

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Prolongación en el tiempo del efecto del esmolol sobre la  
regresión del remodelado coronario en ratas espontáneamente  
hipertensas**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Raquel Martín Oropesa**

**Directoras**

**María Begoña Quintana Villamandos**  
**María del Carmen González García**

**Madrid**

**© Raquel Martín Oropesa, 2021**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

Prolongación en el tiempo del efecto del esmolol sobre la regresión del remodelado coronario en ratas espontáneamente hipertensas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Raquel Martín Oropesa

DIRECTOR

María Begoña Quintana Villamandos

y

María del Carmen González García

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa de Doctorado en Investigación Biomédica**



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

TESIS DOCTORAL

**Prolongación en el tiempo del efecto del esmolol  
sobre la regresión del remodelado coronario en  
ratas espontáneamente hipertensas**

PRESENTADA POR

**Raquel Martín Oropesa**

DIRECTORES

María Begoña Quintana Villamandos

María del Carmen González García

**Madrid, 2021**

## **AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN**

**María Begoña Quintana Villamandos**, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado del Departamento de Farmacología y Toxicología 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: *“Prolongación en el tiempo del efecto del esmolol sobre la regresión del remodelado coronario en ratas espontáneamente hipertensas”*, presentado por Doña Raquel Martín Oropesa, graduada en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, 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 4 de junio del año 2021.

M<sup>a</sup> Begoña Quintana Villamandos

M<sup>a</sup> Carmen González García

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

## **Declaración de conflicto de intereses**

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

*A mi familia, la presente y la que está por venir.*

## AGRADECIMIENTOS

No podría comenzar de otra manera que expresando mi eterno agradecimiento a todos los que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, especialmente:

A mis directoras de Tesis, M<sup>a</sup> Begoña Quintana Villamandos y M<sup>a</sup> Carmen González García, que con su ejemplo y su dedicación me han acompañado y guiado en este proceso. Gracias por hacer que los momentos de dificultad sean más llevaderos de vuestra mano.

A mis padres, porque sin ellos no habría logrado ni este ni el resto de logros a lo largo de mi vida, y a mi hermana, mi incondicional.

A Efraín, que ha sabido acompañarme, escucharme con amor y paciencia, y recordarme mis capacidades y fortalezas cuando yo las olvidaba.

A Ana y a Laia, mis predecesoras, mis maestras en el laboratorio, mis correctoras de discursos antes de los congresos y mis confesoras en los momentos más duros. Y a Isabel, que recoge el testigo y que sin duda será una digna sucesora de esta saga de valientes.

A Pilar, por su dedicación, su profesionalidad, su alegría y su disposición siempre a ayudar en todo, y a la Dra Silvia Arribas, que me enseñó con paciencia el maravilloso mundo de la microscopía confocal.

Y por último, gracias a todos los que quizás con una simple escucha, me han animado a continuar adelante durante estos años.

*Gracias, de corazón.*

# ***ÍNDICE***

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>16</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>19</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>22</b>
1.1. PROBLEMA CLÍNICO: HIPERTENSIÓN ARTERIAL .....	23
1.1.1. Definición de hipertensión arterial .....	23
1.1.2. Tipos de hipertensión arterial .....	24
1.1.3. Órganos diana en la hipertensión arterial .....	25
1.1.3.1. Cardiopatía hipertensiva .....	25
1.1.3.2. Otros órganos afectados .....	28
1.1.4. Tratamiento de la hipertensión arterial.....	31
1.2. REMODELADO VASCULAR HIPERTENSIVO .....	37
1.2.1. Definición de remodelado vascular .....	37
1.2.2. Clasificación del remodelado vascular .....	38
1.2.3. Aspectos fisiopatológicos y moleculares del remodelado vascular .....	40
1.2.4. Relevancia clínica del remodelado vascular .....	53
1.2.5. Índice de remodelado arterial .....	54
1.3. FÁRMACOS BETABLOQUEANTES .....	57
1.3.1. Farmacología básica.....	57
1.3.2. Aplicabilidad clínica.....	69
1.3.3. Contraindicaciones y efectos adversos de los $\beta$ -bloqueantes .....	72
1.3.4. Clorhidrato de esmolol .....	74
1.3.4.1. Farmacocinética y farmacodinamia.....	74
1.3.4.2. Indicaciones y contraindicaciones .....	77
1.3.4.3. Interacciones y efectos secundarios.....	77
1.3.4.4. Clorhidrato de esmolol en la práctica clínica.....	78
1.4. REGRESIÓN DEL REMODELADO VASCULAR HIPERTENSIVO .....	80
1.4.1. Tratamiento farmacológico del remodelado vascular hipertensivo .....	81
1.4.2. Permanencia en el tiempo del efecto farmacológico en la regresión del remodelado vascular hipertensivo .....	87
1.5. SHR: MODELO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL PRIMARIA EN HUMANOS .....	90
1.6. JUSTIFICACIÓN .....	94
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>96</b>
2.1. HIPÓTESIS .....	97
2.2. OBJETIVOS .....	97
2.3. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO .....	98
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>101</b>
3.1. MATERIAL .....	102
3.1.1. Animal de experimentación .....	102
3.1.2. Fármaco .....	104
3.1.3. Material anestésico y quirúrgico .....	104
3.1.4. Material para el estudio fisiológico.....	105
3.1.5. Material de estudio de la estructura arterial: microscopía confocal .....	106
3.1.6. Material de estudio de la función arterial: miógrafo de alambre.....	106
3.1.7. Material para el estudio del estrés oxidativo plasmático .....	106
3.2. MÉTODOS .....	108
3.2.1. Método anestésico y quirúrgico .....	108

3.2.2.	Método del estudio fisiológico .....	109
3.2.3.	Método del estudio de la estructura arterial.....	110
3.2.4.	Método del estudio de la función arterial .....	114
3.2.4.1.	Respuesta vasodilatadora endotelio dependiente.....	115
3.2.4.2.	Respuesta vasoconstrictora.....	116
3.2.4.3.	Respuesta vasodilatadora endotelio independiente.....	116
3.2.5.	Medición de parámetros de estrés oxidativo .....	117
3.2.5.1.	Glutación reducido (GSH) .....	117
3.2.5.2.	Nitratos plasmáticos.....	119
3.2.5.3.	Peroxidación lipídica (MDA + HNE) .....	121
3.2.5.4.	Proteínas carboniladas .....	123
3.2.6.	Método estadístico .....	125
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>127</b>
4.1.	EFFECTO DEL ESMOLOL SOBRE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y SU PERMANENCIA EN EL TIEMPO .....	128
4.2.	EFFECTO DEL ESMOLOL SOBRE LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA ARTERIA CORONARIA Y SU PERSISTENCIA EN EL TIEMPO .....	130
4.3.	EFFECTO DEL ESMOLOL SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR DE LA ARTERIA CORONARIA Y SU PERMANENCIA EN EL TIEMPO .....	142
4.3.1.	Efecto del esmolol tras 48h del tratamiento .....	142
4.3.2.	Permanencia del efecto tras 1 semana.....	146
4.3.3.	Permanencia del efecto tras 1 mes.....	150
4.4.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESMOLOL SOBRE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y SU PERMANENCIA EN EL TIEMPO .....	154
4.4.1.	Biomarcadores plasmáticos antioxidantes .....	154
4.4.2.	Biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo .....	155
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>158</b>
5.1.	MANTENIMIENTO DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA ARTERIA CORONARIA INDUCIDOS POR ESMOLOL.....	162
5.2.	MANTENIMIENTO DE LOS CAMBIOS SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR CORONARIA INDUCIDOS POR ESMOLOL.....	164
5.3.	MANTENIMIENTO DE LOS CAMBIOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDOS POR ESMOLOL.....	167
5.4.	DÓNDE ESTÁBAMOS Y A DÓNDE NOS DIRIGIMOS.....	171
5.5.	LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO .....	172
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>174</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>176</b>
<b>8.</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	<b>201</b>

