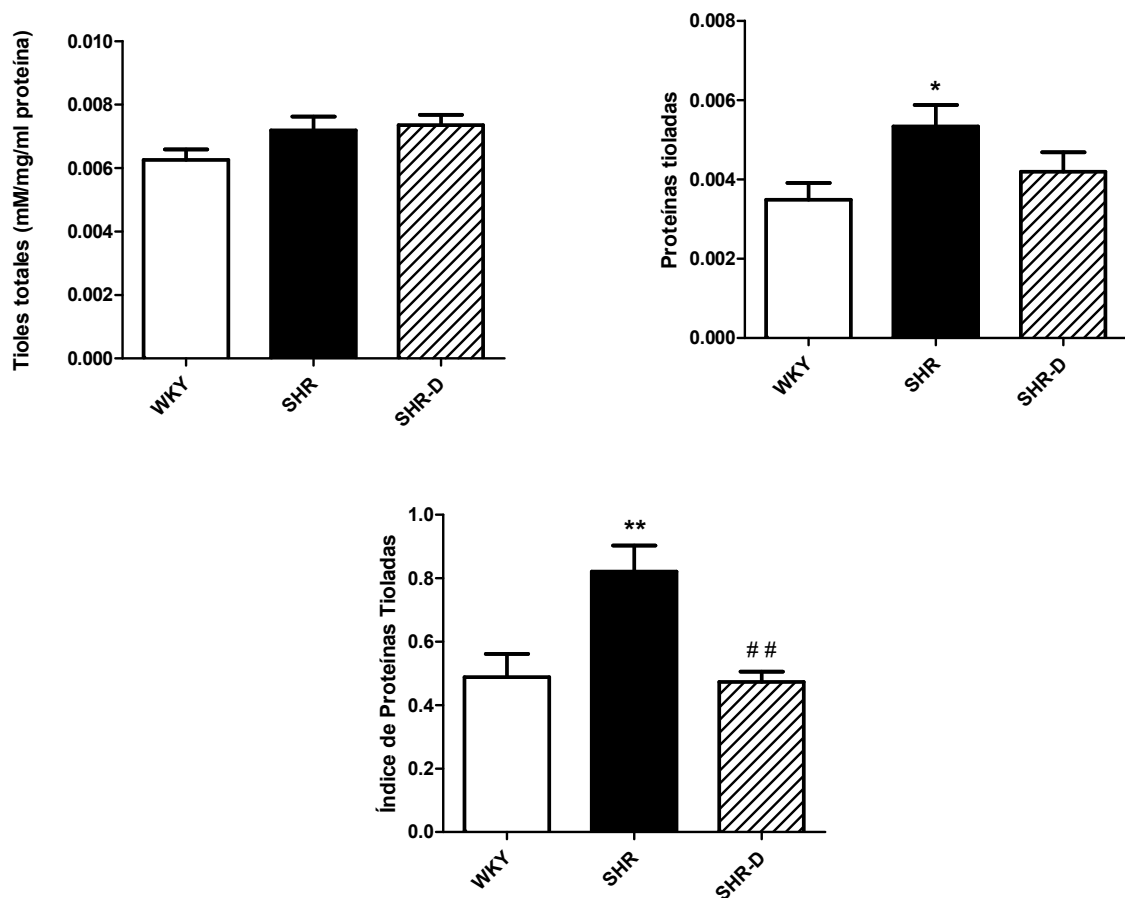


Figura 26. Análisis de biomarcadores de estrés oxidativo en cada uno de los tres grupos experimentales (WKY, SHR, SHR-D). A) Tioles totales B) Proteínas tioladas y C) Índice de proteínas tioladas. Valores expresados como MEDIA \pm SEM. * $p < 0,05$ ** $p > 0,01$ vs. WKY. ## $p < 0,01$ vs. SHR.

Por último, si analizamos los resultados del cálculo del Oxy-Score podemos observar que existen diferencias significativas ($P < 0.001$) entre el grupo control SHR y el grupo tratado con dronedarona. En el grupo SHR control el parámetro Oxy-Score fue negativo, lo que implica que predomina el daño oxidativo frente a la capacidad antioxidante. Sin embargo, dicho parámetro fue positivo en el grupo tratado con dronedarona, lo que indica un predominio de la capacidad antioxidante frente al daño oxidativo (Fig.27).

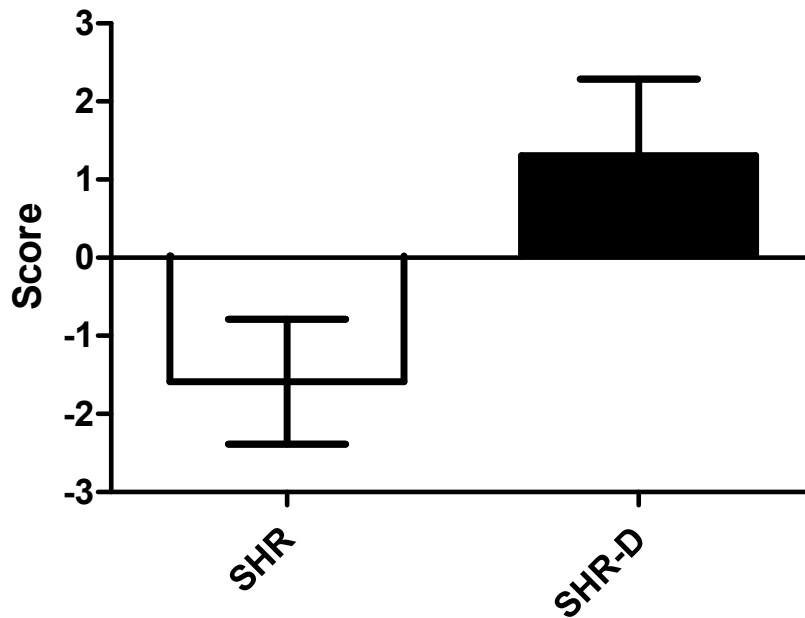


Figura 27. Representación del valor del Oxy-Score. Valores expresados como MEDIA \pm SEM.

9 Discusión

9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental demuestran que la dronedarona produce, de manera precoz, una regresión del remodelado arterial coronario secundario a la hipertensión arterial crónica. Hasta el momento actual, no existen en la literatura trabajos similares (o no hemos sido capaces de encontrarlos) que analicen el efecto de la dronedarona sobre las arterias coronarias. Como modelo experimental de remodelado arterial coronario se han utilizado ratas espontáneamente hipertensas (SHR), tratadas o no con dronedarona, así como ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) como grupo control.