# ***ABREVIATURAS***

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Calcio intracelular
<b>4-HNE</b>	4-hidroxinoneal
<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina o serotonina
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>ADMA</b>	Dimetilarginina asimétrica
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADR-α</b>	Receptores adrenérgicos α
<b>ADR-β</b>	Receptores adrenérgicos β
<b>AI</b>	Aurícula izquierda
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1
<b>ARA II</b>	Antagonista del receptor de angiotensina-II
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AT<sub>1</sub>R</b>	Receptor de angiotensina II-subtipo 1
<b>AT<sub>2</sub>R</b>	Receptor de angiotensina II-subtipo 2
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATPasa</b>	Adenosintrifosfatasa
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CAM</b>	Moléculas de adhesión celular
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CSA</b>	<i>“Cross-Sectional Area”</i>
<b>DAPI</b>	4'-6-diamino-2-fenilindol
<b>DDAH</b>	Dimetilarginina dimetil-aminohidrolasa
<b>DE</b>	Diámetro externo del vaso
<b>DI</b>	Diámetro interno del vaso
<b>DNP</b>	Grupo dinitrodenilo
<b>DNPH</b>	Dinitrofenilhidrazina
<b>DOCA (ratas)</b>	Ratas tratadas con acetato de desoxicorticosterona

<b>EAP</b>	Edema agudo de pulmón
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>FC</b>	Frecuencia cardíaca
<b>FFHR</b>	<i>“Fructose-fed Hypertensive Rat”</i>
<b>GMPc</b>	Guanosín monofosfato cíclico
<b>GP</b>	Grosor de la pared vascular
<b>GP/DI</b>	Índice grosor de pared/diámetro interno del vaso
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>HVI</b>	Hipertrofia de ventrículo izquierdo
<b>IAM</b>	Infarto agudo de miocardio
<b>ICFSP</b>	Insuficiencia cardíaca con función sistólica preservada
<b>IECA</b>	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>K<sup>+</sup>-KHS</b>	Solución de Krebs-Henseleit con alto potasio
<b>KHS</b>	Solución de Krebs-Henseleit
<b>MCP-1</b>	Proteína humana quimioatrayente de monocitos-1
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
<b>MR</b>	Receptor de mineralocorticoides
<b>MT-MMP</b>	Metaloproteasas de membrana
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NADPH-oxidasa</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa
<b>NED</b>	N-1-naftil-etilenediamina diclorhidrato

<b>NEM</b>	N-etilmaleimida
<b>NF-κB</b>	Factores de transcripción nuclear Kappa B
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitritos
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitratos
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>NPS</b>	Nitropusiato
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OH•</b>	Radical hidroxilo
<b>OPT</b>	O-ftalaldehído
<b>PA</b>	Presión arterial
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del plasminógeno-1
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>PKA</b>	Proteín-kinasa A
<b>PR</b>	Periodo refractario
<b>PUFA</b>	Ácidos grasos poliinsaturados ω-6
<b>REDOX</b>	Reacciones de óxido-reducción
<b>REVERT</b>	<i>“Reversal of Ventricular Remodeling with Toprol-XL trial”</i>
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SHR</b>	Rata espontáneamente hipertensa ( <i>“Spontaneously Hypertensive Rat”</i> )
<b>SHR-E</b>	<i>“Spontaneously Hypertensive Rat”</i> tratada con esmolol
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SOSA</b>	Actividad superóxido dismutasa ( <i>“Superoxide Anion Scavenging Activity”</i> )

<b>SPSHR</b>	Rata espontáneamente hipertensa con propensión al accidente cerebrovascular (“Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats”)
<b>SRAA</b>	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
<b>T3</b>	Triyodotirosina
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento tisular $\beta$
<b>VI</b>	Ventrículo izquierdo
<b>WKY</b>	Ratas Wistar-Kyoto

# ***RESUMEN***

La hipertensión arterial es responsable del remodelado tanto cardíaco como vascular, dando lugar a eventos adversos cardíacos, tales como arritmias, insuficiencia cardíaca o infarto agudo de miocardio, aumentando la morbimortalidad. Son varios los fármacos antihipertensivos que han demostrado ser capaces de revertir dicho remodelado mejorando así el pronóstico de los pacientes, pero su efecto beneficioso aparece tras meses o incluso años de tratamiento continuado. El esmolol es un fármaco que pertenece al grupo de beta-bloqueantes cardioselectivos con ciertas peculiaridades farmacocinéticas, con efecto cronotrópico negativo y un importante efecto hipotensor ultrarrápido y potente, ampliamente utilizado en la práctica clínica habitual.

En un estudio previo realizado en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), nuestro grupo demostró que el tratamiento con esmolol durante únicamente 48 horas es capaz de revertir el remodelado vascular en las arterias coronarias, tanto a nivel funcional como estructural, convirtiéndose en el primer fármaco capaz de producir dicho efecto de una manera tan precoz (1). Basándonos en estos hallazgos, diseñamos el presente trabajo experimental con el objetivo principal de investigar si dichos efectos beneficiosos en el remodelado coronario de las SHR se mantenían en el tiempo una vez finalizado el tratamiento con esmolol durante 48 horas.

Los resultados obtenidos muestran que el esmolol mantiene su efecto positivo sobre el remodelado vascular coronario a los 7 días y al mes de haber finalizado el tratamiento, comprobándolo en los siguientes parámetros: 1º) reducción del grosor

de pared a expensas principalmente de la capa media; 2º) normalización de la reactividad vascular, mejorando la vasodilatación y limitando la vasoconstricción; 3º) mejorando el perfil de estrés oxidativo, con aumento de los antioxidantes y disminución de los oxidantes en plasma.

El presente estudio muestra que el efecto del esmolol sobre el remodelado vascular permanece en el tiempo una vez finalizado el tratamiento en un modelo experimental de ratas espontáneamente hipertensas.

# ***SUMMARY***

Hypertension is responsible for both cardiac and vascular remodeling, leading to adverse cardiac events, such as arrhythmias, heart failure or acute myocardial infarction, increasing morbidity and mortality. There are several antihypertensive drugs that have been shown their ability to reverse this remodeling, thus improving the prognosis of patients, but their beneficial effect appears after months or even years of continuous treatment. Esmolol is a drug that belongs to the group of cardioselective beta-blockers with certain pharmacokinetic peculiarities, with a negative chronotropic effect and an important ultra-rapid and powerful hypotensive effect, widely used in routine clinical practice.

In a previous study carried out in spontaneously hypertensive rats (SHR), our group showed that treatment with esmolol for only 48 hours is capable of reversing vascular remodeling in the coronary arteries, both at a functional and structural level, becoming the first drug capable of to produce this effect in such an early way (1). Based on these findings, we designed the present experimental work with the main objective of investigating whether these beneficial effects on coronary remodeling of SHR were maintained over time after the end of treatment with esmolol for 48 hours.

The results obtained show that esmolol maintains its positive effect on coronary vascular remodeling at 7 days and a month after the end of the treatment, verifying it in the following parameters: 1st) reduction in wall thickness mainly at the expense of the middle layer; 2nd) normalization of vascular reactivity, improving

vasodilation and limiting vasoconstriction; 3rd) improving the oxidative stress profile, with an increase in antioxidants and a decrease in oxidants in plasma.

The present study shows that the effect of esmolol on vascular remodeling remains in time after the end of treatment in an experimental model of spontaneously hypertensive rats.

# ***1. INTRODUCCIÓN***

## **1.1. PROBLEMA CLÍNICO: HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

### **1.1.1. Definición de hipertensión arterial**

La hipertensión arterial (HTA) es un síndrome cardiovascular progresivo que se caracteriza por la elevación persistente de la presión arterial por encima de los valores que se establecen como normales (presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg y diastólica  $\geq 90$  mmHg). Su progresión está relacionada con alteraciones funcionales y estructurales a nivel cardíaco y vascular que dañan el corazón, los riñones, el sistema nervioso central, los vasos y otros órganos, y conduce a la morbilidad y mortalidad prematura (2).

La prevalencia global de la hipertensión se estima en 1.13 billones en 2015, con una prevalencia aproximada de 150 millones en el centro y este de Europa. La prevalencia global en adultos es de 30 al 45%, con una prevalencia estandarizada por edad de 24% en hombres y del 20% en mujeres. Estos datos son constantes en todo el mundo, independientemente del estatus económico. La hipertensión se hace más común en edades avanzadas, con una prevalencia de  $>60\%$  en personas mayores de 60 años (5), y su frecuencia se iguala entre hombres y mujeres a partir de los 75 años (4). En España, la prevalencia global es de casi el 42% según datos del Instituto Nacional de Estadística.

Es el primer factor de riesgo relacionado con la mortalidad y el tercero más importante como contribuyente a la discapacidad en todo el mundo (3). Es importante destacar que a pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento en

los últimos 30 años, la discapacidad asociada a la hipertensión ha aumentado un 40% desde 1990 (5).

### 1.1.2. Tipos de hipertensión arterial

En la mayoría de los pacientes con presión arterial elevada no se puede identificar ninguna causa que la produzca, lo que se conoce como hipertensión arterial primaria. Este tipo de hipertensión constituye el 95% de los casos, y se cree que puede deberse a varios procesos aún no identificados con una base genética.

El término hipertensión secundaria se utiliza cuando existe un mecanismo subyacente identificable como causante de la hipertensión (estenosis de la arteria renal, feocromocitoma, coartación de aorta...), y sólo se corresponde con el 5% de los casos de hipertensión.

Basándonos en las cifras tensionales, las últimas guías de manejo de la hipertensión arterial publicadas en 2018 por la Sociedad Europea de Cardiología, establece varios grupos (5):

- Presión arterial óptima: presión arterial sistólica <120 mmHg y presión arterial diastólica <80 mmHg.
- Presión arterial normal: presión arterial sistólica 120-129 mmHg y/o presión arterial diastólica 80-84 mmHg.
- Presión arterial normal-elevada: presión arterial sistólica entre 130-139 mmHg y/o presión arterial diastólica 85-89 mmHg.

- Hipertensión grado 1: presión arterial sistólica entre 140-159 mmHg y/o presión arterial diastólica entre 90-99 mmHg.
- Hipertensión grado 2: presión arterial sistólica 160-179 mmHg y/o presión arterial diastólica 100-109 mmHg.
- Hipertensión grado 3: presión arterial sistólica  $\geq 180$  mmHg y/o presión arterial diastólica  $\geq 110$  mmHg.
- Hipertensión sistólica aislada: presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg y presión arterial diastólica  $< 90$  mmHg.

### **1.1.3. Órganos diana en la hipertensión arterial**

#### **1.1.3.1. Cardiopatía hipertensiva**

La presión arterial es el producto del gasto cardíaco y las resistencias vasculares periféricas. En los estadios más iniciales de la enfermedad, la presión arterial se mantiene elevada a expensas, fundamentalmente, del aumento de la actividad simpática y del gasto cardíaco (6, 7). Esto se explica por un desbalance del sistema nervioso simpático y el parasimpático con predominio del primero, cuya causa es desconocida (6). Si el mal control de las cifras tensionales se mantiene, la enfermedad progresa hacia una segunda fase en la que el gasto cardíaco se normaliza (6) y, para mantener presiones intravasculares elevadas, se produce el aumento de las resistencias vasculares periféricas totales (8). En su última fase, el gasto cardíaco finalmente disminuye, al igual que lo hace el volumen sistólico.

Ese incremento de las resistencias vasculares favorece el que exista una postcarga elevada del ventrículo izquierdo (VI) que, mantenida de forma crónica,

va a producir en el VI una hipertrofia e, indirectamente, una alteración de la relajación o de la capacidad de llenado ventricular, además de dilatación de la aurícula izquierda (AI) y aumento del riesgo de padecer arritmias, especialmente fibrilación auricular (5). Esta alteración estructural se conoce como “insuficiencia cardíaca diastólica” o “insuficiencia cardíaca con función sistólica preservada” (ICFSP). Con el tiempo, el VI se adapta a las presiones intracavitarias elevadas mediante el desarrollo de una miocardiopatía hipertensiva dilatada que, de acuerdo con la ley de Frank-Starling, conduce a disfunción sistólica, congestión venosa retrógrada y edema agudo de pulmón (EAP).