La SHR constituye un modelo experimental de hipertrofia ventricular izquierda secundaria a la hipertensión arterial esencial. A los 10 meses de edad esta rata presenta hipertrofia ventricular izquierda, todavía hemodinámicamente compensada ¹⁸⁰. Estos cambios en el ventrículo izquierdo se asocian a cambios en la estructura y función de las arterias coronarias ¹⁸¹. Nuestro grupo de investigación, desarrolla desde hace años una línea de investigación centrada en la búsqueda de nuevas terapias que produzcan regresión precoz del remodelado cardiovascular, empleando como modelo experimental la rata SHR. Previamente al presente trabajo, hemos estudiado el efecto del beta-bloqueante cardioselectivo esmolol sobre la hipertrofia ventricular izquierda ¹ y el remodelado arterial coronario ¹⁷, demostrando una regresión precoz de ambos tras tan sólo 48h de tratamiento endovenoso. Ante

estos sorprendentes resultados y dado que el esmolol sólo puede administrarse vía intravenosa y en quirófano o en unidades de cuidados especiales, nuestro interés se centró posteriormente en encontrar un fármaco con efecto similar y disponible para su administración vía oral. Para ello, seleccionamos la dronedarona, un bloqueante multicanal indicado en el tratamiento de la fibrilación auricular paroxística o persistente. El objetivo fue evaluar si el bloqueo de varios canales iónicos tenía un efecto similar al descrito con el beta-bloqueo. Para ello, inicialmente se diseñó un estudio experimental en el que se analizó el efecto de la dronedarona sobre la hipertrofia ventricular izquierda ¹⁶⁸. Los resultados de dicho trabajo mostraron la regresión de la hipertrofia ventricular izquierda tras 2 semanas de tratamiento con dronedarona en la rata SHR (la dronedarona disminuye la masa del ventrículo izquierdo estudiada mediante ecocardiografía transtorácica, revierte el metabolismo de la glucosa del ventrículo izquierdo estudiado mediante PET/TC y disminuye el área del miocito estudiado mediante técnicas de histología). Estos resultados nos obligaron a estudiar los cambios estructurales y funcionales de las arterias coronarias producidos por dicho fármaco (objeto del presente trabajo). También se estudiaron biomarcadores de estrés oxidativo que pueden estar involucrados en el efecto de la dronedarona sobre la regresión del remodelado vascular.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento oral con dronedarona (100 mg/kg/día) durante 2 semanas produce una regresión precoz del remodelado arterial coronario. A continuación, analizaremos cada uno de estos resultados y sus posibles mecanismos.

9.1 DRONEDARONA INDUCE CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA ARTERIA CORONARIA

La hipertensión arterial constituye un factor de riesgo cardiovascular reconocido, asociado a un aumento en la morbilidad y mortalidad. Tal como muestran estudios previos ¹⁸², la hipertensión se asocia a cambios estructurales de la pared arterial coronaria. Por dicho motivo, se evaluaron cortes histológicos de arterias intramiocárdicas (rama intramiocárdica de la arteria obtusa marginal) de cada uno de los grupos del estudio (SHR, SHR-D y WKY). Tras determinar diversos parámetros estructurales [grosor de la pared vascular (GP), el área del vaso (CSA) y el diámetro externo (DE)], se confirmó un aumento significativo de éstos en el grupo hipertenso (SHR) respecto al control normotenso (WKY). Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Cebova y Kristek ¹⁸³, que demostraron la existencia de la hipertrofia arterial coronaria en ratas SHR de 13 meses de edad. Sin embargo, estos autores no observaron diferencias significativas en la pared de las arterias de ratas SHR y WKY más jóvenes (3 semanas de edad). De ello se deduce que el remodelado coronario es un mecanismo *mal-adaptativo* en respuesta a la hipertensión arterial crónica ²³ que va produciéndose y consolidándose al aumentar la edad.

Paralelamente, los resultados de nuestro estudio también revelan que el tratamiento con dronedarona produce cambios precoces en la estructura de la arteria coronaria (descendente anterior) de las SHR. La dronedarona produjo

una reducción de CSA y del DE del vaso a expensas de una disminución del GP. Esta disminución del GP se debió a una disminución tanto del grosor como del número de células de las capas media y adventicia. Así, podemos concluir que el tratamiento con dronedarona actúa reduciendo la hipertrofia vascular de la arteria descendente anterior mediante la disminución del número de células de las capas media y adventicia. Estos cambios en la estructura y morfología de la arteria descendente anterior se produjeron tras tan sólo 2 semanas de tratamiento.

En la literatura encontramos numerosos estudios que analizan los cambios estructurales en la arteria coronaria producidos por diversos fármacos antihipertensivos (IECAS, ARA II, beta-bloqueantes, antagonistas del calcio y diuréticos) en la SHR ^{64,184,185,186,187} : losartán produjo disminución del GP y CSA tras 5 semanas de tratamiento; amlodipino y enalapril disminuyeron el grosor y CSA de la capa media y el número de las células musculares tras 3 meses de tratamiento; perindopril e indapamida disminuyeron CSA y diámetro del vaso tras 8 semanas de tratamiento; lisinopril disminuyó el grosor de la capa media tras 1 mes de tratamiento. Y por último, el esmolol (administrado durante 48 h) produjo disminución del GP y CSA a expensas de la capa media, y disminución en el conteo celular tanto de la capa media como de la adventicia ¹⁸. La hipertensión arterial y el remodelado vascular se asocian principalmente a cambios en la estructura de la capa media, sin embargo hay estudios que también relacionan el remodelado vascular con cambios en la capa adventicia ¹⁸⁸. Nuestros resultados son congruentes con esta afirmación,

ya que la dronedarona produjo cambios en la estructura y en la morfología de la arteria coronaria.

9.2 DRONEDARONA INDUCE CAMBIOS EN LA REACTIVIDAD VASCULAR DE LA ARTERIA CORONARIA

El remodelado vascular producido por la hipertensión arterial implica no sólo cambios en la estructura del vaso, sino también cambios en la reactividad vascular.

El aumento del grosor y la rigidez de la pared arterial asociado a hipertensión conlleva cambios en la reactividad vascular. Se produce una mayor respuesta vasoconstrictora y una menor capacidad de vasodilatación frente a diversos estímulos ^{118,17,189}. Por tanto, mediremos la capacidad de un determinado fármaco de restituir la funcionalidad vascular en función de su efectividad para normalizar las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras. Nuestro estudio demuestra que el tratamiento con dronedarona produce una disminución de las respuestas vasoconstrictoras frente a la serotonina. Ello puede deberse a la disminución del grosor y número de células de la capa media (o muscular). De hecho, previamente se ha demostrado que ciertos cambios estructurales presentes en la arteria coronaria descendente anterior de las ratas SHR (aumento de grosor de pared y del número de células musculares lisas) se asocian a una mayor respuesta vasoconstrictora que en las ratas normotensas ¹⁹⁰.

La revisión bibliográfica muestra estudios con resultados divergentes respecto a la vasoconstricción observada en ratas WKY y SHR tras la administración de 5-HT. Mientras unos estudios, incluyendo los realizados por nuestro grupo de investigación, observan una menor vasoconstricción en ratas WKY respecto a ratas SHR ^{191,18}; otros encuentran una respuesta similar ¹⁹¹ o incluso una menor vasoconstricción en ratas SHR ¹⁹³. Estas diferencias podrían explicarse debido a los diversos tipos y tamaños de arteria usados, así como al agente vasoconstrictor, a la metodología del estudio y a la edad de animal empleado ¹⁹⁴.

Por otra parte, el tratamiento con dronedarona produjo una mejoría de la capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio (mediada por Ach), en comparación con el grupo SHR no tratado. Estudios previos muestran un posible efecto vasodilatador coronario 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 calcio ¹⁹⁵. Por lo que la mejoría en la respuesta vasodilatadora observada en las ratas tratadas con dronedarona podría estar relacionada con la estimulación de la vía del óxido nítrico. Futuros estudios serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

9.3 DRONEDARONA INDUCE CAMBIOS EN EL ESTRÉS OXIDATIVO

La dronedarona ha demostrado su efectividad en el síndrome coronario agudo ⁸⁹. Este efecto protector parece estar relacionado con los efectos pleiotrópicos del fármaco. Por un lado, la dronedarona disminuye la frecuencia cardíaca y la demanda de oxígeno, y aumenta la duración de la diástole con lo que también favorece el flujo coronario ¹⁹⁶; esta reducción de la frecuencia cardíaca se debe a la inhibición de la corriente de sodio I_f . Por otro lado, la dronedarona bloquea los receptores alfa adrenérgicos, por lo que produce una disminución de la presión arterial sistémica y además reduce la vasoconstricción local, mecanismos que pueden producir isquemia miocárdica en pacientes con enfermedad coronaria ¹⁹⁷. Por último, un efecto cardioprotector directo de la dronedarona (reducción tamaño del infarto en un modelo experimental en cerdos de isquemia-reperfusión con afectación de la descendente anterior, ⁹⁰) podría explicar el efecto positivo de este fármaco en el síndrome coronario agudo.

El mecanismo por el que la dronedarona ejerce la cardioprotección descrita anteriormente no se conoce totalmente. Sin embargo, la mejoría en el flujo coronario se ha relacionado con una disminución del estrés oxidativo asociado a la dronedarona ¹⁹⁸. Nuestros resultados son congruentes con los observados en los estudios descritos anteriormente en lo que respecta al estrés oxidativo, ya que la dronedarona produjo una disminución del estrés oxidativo tras 2 semanas de tratamiento.

El índice de proteínas tioladas en plasma es un biomarcador de estrés oxidativo en determinadas patologías como es la insuficiencia renal (hemodiálisis) ¹⁷⁷. En el presente estudio encontramos un aumento en el índice de proteínas tioladas en la rata hipertensa con respecto a la rata normotensa. Sin embargo, la dronedarona disminuyó este biomarcador en la rata SHR, igualándose los niveles plasmáticos a los observados en la rata normotensa. El índice de proteínas tioladas podría ser un nuevo biomarcador de estrés oxidativo en el paciente con HVI y daño coronario causado por la hipertensión arterial primaria; y a la vez, una diana terapéutica en el tratamiento del remodelado vascular.

La inclusión de los biomarcadores individuales en el indicador global del estrés oxidativo (Oxy-Score) muestra diferencias relevantes entre el grupo tratado con dronedarona y el grupo control hipertenso. El análisis del Oxy-Score mostró un predominio del daño oxidativo (frente a la capacidad antioxidante) en el grupo control hipertenso y un predominio de la defensa antioxidante (frente al daño oxidativo) en el grupo tratado con dronedarona. Estos cambios en el estrés oxidativo observados tras la administración de dronedarona podrían explicar, en parte, el efecto protector de la dronedarona en la regresión del remodelado de las arterias coronarias. Futuros estudios serán necesarios para profundizar en el efecto de la dronedarona sobre el estrés oxidativo y su asociación con la regresión del remodelado vascular.

9.4 DÓNDE ESTAMOS Y FUTUROS PROYECTOS

En el presente trabajo hemos demostrado la regresión del remodelado arterial coronario producida por un bloqueante multicanal, la dronedarona. Para ello, hemos estudiado los cambios producidos en la arteria coronaria desde múltiples perspectivas: cambios estructurales y morfológicos mediante microscopía confocal y óptica, cambios en la reactividad vascular usando el miógrafo de alambre y efectos sobre el estrés oxidativo analizando diversos biomarcadores plasmáticos.

Una vez estudiados los cambios producidos por el fármaco en las arterias de resistencia, el siguiente paso será estudiar los cambios producidos en arterias de mayor calibre como es la aorta torácica.

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. Por otro lado, se pretende profundizar en los mecanismos implicados en la regresión del remodelado vascular. Para ello, se están analizando nuevos biomarcadores de estrés oxidativo y marcadores de disfunción endotelial.

Es el primer estudio que analiza los cambios en el remodelado arterial coronario en relación al uso de la dronedarona. Este estudio, por lo tanto, abre

la puerta a la posibilidad de una nueva indicación terapéutica del fármaco si se confirman los resultados en humanos mediante futuros ensayos clínicos.

9.5 LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO

Tras el análisis de nuestro trabajo experimental, encontramos las siguientes

Limitaciones:

- a) La dosis y vía de administración del fármaco se ha extrapolado de su uso en humanos. Sin embargo, no se han tenido en cuenta las posibles diferencias farmacodinámicas y farmacocinéticas presentes en los roedores respecto a los humanos. Por lo tanto, los resultados de este estudio únicamente pueden aplicarse a ratas, necesitando estudios en humanos que confirmen estos resultados..
- b) El grado de disfunción endotelial y afectación de la reactividad vascular difiere en la rata SHR dependiendo del sexo, edad, tipo de arteria seleccionada y método usado para el estudio de la función arterial. Por ello, dichos resultados sólo son aplicables a las arterias coronarias de ratas SHR macho de 10 meses de edad.
- c) El presente trabajo demuestra la mejoría del remodelado coronario tras 2 semanas de tratamiento con dronedarona. Sin embargo, se desconoce la permanencia o no de este efecto tras la interrupción del tratamiento. Por ello, se requieren estudios que aclaren este interesante aspecto.