La disfunción sistólica y diastólica del corazón, la hipertrofia del VI, la coronariopatía y las alteraciones en el sistema de conducción del impulso eléctrico, forman parte de la llamada “cardiopatía hipertensiva”, que es consecuencia de la HTA mantenida a largo plazo. Si no se realiza un tratamiento adecuado, esta entidad evolucionará hasta la aparición de síntomas y signos de insuficiencia cardíaca. Por tanto, detectar de manera precoz la cardiopatía hipertensiva es un objetivo primordial para iniciar cuanto antes tratamiento en los pacientes de riesgo y que con ello mejore el pronóstico (9).

La base anatómo-fisiológica de la cardiopatía hipertensiva es la hipertrofia de ventrículo izquierdo (HVI). Inicialmente, se trata de un mecanismo de adaptación del VI a las excesivas presiones intravasculares, sin embargo, con el tiempo, ha demostrado ser un factor de riesgo independiente para padecer eventos cardiovasculares y aumentar la mortalidad (10, 11), de tal manera que el riesgo de

mortalidad es entre 1,5 a 6,8 veces superior en los pacientes hipertensos que presenten además signos de HVI en el electrocardiograma frente a los que no los presentan (12).

Su diagnóstico se basa, fundamentalmente, en la ecografía, y su prevalencia aumenta con la edad: 10-20% en menores de 55 años y hasta un 20-60% en mayores de 60 años (13).

Otro factor que influye en la prevalencia de la HVI, además de la edad, es la gravedad de la hipertensión arterial: 12-30% en hipertensión leve-moderada y hasta un 90% en casos de hipertensión grave (14). El riesgo de presentar eventos cardiovasculares adversos aumenta hasta un 40% por cada 39 g/m<sup>2</sup> de aumento de la HVI (15).

Durante los últimos años, numerosos estudios tanto experimentales como clínicos, han ido encaminados a identificar los mecanismos y las diferentes opciones terapéuticas que consigan producir una regresión de la HVI.

En esta línea, son diversos los fármacos antihipertensivos que han sido estudiados: antagonistas del receptor de angiotensina II-subtipo 1 (ARA II), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), bloqueadores del receptor  $\beta$ -adrenérgico ( $\beta$ -bloqueantes), antagonistas del calcio y diuréticos.

Todos ellos, en mayor o menor medida, consiguen revertir la HVI gracias a la regresión del remodelado.

Centrándonos en concreto en los  $\beta$ -bloqueantes, existe el estudio aleatorizado REVERT (acrónimo en inglés de “Reversal of Ventricular Remodeling with Toprol-XL trial”) (16) que evalúa el efecto del tratamiento crónico con metoprolol en pacientes que presentan disfunción sistólica del VI asintomática. Los resultados demuestran una reducción de los volúmenes telesistólico y telediastólico, además de un aumento en la fracción de eyección del VI, en el grupo de pacientes tratados con metoprolol. Por tanto, el metoprolol ejercería un efecto cardioprotector frente a la progresión del remodelado ventricular y protegería frente a la progresión de la insuficiencia cardíaca sintomática.

Siguiendo en la línea de estudio de los  $\beta$ -bloqueantes, nuestro grupo de investigación también demostró que el esmolol, un  $\beta$ -bloqueante cardioselectivo de acción ultrarrápida, es capaz de revertir la HVI en el modelo experimental de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Lo novedoso con respecto al resto de estudios, es que este efecto se produce de manera muy precoz, tras haber administrado el fármaco únicamente durante 48h (17).

### **1.1.3.2. Otros órganos afectados**

La hipertensión arterial crónica produce daño no solo a nivel cardíaco, sino también a nivel renal, sistema nervioso central y vascular.

- Afectación renal

La hipertensión arterial constituye la segunda causa más importante de enfermedad renal crónica, por detrás de la diabetes mellitus. La hipertensión también puede ser el modo de presentación de una enfermedad renal primaria. La forma más común de detectar una alteración en la función renal, es con la elevación de la creatinina sérica. El diagnóstico se realiza al encontrar una función renal disminuida y/o albuminuria. La reducción progresiva del filtrado glomerular y el incremento de la albuminuria, son indicativos de una pérdida progresiva de la función renal y ambos, son predictores independientes del aumento del riesgo cardiovascular y de la progresión de la enfermedad renal (5).

La insuficiencia renal, definida como un filtrado glomerular estimado  $<60$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, puede afectar al 36% de los pacientes con hipertensión arterial primaria. La presencia de hipertensión arterial es un factor de riesgo asociado a la progresión de la enfermedad renal crónica, de manera independiente a la función renal basal, la edad y la excreción urinaria de albúmina.

La nefropatía vascular es el término utilizado para englobar a todos los trastornos renales asociados a patología vascular relacionados con la hipertensión arterial o con la arteriosclerosis (18). La enfermedad renal que aparece asociada a la hipertensión arterial primaria afecta principalmente a la microvascularización preglomerular. El incremento de la presión intraglomerular junto con la presencia de proteinuria son elementos patogénicos directamente relacionados con la hipertensión arterial y la progresión del daño renal (19).

- Sistema nervioso central

El accidente vascular cerebral representa la tercera causa de muerte en la sociedad occidental, únicamente superada por la patología cardíaca y el cáncer, y es responsable de uno de los mayores índices de incapacidad física e intelectual. Sin considerar la edad, la hipertensión arterial es el factor de riesgo más importante relacionado con la patología vascular cerebral. Las complicaciones cerebrovasculares son una de las principales causas de mortalidad en los pacientes hipertensos (20). La hipertensión arterial aumenta la prevalencia de daño cerebral, dentro del cual, el accidente isquémico transitorio y el infarto cerebral son las manifestaciones clínicas más graves.

En la fase asintomática, el daño cerebral causado por la hipertensión, se puede demostrar con el hallazgo de hiperintensidad de la sustancia blanca en una resonancia magnética nuclear, microinfartos silentes en pequeños vasos, microhemorragias y atrofia cerebral. La hiperintensidad de la sustancia blanca y los infartos silentes están asociados con un incremento del riesgo de infarto y deterioro cognitivo debido a demencia vascular (5).

Las alteraciones que se han relacionado con una afectación cerebral precoz asociada a la hipertensión pueden ser de tipo funcional (disminución del flujo sanguíneo cerebral, aumento del tono cerebrovascular distal, disminución de la reserva hemodinámica cerebral, deterioro cognitivo incipiente), o de tipo estructural (remodelado vascular, infartos lacunares, lesión de la sustancia blanca) (20).

- Sistema vascular

Los cambios hemodinámicos y humorales que se producen en la hipertensión arterial, afectan a la morfología y a la función de la pared vascular, modificándola en todas sus capas y dando lugar a lo que se denomina enfermedad vascular hipertensiva, que se traduce clínicamente como arteriosclerosis y sus consecuencias en órganos diana (isquemia miocárdica, accidente cerebrovascular e insuficiencia renal). El endotelio vascular normal proporciona un entorno antiaterogénico, pero cuando se altera, se producen modificaciones fenotípicas de las células endoteliales que propician un ambiente vasoespástico, protrombótico y proinflamatorio (21).