- d) Serán necesarios futuros ensayos clínicos para confirmar el efecto de la dronedarona sobre la regresión del remodelado vascular y poder plantear una nueva indicación terapéutica.

En contraposición, nuestro estudio presenta los siguientes Fortalezas:

- a) Se trata de un estudio experimental complejo e innovador, que aplica una metodología adecuada para el estudio de los cambios estructurales y funcionales de las arterias coronarias.
- b) Es el primer estudio que plantea el posible efecto de la dronedarona sobre la regresión del remodelado coronario. Los estudios previos se han centrado exclusivamente en analizar su efecto sobre el control de las arritmias, única indicación terapéutica incluida en ficha técnica en el momento actual ^{89, 199}.
- c) La regresión del remodelado coronario producido por la dronedarona podría resultar beneficiosa en los pacientes con fibrilación auricular asociada a hipertrofia ventricular izquierda compensada y remodelado coronario, ya que podría resultar en una disminución de los eventos isquémicos y por lo tanto de la morbilidad y mortalidad del paciente.
- d) Si se confirman los resultados obtenidos en el presente estudio, es posible que aparezca una nueva indicación terapéutica para este fármaco, que reforzaría su uso en pacientes con fibrilación auricular.

10 Conclusiones

10. CONCLUSIONES

Tras analizar y discutir los resultados del presente estudio podemos formular las siguientes conclusiones:

1. La dronedarona produce regresión del remodelado de la arteria coronaria en un modelo experimental de hipertensión arterial e hipertrofia ventricular izquierda compensada, combinada con alteraciones estructurales y funcionales de las arterias coronarias.
2. La arteria coronaria de la SHR tratada con dronedarona presenta diferencias estructurales significativas respecto a la de la rata hipertensa no tratada. Estos cambios incluyen una disminución del grosor de pared a expensas de la reducción del grosor y del número de células de las capas media y adventicia, así como una disminución del colágeno vascular.
3. La dronedarona restaura la reactividad vascular coronaria, que se traduce en un aumento de la capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio y una menor respuesta vasoconstrictora.
4. La dronedarona produce cambios en el indicador global de estrés oxidativo (Oxy-Score) mostrando un predominio de la capacidad antioxidante frente al daño oxidativo.

11 Bibliografía

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Quintana-Villamandos B, Delgado-Martos MJ, Sanchez-Hernandez JJ, Gómez de Diego JJ, Fernández-Criado MdelC, Canillas F 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.
2. Arnalich-Montiel A, González MC, Delgado-Baeza E, Delgado-Martos MJ, Condezo-Hoyos L, Martos-Rodríguez A 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; article ID:531087.
3. Giles TD, Materson BJ, Cohn JN, Kostis JB. Definition and classification of hypertension: an update. *J Clin Hypertens.* 2009; 11:611-614.
4. Ortiz Marron H, Vaamonde Martin RJ, Zorrilla Torras B, Arrieta Blanco F, Casado López M, Medrano Albero MJ. Prevalence, degree of control and treatment of hypertension in the adult population of Madrid, Spain. *Rev. Esp. Salud Publica.* 2011; 85:329-338.
5. Lund-Johansen P. Haemodynamics in essential hypertension. *Clin Sci.* 1980; 59 Suppl 6:343S-54S.

6. Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G. Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. *Hypertension*. 1999; 34:724-728.
7. Mulvany MJ. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput*. 2008; 46:461-467.
8. Barengo NC, Antikainen R, Kastarinen M, Laatikainen T, Tuomilehto J. 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.
9. Drazner MH. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation*. 2011; 123:327-334
10. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Eng J Med*. 1990; 322:1561-1566.
11. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J*. 2001; 141:334-341.
12. Larsen GC, Griffith JL, Beshansky JR, D'Agostino RB, Selker HP. Electrocardiographic left ventricular hypertrophy in patients with suspected

acute cardiac ischemia- its influence on diagnosis, triage, and short-term prognosis: a multicenter study. *J Gen Intern Med.* 1994; 9:666-673.

13. Verdecchia P, Carini G, Circo A, Dovellini E, Giovannini E, Lombardo M, et al. Left ventricular mass and cardiovascular morbidity in essential hypertension: the MAVI study. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38:1829-1835.

14. Barrios V. Hypertension with left ventricular hypertrophy/diastolic dysfunction. In: Sleight P, Bakris G, Mancia G, et al. Opie L editors *Clinical cases in Hypertension Specific treatment strategies* Richmond upon Thames United Kingdom. 2000; 16-22.

15. Bendersky M PD, Boccardo D. Cardiopatía hipertensiva. *Rev Fed Cardiol.* 2002; 31:321-34.

16. Colucci WS, Koliass TJ, Adams KF, Armstrong WF, Ghali JK, Gottlieb SS, et al. Metoprolol reverses left ventricular remodeling in patients with asymptomatic systolic dysfunction: the REversal of VEntricular Remodeling with Toprol-XL (REVERT) trial. *Circulation.* 2007; 116:49-56.

17. Quintana-Villamandos B, González MC, Delgado-Martos MJ, Condezo-Hoyos L, Böger RH, Luneburg N 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.

18. Quintana-Villamandos B, Arnalich-Montiel A, Arribas S, Lüneburg N, Böger RH, Delgado Martos MJ et al. Esmolol produces regression of coronary artery remodeling in hypertensive rats: role of ADMA. *Hypertens Res* 2016; 39: 692-700.
19. Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 1989; 13:968-972.
20. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Eng J Med*. 1994; 330:1431-1438.
21. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*. 1993; 21:391-397.
22. Bund SJ, Lee RM. Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. *J Vasc Res*. 2003; 40:547-557.
23. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001; 38:581-587.
24. Schiffrin EL, Deng LY, Larochelle P. Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. *Clin Invest Med*. 1993; 16:177-186.

25. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, et al. Vascular remodeling. *Hypertension*. 1996; 28:505- 506.
26. Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, Everts V, Spaan JA, VanBavel E. Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J Vasc Res*. 2002; 39:12-20.
27. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, Bettoni G, Muiesan ML, Muiesan P, et al. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension*. 1996; 28:785-790.
28. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Valentini U, Cimino A, 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, Savoia C, Viridis A, Neves MF, et al. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. *Hypertension*. 2004; 43:399-404.
30. Pasterkamp G, Galis ZS, de Kleijn DP. Expansive arterial remodeling: location, location, location. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:650-657.
31. Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, Zulli A, Shen J, Buxton BF. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased

fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2000; 45:729-735.