#### **1.1.4. Tratamiento de la hipertensión arterial**

Existen dos estrategias establecidas para disminuir la presión arterial: las intervenciones en el estilo de vida y el tratamiento farmacológico.

Aunque los cambios en el estilo de vida pueden ayudar, la mayoría de pacientes hipertensos van a requerir tratamiento farmacológico.

Varios metaanálisis han demostrado que la reducción de la presión arterial sistólica en 10 mmHg o la reducción de la diastólica en 5 mmHg, está asociada a una disminución significativa (alrededor de un 20%) de los eventos cardiovasculares mayores, de la mortalidad por todas las causas (10-15%), del infarto cerebral (35%), de los eventos coronarios (20%) y del fallo cardíaco (40%).

Esta reducción del riesgo relativo es constante e independiente de la presión arterial basal, de los riesgos cardiovasculares asociados, de las comorbilidades, de la edad, del sexo o de la etnia.

#### 1. Cambios en el estilo de vida:

Los cambios en el estilo de vida pueden ser suficientes para retrasar o evitar la necesidad de terapia farmacológica en pacientes con hipertensión arterial de grado 1, sin embargo, no deben retrasar el inicio de la terapia con fármacos en pacientes con daño orgánico debido a la hipertensión o con riesgo cardiovascular elevado (5).

Las recomendaciones que se recogen en las últimas guías europeas incluyen:

- Restricción del consumo de sodio en la dieta.
- Moderar el consumo de alcohol.
- Consumo de una dieta equilibrada que contenga vegetales, legumbres, fruta fresca, pescado, ácidos grasos insaturados (especialmente aceite de oliva) y reducir el consumo de carnes rojas y ácidos grasos saturados.
- Reducción de peso corporal.
- Realizar actividad física de manera regular.
- Abandonar el consumo de tabaco.

#### 2. Terapia farmacológica:

La mayor parte de los pacientes van a necesitar tratamiento farmacológico además de los cambios en el estilo de vida para conseguir un control óptimo de la

presión arterial. Se recomiendan 5 grupos de fármacos, basándose en su capacidad de probar la reducción de la presión arterial, la capacidad de disminuir los eventos cardiovasculares en estudios controlados con placebo, y haber demostrado su equivalencia en términos de morbilidad y mortalidad de causa cardiovascular.

El utilizar un grupo u otro, dependerá entre otras cosas, de las condiciones y comorbilidad del paciente. Los cinco grupos terapéuticos utilizados en la actualidad son:

- Bloqueadores del sistema renina-angiotensina: Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA) y de los Receptores de Angiotensina II (ARA II)

Tanto los IECA como los ARA II actúan sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Mientras que los IECA inhiben la conversión de angiotensina I en angiotensina II, los ARA II bloquean la unión de esta a los receptores tipo 1 de la angiotensina II (presente en numerosos tejidos como el músculo liso, la glándula suprarrenal o el miocardio) y como consecuencia, evitan su efecto vasopresor y liberador de aldosterona (22).

Ambos son dos de los grupos farmacológicos más utilizados para el tratamiento de la hipertensión, y los ARA II se asocian a un menor abandono del tratamiento a causa de efectos adversos. La combinación de ambos grupos no se realiza, ya que no aporta beneficios y provoca un aumento de efectos adversos renales.

Ambos grupos farmacológicos, reducen la albuminuria más que otros fármacos antihipertensivos, y son efectivos en el retraso de la enfermedad renal crónica diabética y no diabética. También parecen ser efectivos en la prevención e incluso la regresión del daño orgánico asociado a la hipertensión, tales como la hipertrofia de ventrículo izquierdo o el remodelado vascular. Ambos disminuyen la incidencia de fibrilación auricular al mejorar la función del VI y favorecer la regresión del remodelado estructural del mismo (5).

- Bloqueadores de canales de calcio

La acción farmacológica se debe a la inhibición de la entrada de calcio en las células a través de los canales L (“canales lentos”), interfiriendo así en el proceso de contracción muscular y en la transmisión del impulso nervioso. La dosis a la cual se administra, no interfiere con los “canales rápidos” de sodio, por tanto, son inhibidores muy selectivos. Su acción se limita a la musculatura lisa arterial, miocardio y fibras conductoras del impulso cardíaco.

Son ampliamente utilizados y presentan una efectividad similar a otros grupos de antihipertensivos. Tienen un efecto mayor en la reducción de infartos cerebrales, pero son menos efectivos en la prevención de la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida. Los bloqueadores de canales de calcio son un grupo heterogéneo de fármacos. Muchos ensayos clínicos han demostrado los beneficios al estudiar las dihidropiridinas (sobre todo amlodipino). Un pequeño número de ensayos clínicos ha comparado no dihidropiridinas (verapamilo y diltiazem) con otros fármacos, sin encontrar diferencias significativas en la eficacia.

- Diuréticos tiazídicos

Los diuréticos tiazídicos actúan inhibiendo el cotransporte de cloro y sodio en la membrana luminal del túbulo contorneado distal, bloqueándolo. Con ello se impide la reabsorción de sodio y cloruro. Además, tienen efecto vasodilatador directo.

Los diuréticos continúan siendo la piedra angular del tratamiento antihipertensivo desde su introducción en los años 60. Su efectividad en la prevención de la morbilidad y mortalidad cardiovascular ha sido confirmada con numerosos estudios. También parecen ser más efectivos que otros fármacos en la prevención de la insuficiencia cardíaca. Los diuréticos similares a las tiazidas (como la clortalidona y la indapamida), han demostrado ser más potentes que las clásicas tiazidas en la reducción de la presión arterial. Este grupo terapéutico sin embargo, es menos efectivo como agente antihipertensivo cuando la filtración glomerular es <30 mL/min. En dichos casos, los diuréticos de asa tipo furosemida o torasemida, pueden reemplazar a las tiazidas como fármacos antihipertensivos.

- Beta-bloqueantes

Este grupo farmacológico produce un bloqueo del receptor beta-adrenérgico, de tal forma que impide la unión de las catecolaminas y evita su estimulación, impidiendo así el aumento de la frecuencia cardíaca, de la presión arterial y de la contractilidad cardíaca. El efecto final, es la mejora del llenado cardíaco en la diástole y con ello, mejora de la función cardíaca y flujo sanguíneo en las arterias coronarias.

En numerosos ensayos clínicos y metaanálisis se ha demostrado que, comparado con placebo, los beta-bloqueantes reducen de manera significativa el riesgo de infarto cerebral, fallo cardíaco y evento cardiovascular mayor en los pacientes hipertensos. Los beta-bloqueantes han demostrado ser especialmente efectivos en el tratamiento de la hipertensión en determinadas situaciones, tales como angina, tras infarto agudo de miocardio o para el control de la frecuencia cardíaca.

## 1.2. REMODELADO VASCULAR HIPERTENSIVO

### 1.2.1. Definición de remodelado vascular

La pared vascular es un órgano activo constituido por la capa íntima (compuesta por células endoteliales), la capa media (compuesta por células musculares lisas) y la capa adventicia (compuesta por fibroblastos) (Fig.1). Todas ellas, interaccionan para formar un complejo autocrino-paracrino.

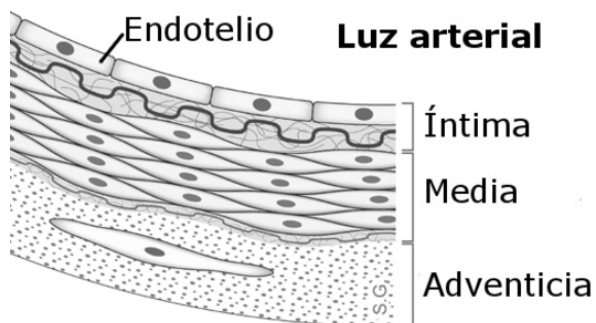


Figura 1: Corte transversal que muestra las capas de una arteria.

La pared del vaso es capaz de detectar señales en su entorno, que integra a través de la comunicación intercelular y, con la producción de mediadores locales tales como los factores de crecimiento locales o las sustancias vasoactivas, influye en la estructura y la función del vaso.

El término “remodelado vascular”, fue utilizado por primera vez por Baumbach y Heistad en sus estudios con arteriolas piales de ratas espontáneamente hipertensas propensas al accidente cerebrovascular (SPSHRs, acrónimo del inglés

“stroke-prone spontaneously hypertensive rats”). Este término describe la desorganización de los componentes de la pared vascular alrededor de un lumen disminuido (23).

En el año 1994, Gibbons (24) propuso que el remodelado vascular es un proceso activo, generalmente como respuesta adaptativa a los cambios mantenidos en las condiciones hemodinámicas, y se caracteriza por cambios estructurales que involucran a varios procesos como el crecimiento, la muerte, la proliferación y la migración celular, así como la producción y la degradación de sustancias de la matriz extracelular arterial, todo ello regulado de manera dinámica por la interacción de factores de crecimiento, sustancias vasoactivas y estímulos hemodinámicos.

Para poder cuantificar el remodelado vascular, Baumbach y Heistad definieron en 1989 el “índice de remodelado”, el cual se define como la variación en porcentaje de la luz del vaso atribuible al remodelado, en función de los cambios de la sección de área de pared (25). 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 individuo (26).

### **1.2.2. Clasificación del remodelado vascular**

Clásicamente, se consideraba que el cambio estructural evidenciado en las arterias de pequeño calibre de pacientes hipertensos se encontraba asociado a un

incremento del grosor de la pared del vaso a expensas de material nuevo que se acumulaba (“remodelado hipertrófico”). Sin embargo, se ha demostrado que el cambio puede deberse no solo al crecimiento del vaso, sino a la reestructuración del material ya existente en el mismo. Es lo que se conoció posteriormente, como “remodelado eutrófico”, que define la modificación de la pared del vaso sin cambios en la cantidad o en las características de los componentes del mismo.

Actualmente, se reconocen dos tipos de remodelado vascular en las arterias de pequeño calibre (25, 27, 28, 29):

**a) *Eutrófico concéntrico:*** en este remodelado, se objetiva una disminución del lumen interno y externo, 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 area”). Es el tipo de remodelado vascular que predomina en la hipertensión esencial en humanos y también se encuentra en el modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR). Se cree que es el resultado de la combinación de apoptosis celular en la periferia del vaso y vasoconstricción crónica de la matriz extracelular (30).

**b) *Hipertrófico concéntrico:*** en este remodelado, se objetiva un engrosamiento de la pared del vaso hacia la luz, lo que conlleva una reducción del diámetro interno. Además, viene acompañado de un aumento del área de la sección transversal del vaso y del cociente grosor de pared/diámetro interno del vaso. Se observa de manera frecuente en humanos con hipertensión secundaria, como por

ejemplo la hipertensión debida a aldosterismo primario, el feocromocitoma (31) o la hipertensión asociada a diabetes mellitus (32, 33).

### 1.2.3. Aspectos fisiopatológicos y moleculares del remodelado vascular

Como ya se ha comentado, en la hipertensión arterial, los cambios hemodinámicos mantenidos de manera crónica, alteran la estructura de la pared vascular, pero no son los únicos responsables de la aparición del remodelado. Existen otros procesos implicados, tales como la apoptosis celular, la inflamación, la fibrosis o el crecimiento celular (27). Además, los cambios en los componentes de la matriz extravascular son mediadores importantes en el proceso de adaptación tisular (34). A continuación se describen algunos de estos procesos que contribuyen al remodelado vascular:

**a) Apoptosis celular:** el papel que juegan los fenómenos apoptóticos en el remodelado vascular no está aún completamente explicado. Son numerosos los estudios que han comprobado la existencia de fenómenos apoptóticos en células de músculo liso de los vasos sanguíneos del corazón (35), cerebro y riñón (36), así como en las arterias de ratas hipertensas (37). En uno de dichos estudios, se observó una reducción de la apoptosis en las células musculares lisas de las arterias mesentéricas de las SHR jóvenes de 1-2 semanas de edad en comparación con controles normotensos (38). Esto sugiere que es el descenso de la tasa

apoptótica el responsable del aumento en el crecimiento de la pared y en la resistencia en los vasos en este modelo animal de hipertensión.

En otro estudio, fue analizada la tasa apoptótica en ratas SHR de 4 semanas y de 8-12 semanas, y encontraron que existía valores de presión arterial más altos, un cociente grosor de pared/diámetro interno del vaso mayor y una apoptosis celular más elevada en el grupo de animales de mayor edad (39).

En el desarrollo de remodelado eutrófico concéntrico vascular que se observa en las SHR podrían coexistir mecanismos de apoptosis y crecimiento celular, de tal manera que se produjera un incremento de la apoptosis localizada sobre todo en la parte externa del vaso, y un crecimiento celular en la pared interna del mismo. Algunos de los mecanismos implicados en el proceso apoptótico se conocen, pero muchos otros no. Asimismo, se desconoce si la apoptosis surge como compensación al crecimiento celular concéntrico o es un proceso primario.