32. Rodriguez-Lopez AM, Flores O, Arevalo MA, López-Novoa JM. Glomerular cell proliferation and apoptosis in uninephrectomized spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int Suppl.* 1998; 68:S36-40.

33. Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension.* 1995; 26:642-648.

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, Rezzani R, Guelfi D, Piccoli A, et al. Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2000; 18:885-891.

36. Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Ther.* 2013; 139(1):32-40.

37. Bakker EN, Buus CL, Spaan JA, Perree J, Ganga A, Rolf TM, et al. Small artery remodeling depends on tissue-type transglutaminase. *Circ Res.* 2005; 96:119-126.

38. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and

dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007; 115:1285-1295.

39. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15:1983-1992.

40. 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.

41. 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.

42. Van der Meer IM, de Maat MP, Kiliaan AJ, van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. The value of C-reactive protein in cardiovascular risk prediction: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med*. 2003; 163:1323-1328.

43. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. 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.

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

45. Jones DP, Radi R. Redox pioneer: professor Helmut Sies. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 21:2459-2468.
46. Rodrigo R, Libuy M, Feliu F, Hasson D. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers*. 2013; 35:773-790.
47. Ghasemzadeh N, Patel RS, Eapen DJ, Veledar E, Al Kassem H, Manocha P, et al. Oxidative stress is associated with increased pulmonary artery systolic pressure in humans. *Hypertension*. 2014; 63:1270-1275.
48. Carrizzo A, Puca A, Damato A, Marino M, Franco E, Pompeo F, et al. Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension*. 2013; 62:359-366.
49. Pechanova O, Simko F. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiol Res*. 2007; 56:S7-S16.
50. Nava E, Palmer RM, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet*. 1991; 338:1555-1557.
51. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*. 1995; 26:1235-1241.

52. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Böger RH. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev.* 2010; 6(2):82-90.
53. Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol.* 2015; 31:631-641.
54. Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 884:19-40.
55. Griending KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. 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.
56. Vecchione C, Fratta L, Rizzoni D, Notte A, Poulet R, Porteri E, et al. Cardiovascular influences of alpha 1b-adrenergic receptor defect in mice. *Circulation.* 2002; 105:1700-1707.
57. 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.
58. 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.

59. 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.

60. Pu Q, Neves MF, Virdis A, Touyz RM, Schiffrin EL. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension*. 2003; 42:49-55.

61. Stow LR, Gumz ML, Lynch IJ, Greenlee MM, Rudin A, Cain BD, et al. Aldosterone modulates steroid receptor binding to the endothelin-1 gene (*edn1*). *J Biol Chem*. 2009; 284:30087-30096.

62. Bezie Y, Lamaziere JM, Laurent S, Challande P, Cunha RS, Bonnet J, et al. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1998; 18:1027-1034.

63. Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL. 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.

64. Sharifi AM, Li JS, Endemann D, Schiffrin EL. 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.
65. Thybo NK, Mulvany MJ, Jastrup B, Nielsen H, Aalkjaer C. Some pharmacological and elastic characteristics of isolated subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 1996; 14:993-998.
66. Schiffrin EL. Effects of aldosterone on the vasculature. *Hypertension.* 2006; 47:312-318.
67. 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.
68. Min LJ, Mogi M, Li JM, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M. Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005; 97:434-442.
69. Brown NJ. Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertension.* 2008; 51:161-167.
70. Nyby MD, Abedi K, Smutko V, Eslami P, Tuck ML. Vascular Angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative

stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res.* 2007; 30:451-457.

71. Park JB, Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens.* 2001; 19:921-930.

72. Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, De Ciuceis C, Sleiman I, Muiesan ML, et al. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation.* 2003; 108:2230-2235.

73. De Ciuceis C, Porteri E, Rizzoni D, Rizzardi N, Paiardi S, Boari GE, 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.

74. Patel C, Yan G, Kowey P R. Dronedarone. *Circulation.* 2009; 120:636-644.

75. Almendral J. Papel de la dronedarona en la terapia de la fibrilación auricular: una actualización en 2015. *Sec Monogr* 2015; 3:1-5.

76. Tadros R, Nattel S, Andrade JG. Dronedarone: Basic Pharmacology and Clinical Use. *Card Electrophysiol Clin.* 2016; 8:453-65.

77. Schmidt C, Wiedmann F, Schweizer PA, Becker R, Katus HA, Thomas

D. Novel electrophysiological properties of dronedarone: inhibition of human cardiac two-pore-domain potassium (K₂P) channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012; 385:1003-1016.

78. Wakili R, Voigt N, Kaab S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest.* 2011; 121:2955-2968.

79. Dobrev D, Carlsson L, Nattel S. Novel molecular targets for atrial fibrillation therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11:275-291.

80. Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, et al. The G protein-gated potassium current $I_{K,ACh}$ is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation.* 2005; 112:3697-3706.

81. Pandit SV, Berenfeld O, Anumonwo JM, Zaritski RM, Kneller J, Nattel S, et al. Ionic determinants of functional reentry in a 2-D model of human atrial cells during simulated chronic atrial fibrillation. *Biophys J.* 2005; 88(6):3806-3821.

82. Heijman J, Voigt N, Dobrev D. New directions in antiarrhythmic drug therapy for atrial fibrillation. *Future Cardiol.* 2013; 9:71-88.

83. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008; 1:62-73.

84. Shirolkar S C, Fiuzat M, Becker R C. Dronedarone and vitamin K antagonists: A review of drug-drug interactions. *Am Heart J* 2010; 160:577-582.
85. Felser A, Stoller A, Morand R, Schnella D, Donzella M, Terracciano L, et al. Hepatic toxicity of dronedarone in mice: Role of mitochondrial β -oxidation. *Toxicol* 2014; 323:1-9.
86. Serviddio G, Bellanti F, Giudetti A M, Gnoni GV, Capitanio N, Tamborra R, et al. Mitochondrial oxidative stress and respiratory chain dysfunction account for liver toxicity during amiodarone but not dronedarone administration. *Free Radic Biol Med*. 2011 15; 5:2234-2242.
87. Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, 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.
88. January CT, Wann LS, Alpert JS, Calkins H, Cigarroa JE, Cleveland JC Jr, 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.

89. Connolly S J, Crijns H, 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.
90. Skyschally A, Heusch G. Reduction of myocardial infarct size by dronedarone in pigs - a pleiotropic action? *Cardiovasc Drugs Ther*. 2011; 25: 197-201.
91. Engelhorn T, Schwarz MA, Heusch G, Doerfler A, Schulz R. Reduction of cerebral infarct size by dronedarone. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2011; 25: 523-529.
92. Benaim G, Hernandez-Rodriguez V, Mujica-Gonzalez S, Plaza-Rojas L, Silva ML, Parra-Gimenez N, 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.
93. Gustavo Benaim, Paola Casanova, Vanessa Hernandez-Rodriguez, Sheira Mujica-Gonzalez, Nereida Parra-Gimenez, Lourdes Plaza-Rojas, et al. Dronedarone, an Amiodarone Analog with Improved Anti-*Leishmania mexicana* Efficacy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58:2295–2303.
94. Eftekhari A, Rahman A, Schaebel LH, Chen H, Rasmussen CV, Aalkjaer

C, et al. Chronic cystamine treatment inhibits small artery remodelling in rats. *J Vasc Res.* 2007; 44:471-482.

95. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res.* 2011; 34:5-14.

96. Buus NH, Bottcher M, Jorgensen CG, Christensen KL, Thygesen K, Nielsen TT, et al. Myocardial perfusion during long-term angiotensin converting enzyme inhibition or beta-blockade in patients with essential hypertension. *Hypertension.* 2004; 44:465-470.

97. Schiffrin EL. Circulatory therapeutics: use of antihypertensive agents and their effects on the vasculature. *J Cell Mol Med.* 2010; 14:1018-1029.

98. Stead S, Werstiuk ES, Lee RM. Nifedipine induces apoptosis in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2000; 67:895-906.

99. 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.

100. 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.

101. Hamet P, deBlois D, Dam TV, Richard L, Teiger E, Tea BS, et al. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996; 74:850-861.
102. Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension.* 2000; 35:1069-1073.
103. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Pardo J. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension.* 1997; 29:776-780.
104. Van Bortel LM, Kool MJ, Boudier HA, Struijker Boudier HA. Effects of antihypertensive agents on local arterial distensibility and compliance. *Hypertension.* 1995; 26:531-534.
105. Benetos A, Gautier S, Lafleche A, Topouchian J, Frangin G, Girerd X, 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
106. Davies J, Gavin A, Band M, Morris A, Struthers A. Spironolactone reduces brachial pulse wave velocity and PIIINP levels in hypertensive diabetic patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 59:520-523.

107. Epstein M, Safar ME. Aldosterone and large artery vessels. *Hypertension*. 2006; 47:e24.
108. Savoia C, Touyz RM, Amiri F, Schiffrin EL. Selective mineralocorticoid receptor blocker eplerenone reduces resistance artery stiffness in hypertensive patients. *Hypertension*. 2008; 51:432-439.
109. Williams B, Lacy PS, Thom SM, Cruickshank K, Stanton A, Collier D , 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.
110. 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.
111. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, 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.
112. Motz W, Strauer BE. Improvement of coronary flow reserve after long-term therapy with enalapril. *Hypertension*. 1996; 27:1031-1038.

113. Schwartzkopff B, Brehm M, Mundhenke M, Strauer BE. Repair of coronary arterioles after treatment with perindopril in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2000; 36:220-225.
114. Rizzoni D, Palombo C, Porteri E, Muiesan ML, Kozàková M, La Canna G, et al. Relationships between coronary flow vasodilator capacity and small artery remodelling in hypertensive patients. *J Hypertens*. 2003; 21:625-631.
115. 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.
116. 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.
117. Thybo NK, Stephens N, Cooper A, Aalkjaer C, Heagerty AM, Mulvany MJ. Effect of antihypertensive treatment on small arteries of patients with previously untreated essential hypertension. *Hypertension*. 1995; 25:474-481.
118. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000; 101:1653-1659.

119. 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.
120. 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.
121. 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.
122. Rizzoni D, Porteri E, De Ciuceis C, Sleiman I, Rodella L, Rezzani R, 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.
123. Savoia C, Touyz RM, Endemann DH, Pu Q, Ko EA, De Ciuceis C, et al. Angiotensin receptor blocker added to previous antihypertensive agents on arteries of diabetic hypertensive patients. *Hypertension*. 2006; 48:271-277.
124. Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N, Rautureau Y, Paradis P, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

Hypertension. 2012; 59:291-299.

125. 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.

126. Brassard P, Amiri F, Thibault G, Schiffrin EL. 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.

127. Creager MA, Roddy MA. Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. Hypertension. 1994; 24:499-505.

128. Kiowski W, Linder L, Nuesch R, Martina B. Effects of cilazapril on vascular structure and function in essential hypertension. Hypertension. 1996; 27:371-376.

129. 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.

130. Malik RA, Schofield IJ, Izzard A, Austin C, Bermann G, Heagerty AM. Effects of angiotensin type-1 receptor antagonism on small artery function in patients with type 2 mellitus. Hypertension. 2005; 45:264-269.

131. Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension

- and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens.* 2004; 17:1192-200.
132. Perros F, Ranchoux B, Izikki M, Bentebbal S, Happé C, Antigny F, et al. Nebivolol for improving endothelial dysfunction, pulmonary vascular remodeling, and right heart function in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 65:668-680.
133. Schiffrin EL. Antioxidants in hypertension and cardiovascular disease. *Mol Interv.* 2010; 10:354-362.
134. Ardalan MR, Rafieian-Kopaei M. Antioxidant supplementation in hypertension. *J Renal Inj Prev.* 2014; 3:39-40.
135. Zhou N, Wang T, Song J, He H, He J, He L. Antihypertensive and vascular remodelling effects of the imperatorin derivative OW1 in renovascular hypertension rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2014; 41:571-578.
136. Bohlen HG. Localization of vascular resistance changes during hypertension. *Hypertension.* 1986; 8:181-183.
137. Prasad A, Dunnill GS, Mortimer PS, MacGregor GA. Capillary rarefaction in the forearm skin in essential hypertension. *J Hypertens.* 1995; 13:265-268.
138. Unger T, Matfeldt T, Lamberty V, Bock P, Mall G, Linz W, et al. Effect of early onset angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial capillaries. *Hypertension.* 1992; 20:478-482.

139. Greene AS. Life and death in the microcirculation: a role for angiotensin II. *Microcirculation*. 1998; 5:101-107.
140. Levy BI. Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 2004; 109:8-13.
141. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963; 27:282-93.
142. Kurtz TW, Morris RC, Jr. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1987; 10:127-131.
143. St Lezin E, Simonet L, Pravenec M, Kurtz TW. Hypertensive strains and normotensive 'control' strains. How closely are they related? *Hypertension*. 1992; 19:419-424.
144. Johnson ML, Ely DL, Turner ME. Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1992; 19:425-427.
145. Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 1998; 39:89-105.