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

- Activación de metaloproteasas: las metaloproteasas son metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), las cuales son endopeptidasas dependientes de zinc. Su función a nivel vascular es mantener la homeostasis de las estructuras extracelulares que rodean la pared del vaso. Esta función la

desarrollan a través de la modulación de las interacciones intercelulares, las señales de transmisión y la liberación de mediadores inflamatorios. Existen varios tipos diferentes de MMP [colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y metaloproteasas de membrana (MT-MMP)] cuya síntesis es inducida por determinadas citoquinas además de por interacciones intercelulares y de la célula con la matriz extracelular, en las que las integrinas tienen un papel importante. Del mismo modo, las transglutaminasas también podrían influir en el proceso de remodelado vascular, al generar interacciones entre los componentes fibrilares extracelulares y los sitios de unión específicos en las células musculares lisas (40).

- Rarefacción vascular: se trata de una disminución de la densidad de microvasos periféricos, lo que conduce al cierre de arteriolas (“arteriolas fantasmas”) y capilares, y a la posterior desaparición de estas estructuras. Este proceso se produce a expensas de la activación de la apoptosis encaminada a disminuir la reserva vascular, produciendo un menor débito sanguíneo tisular e incrementando el riesgo de complicaciones isquémicas.

Asimismo, el proceso de rarefacción favorece que se mantengan elevadas las resistencias periféricas en la hipertensión arterial.

En las ratas SHR también se ha observado el fenómeno de rarefacción. En ellas existe una disminución de la expresión del gen Bax/BCI-2 (el cual está implicado en la apoptosis celular) en las arterias intramiocárdicas y un incremento del mismo en arteriolas y capilares.

**b) *Disfunción endotelial:*** el término “disfunción endotelial” hace referencia a la pérdida de la función endotelial adecuada. Se trata de un hallazgo común en las enfermedades vasculares y su aparición es un paso clave en el desarrollo de la arteriosclerosis. Tanto el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como la disminución de la producción de óxido nítrico (NO) son los mecanismos que predominan en este proceso. Es cada día mayor la asociación entre la disfunción endotelial y procesos patológicos como la hipertensión, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus, el hábito tabáquico y otros factores de riesgo cardiovascular (41). Algunos de los principales mecanismos implicados en el desarrollo de la disfunción endotelial son:

- Inflamación endotelial: la activación endotelial induce la expresión de diversas sustancias como citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular con la finalidad de interactuar con leucocitos y otras células inflamatorias, y así promover el proceso de inflamación en el tejido. Al estudiar el modelo experimental de hipertensión arterial, se observa que existe un aumento en la expresión de moléculas de adhesión (integrinas), de proteínas inflamatorias [proteína C reactiva (PCR)] y de proteínas con capacidad trombogénica [proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1 o CCL2), inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1)] (42). Todos estos efectos producidos por la activación endotelial, favorecen la transformación de la estructura del árbol vascular al incrementar la proliferación celular, además de reducir la capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio. En su conjunto, estos cambios predisponen al desarrollo de eventos tromboisquémicos asociados a daño tisular (43).

A continuación, se describen los principales mecanismos inflamatorios que van a causar la disfunción endotelial en el modelo de hipertensión arterial:

➤ **Expresión de MCP-1:**

MCP-1 participa de manera activa en la migración e infiltración endotelial monocito-macrofagocitaria, induciendo que se activen los factores de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y proteína activadora 1 (AP-1). Como consecuencia de esto, se induce la expresión de la interleucina 6 (IL-6) y con ello, la activación de la proliferación de las células musculares lisas (44).

➤ **Incremento de los niveles de PCR:**

Este aumento induce la adhesión y migración de leucocitos, estimulando así la producción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión celular (CAM) (45). Es frecuente asociar el aumento de PCR con un estado procoagulante, así como con la disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) endotelial, debido a la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).

➤ **Incremento del número de células inflamatorias en la capa adventicia:**

Este fenómeno se considera una de las fuentes principales de producción de radicales libres de oxígeno implicados en la fisiopatología vascular (46).

- Estrés oxidativo: el término de estrés oxidativo se definió por primera vez por Sies y colaboradores en el año 1985 (47), haciendo referencia al desbalance que existe entre los productos pro- y anti-oxidantes, lo cual, conduce a un aumento

de las especies reactivas de oxígeno y a un descenso en la producción de NO. El estrés oxidativo se relaciona por tanto con una alteración de la homeostasis celular, una alteración de la capacidad vasodilatadora y con el daño tisular (48). Diversos estudios clínicos realizados en pacientes que presentan hipertensión arterial, muestran que las cifras de presión arterial, tanto sistólica como diastólica, guardan relación con el aumento de biomarcadores de estrés oxidativo y disminución de los niveles de antioxidantes en plasma (49-51).

Algunos de los procesos de estrés oxidativo que se han visto implicados en el daño endotelial en el modelo experimental de hipertensión arterial son los siguientes:

➤ Reducción de la biodisponibilidad de NO:

Actuando como molécula señalizadora, el NO participa en múltiples procesos biológicos, entre los que se incluyen la regulación de la presión arterial, la prevención de la agregación plaquetaria o la inhibición de la proliferación y migración celular (52) (Fig.2).

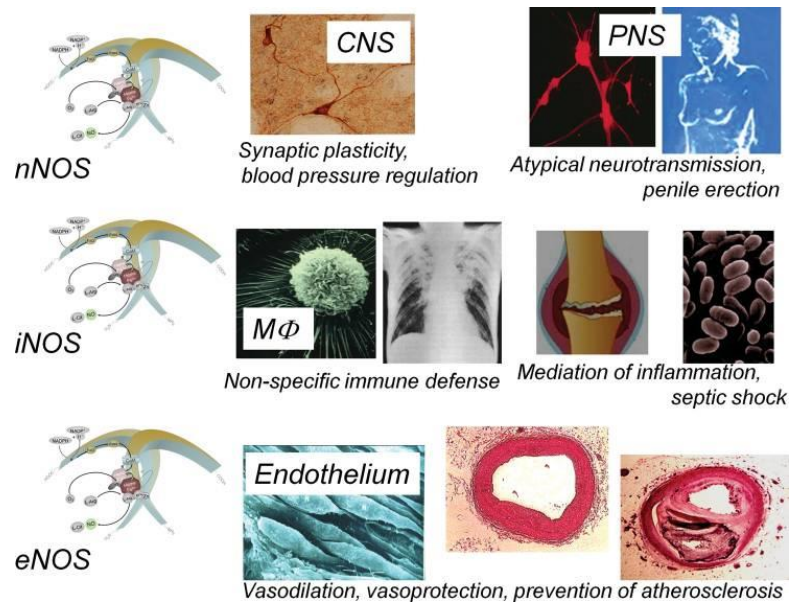


Figura 2: Funciones del óxido nítrico según lugar de síntesis. Extraído de *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Ulrich Förstermann, William C. Sessa. Eur Heart J. 2012; 33(7): 829–837.