146. Frohlich ED. Is the spontaneously hypertensive rat a model for human hypertension? *J Hypertens.* 1986; 4:S15-S9.
147. Dickhout JG, Lee RM. Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997; 29:781-789.
148. Smith TL, Hutchins PM. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. *Hypertension.* 1979; 1:508-517.
149. Folkow B. Early structural changes in hypertension: pathophysiology and clinical consequences. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 22:S1-S6.
150. Palatini P, Julius S. Association of tachycardia with morbidity and mortality: pathophysiological considerations. *J Hum Hypertens.* 1997; 11 Suppl 1:S19-S27.
151. 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.
152. Ganten U, Schroder G, Witt M, Zimmermann F, Ganten D, Stock G. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens.* 1989; 7:721-726.

153. Nigro D, Fortes ZB, Scivoletto R, Barbeiro HV, Carvalho MH. Sex-related differences in the response of spontaneously hypertensive rats to angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Endothelium*. 1997; 5:63-71.
154. Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressurenatriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998; 31:435-439.
155. Chan V, Fenning A, Levick SP, Loch D, Chunduri P, Iyer A, et al. Cardiovascular changes during maturation and ageing in male and female spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 57:469-478.
156. Capasso JM, Remily RM, Smith RH, Sonnenblick EH. Sex differences in myocardial contractility in the rat. *Basic Res Cardiol*. 1983; 78:156-171.
157. Wang SN, Wyeth RP, Kennedy RH. Effects of gender on the sensitivity of rat cardiac muscle to extracellular Ca²⁺. *Eur J Pharmacol*. 1998; 361:73-77.
158. Tamura T, Said S, Gerdes AM. Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure. *Hypertension*. 1999; 33:676-680.
159. Kokubo M, Uemura A, Matsubara T, Murohara T. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. *Hypertens Res*. 2005; 28:601-609.

160. Cingolani OH, Yang XP, Cavasin MA, Carretero OA. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2003; 41:249-254.
161. Gerds E, Roman MJ, Palmieri V, Wachtell K, Smith G, Nieminen MS, et al. Impact of age on left ventricular hypertrophy regression during antihypertensive treatment with losartan or atenolol (the LIFE study). *J Hum Hypertens*. 2004; 18:417-422.
162. Carvajal K, Moreno-Sanchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res*. 2003; 34:89-99.
163. Wambolt RB, Henning SL, English DR, Dyachkova Y, Lopaschuk GD, Allard MF. Glucose utilization and glycogen turnover are accelerated in hypertrophied rat hearts during severe low-flow ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31:493-502.
164. Christie ME, Rodgers RL. Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1994; 26:1371-1375.
165. Reutter BW, Huesman RH, Brennan KM, Boutchko R, Hanrahan SM, Gullberg GT. Longitudinal Evaluation of Fatty Acid Metabolism in Normal and Spontaneously Hypertensive Rat Hearts with Dynamic MicroSPECT Imaging.

Int J Mol Imaging. 2011; 2011:893129.

166. Hajri T, Ibrahimi A, Coburn CT, Knapp FF Jr, Kurtz T, Pravenec M, et al. Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *J Biol Chem.* 2001; 276:23661-23666.

167. Purushothaman S, Renuka Nair R, Harikrishnan VS, Fernandez AC. Temporal relation of cardiac hypertrophy, oxidative stress, and fatty acid metabolism in spontaneously hypertensive rat. *Mol Cell Biochem.* 2011; 351:59-64.

168. Gómez de Diego JJ. Efecto de la dronedarona sobre la regresión de la hipertrofia ventricular. Estudio experimental en un modelo de rata hipertensa (Tesis). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España; 2017.

169. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96:379-394.

170. Lunkenheimer PP, Redmann K, Kling N, Jiang X, Rothaus K, Cryer CW, et al. Three-dimensional architecture of the left ventricular myocardium. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006; 288:565-578.

171. Yokoyama H, Averill D B, Brosnihan K B, Smith RD, Schiffrin EL, Ferrario CM. Role of blood pressure reduction in prevention of cardiac and vascular hypertrophy. *Am J of Hypertens.* 2005; 18:922-929.

172. Conde MV, Gonzalez MC, Quintana-Villamandos B, Abderrahim F, Briones AM, Condezo-Hoyos L ,et al. Liver growth factor treatment restores cell-extracellular matrix balance in resistance arteries and improves left ventricular hypertrophy in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301:H1153-1165.

173. Campos C, Guzman R, Lopez-Fernandez E, Casado A. Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: the CUPRACBCS assay. *Anal Biochem*. 2009; 392:37-44.

174. Hissin PJ, Hilf RA. Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Anal. Biochem*. 1976; 74:214-226.

175. Saleh L, Plieth CA. Coelenterazine-Based Luminescence Assay to Quantify High-Molecular-Weight Superoxide Anion Scavenger Activities. *Nat Protoc*. 2010; 5(10):1635-1641.

176. Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S, Selvi E, Colombo G, Milzani A, et al. Protein thiolation index (PTI) as a biomarker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2012; 53:907-915.

177. Colombo G, Reggiani F, Podestà MA, Garavaglia ML, Portinaro NM, Milzani A, et al. Plasma protein thiolation index (PTI) as a biomarker of thiol-

specific oxidative stress in haemodialyzed patients. *Free Radic Biol Med.* 2015; 89:443-451.

178. Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues JV, Marcos JC. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem* 2014; 458: 69-71.

179. Veglia F, Cavalca V, Tremoli E. OXY-SCORE: A Global Index to Improve Evaluation of Oxidative Stress by Combining Pro-and Antioxidant Markers. *Methods Mol Biol.* 2010; 594:197-213.

180. Brooks WW, Conrad CH, Robinson KG, Colucci WS, Bing OH. L-arginine fails to prevent ventricular remodeling and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 2009; 22:228-234.

181. Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, Wu DJ, Hamashima Y, Kawai C. Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1986; 55:575-581.

182. Xu Q, Chakravorty A, Bathgate RA, Dart AM, Du XJ. Relaxin therapy reverses large artery remodeling and improves arterial compliance in senescent spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2010; 55:1260-1266.

183. Cebova M, Kristek F. Age-dependent ultrastructural changes of coronary artery in spontaneously hypertensive rats. *Gen Physiol Biophys.* 2011; 30:364-

372.

184. Koprđova R, Cebova M, Kristek F. Long-term effect of losartan administration on blood pressure, heart and structure of coronary artery of young spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res* 2009; 58:327-335.

185. Thybo NK, Korsgaard N, Eriksen S, Christensen KL, Mulvany MJ. Dose-dependent effects of perindopril on blood pressure and small-artery structure. *Hypertension*. 1994; 23:659-666.

186. Neglia D, Fommei E, Varela-Carver A, Mancini M, Ghione S, Lombardi M, et al. Perindopril and indapamide reverse coronary microvascular remodelling and improve flow in arterial hypertension. *J Hypertens*. 2011; 29:364-372.

187. Barone FC, Campbell WG, Jr., Nelson AH, Feuerstein GZ. Carvedilol prevents severe hypertensive cardiomyopathy and remodeling. *J Hypertens*. 1998; 16:871-884.

188. Rey FE, Pagano PJ. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular functio. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:1962-1971.

189. Deegan R, Wood AJ. Beta-receptor antagonism does not fully explain esmolol-induced hypotension. *Clin Pharmacol Ther*. 1994; 56:223-228.

190. Husken BC, van der Wal AC, Teeling P, Mathy MJ, Mertens MJ, Pul AJ,

et al. Heterogeneity in morphological characteristics of coronary arteries and aortae in various models of hypertension. *Blood Press.* 1997; 6:242-249.

191. Su W, Guo Z, Deschepper CF, Randall DC, Gong MC. Dissociation of coronary artery contractile hyperreactivity from hypertension. *Am J Hypertens.* 2003; 16:570-576.

192. Vazquez-Perez S, Navarro-Cid J, de las Heras N, Cediél E, Sanz-Rosa D, Ruilope LM, et al. Relevance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the effects of hypertension on rat coronary relaxations. *J Hypertens.* 2001; 19:539-545.

193. Roque FR, Briones AM, Garcia-Redondo AB, Galán M, Martínez-Revelles S, Avendaño MS, et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. *Br J Pharmacol.* 2013; 168: 686-703.

194. Bernatova I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *Biomed Res Int* 2014; 2014:598271.

195. Guiraudou P, Pucheu S C, Gayraud R, Gautier P, Roccon A, Herbert JM, et al. Involvement of nitric oxide in amiodarone- and dronedarone-induced coronary vasodilation in guinea pig heart. *Eur J Pharmacol.* 2004; 496:119-127.

196. Heusch G. Heart rate in the pathophysiology of coronary blood flow and

myocardial ischaemia: benefit from selective bradycardic agents. *Br J Pharmacol.* 2008; 153:1589-601.

197. Heusch G, Baumgart D, Camici P, Chilian W, Gregorini L, Hess O. α -adrenergic coronary vasoconstriction and myocardial ischemia in humans. *Circulation.* 2000; 10: 689-694.

198. Bukowska A, Hammwöhner M, Sixdorf A, Schild L, Wiswedel I, Röhl FW, et al. Dronedarone prevents microcirculatory abnormalities in the left ventricle during atrial tachypacing in pigs. *Br J Pharmacol.* 2012; 166:964-980.

199. Davy JM, Herold M, Høglund C, Timmermans A, Alings A, Radzik D, et al. ERATO Study Investigators. Dronedarone for the control of ventricular rate in permanent atrial fibrillation: the Efficacy and safety of dRonedArone for the cOntrol of ventricular rate during atrial fibrillation (ERATO) study. *Am Heart J.* 2008; 156(3):527.e1-9.

12 Índice de figuras y tablas

Índice de figuras

- ❖ Fig.1.- Estructura de la pared arterial.
- ❖ Fig.2.- Funciones del óxido nítrico según lugar de síntesis.
- ❖ Fig.3.- Síntesis del NO.
- ❖ Fig.4.- Esquema que muestra el origen y función de la arginina-dimetil-asimétrica o ADMA.
- ❖ Fig.5.- Estructura química de la dronedarona y de la amiodarona.
- ❖ Fig.6.- Acciones de la dronedarona.
- ❖ Fig.7.- Medición de la presión arterial sistólica mediante pletismografía.
- ❖ Fig.8.- Foto del miógrafo de alambre usado y detalle del montaje de un segmento de arteria coronaria descendente anterior.
- ❖ Fig.9.- Ejemplo de las curvas obtenidas tras la contracción arterial al administrar dosis crecientes de serotonina.
- ❖ Fig.10.- Análisis histológico de diversos parámetros estructurales de la arteria intramiocárdica (arteria marginal) del ventrículo izquierdo de rata.
- ❖ Fig.11.- Cortes histológicos representativos de la arteria intramiocárdica del ventrículo izquierdo.
- ❖ Fig.12.- Cortes histológicos representativos de la arteria intramiocárdica del ventrículo izquierdo (densidad de colágeno).
- ❖ Fig.13.- Valores medidos por microscopía confocal de la arteria coronaria descendente anterior de WKY, SHR y SHR-D.
- ❖ Fig.14.- Imágenes representativas de cortes transversales de la arteria coronaria descendente anterior (microscopía confocal).

- ❖ Fig.15.- Valores medidos por microscopía confocal en la capa media (o muscular) de la arteria coronaria descendente anterior.
- ❖ Fig.16.- Imágenes representativas de los núcleos celulares de la capa media de la arteria coronaria descendente anterior.
- ❖ Fig.17.- Valores medidos por microscopía confocal en la capa adventicia de la arteria coronaria descendente anterior.
- ❖ Fig.18.- Imágenes representativas de los núcleos celulares de la capa adventicia de la arteria coronaria descendente anterior.
- ❖ Fig.19.- Respuesta vasodilatadora de la arteria coronaria descendente anterior (DA) a concentraciones crecientes de Ach.
- ❖ Fig.20.- Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de Ach.
- ❖ Fig.21.- Respuesta vasodilatadora de la arteria coronaria descendente anterior (DA) a concentraciones crecientes de NPS.
- ❖ Fig.22.- Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de NPS.
- ❖ Fig.23.- Respuesta vasoconstrictora de la arteria coronaria descendente anterior (DA) a concentraciones crecientes de 5-HT.
- ❖ Fig.24.- Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de 5-HT.
- ❖ Fig.25.- Análisis de biomarcadores de estrés oxidativo (carbonilos, TAC, GSH y Actividad SOD).
- ❖ Fig.26.- Análisis de biomarcadores de estrés oxidativo (tioles, proteína tioladas y PTI).
- ❖ Fig.27.- Resultados del Oxy-Score.

Índice de tablas

- ❖ Tabla 1. Recomendaciones de uso de la dronedarona.
- ❖ Tabla2. Distribución del número de animales por grupos experimentales.
- ❖ Tabla 3. Peso, frecuencia cardiaca, presión arterial de los tres grupos