El NO presenta una potente actividad vasodilatadora al inducir la relajación de las células musculares lisas de los vasos, gracias a la activación de la enzima guanilato ciclasa, generando así guanosín monofosfato cíclico (GMP cíclico o GMPc) y disminuyendo el calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  (53). Es en el endotelio vascular donde se sintetiza el NO, a través de la enzima NOS endotelial (eNOS), que transforma la arginina en citrulina gracias a una reacción redox en la que participan 5 electrones (Fig.3). La producción de NO endotelial se estimula de manera fisiológica por el neurotransmisor acetilcolina (ACh), siendo responsable de la vasodilatación en el endotelio sano. La vida media del NO es de pocos segundos. Tiene una alta liposolubilidad, lo que le permite tener una alta tasa de difusión a través de las membranas celulares.

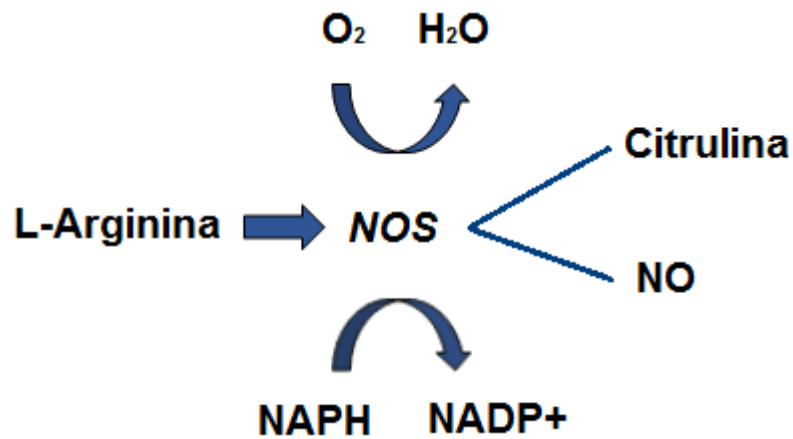


Figura 3: Síntesis de NO.

La dimetilarginina asimétrica o ADMA, es un antagonista competitivo de la eNOS, y se elimina en su mayor parte metabolizada por la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa o DDAH. Otra pequeña parte se elimina por la orina sin metabolizar. La actividad de la DDAH es inhibida por la mayoría de los factores de riesgo cardiovasculares, por lo que se produce en estas situaciones, un aumento en los niveles de ADMA plasmáticos, afectando a la producción de NO e incrementando por tanto el estrés oxidativo (54) (Fig.4).

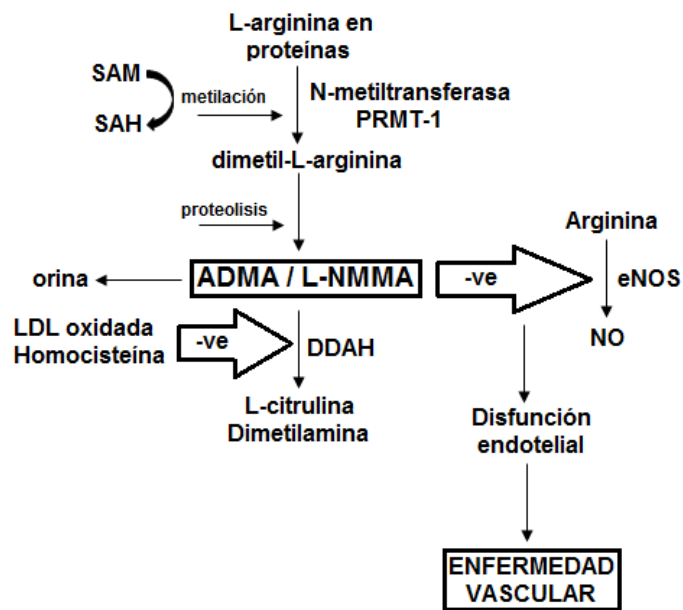


Figura 4: Esquema que muestra el origen y función de la arginina-dimetil-asimétrica o ADMA. Traducido de *The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease*. Latika Sibal, Sharad C Agarwal, Philip D Home, Rainer H Boger. *Curr Cardiol Rev*. 2010; 6(2):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

➤ Aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS):

Al estudiar el modelo experimental de hipertensión arterial, se ha observado que la producción de ROS está incrementada. Este hecho favorece el remodelado vascular, la aparición de inflamación y de disfunción endotelial (55). Las ROS derivan de la molécula de oxígeno ( $O_2$ ) tras la reducción química parcial. Poseen electrones desapareados gracias a los cuales, van a reaccionar con otras moléculas orgánicas a través de procesos de oxidación-reducción (REDOX) (56). Este grupo incluye a los peróxidos de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que se producen cuando el  $O_2$  es reducido con dos electrones, y a las formas reactivas de oxígeno que abarcan al radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) y al radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ). Estos compuestos se generan principalmente en la mitocondria, aunque también pueden hacerlo en el

retículo endoplásmico y en el citoplasma. Diversos estímulos, entre los que se incluye la hipertensión arterial, pueden favorecer que todas las células de la pared vascular generen ROS (57). En el caso concreto de la hipertensión arterial, existe un aumento en la actividad de las enzimas que participan de manera activa en la producción de ROS, entre las que se encuentran la Nicotiamida-Adenina Dinucleótido fosfato oxidada (NADPH-oxidasa), xantina oxidasa y mieloperoxidasa.

➤ **Disminución de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas:**

En los pacientes que presentan hipertensión arterial existe una disminución en la expresión de las defensas antioxidantes enzimáticas, tales como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa (57). También están disminuidos otros agentes neutralizantes (scavengers) de ROS no enzimáticos, como son la vitamina E, la vitamina C y el glutatión (55-58). Cuando la célula pretende hacer frente al exceso de ROS, la primera defensa en actuar es la SOD, y posteriormente, su actividad se completa gracias a la actividad de la catalasa. Ambas enzimas, pueden transformar el  $O_2^{\cdot -}$  en  $O_2$  y  $H_2O$ .

• **Expresión de moléculas de adhesión celular:**

El endotelio disfuncionante es el encargado de activar la expresión de integrinas y otras moléculas que son capaces de atraer leucocitos y otras células inflamatorias hacia la pared del vaso. Una de las moléculas cuya expresión se incrementa de forma específica es la E-selectina. Se trata de uno de los biomarcadores más importantes de daño endotelial.

- Vasoconstricción:

Un estado de vasoconstricción crónica está asociado a procesos inflamatorios, a la activación del depósito de colágeno, a la acumulación de fibronectina y a la producción de otros componentes de la matriz extracelular. Todo esto, va a conducir a la aparición de un remodelado vascular eutrófico concéntrico. Se ha estudiado la asociación existente entre la vasoconstricción y el remodelado, en la arteria mesentérica de ratas expuestas a una perfusión continua de adrenalina durante un periodo de 7 días (58). Tras finalizar el tratamiento, se objetivó un remodelado concéntrico en dichas arterias, que fue independiente de la presión intravascular que se generó en su interior.

- Expresión de endotelina-1:

Muchos estudios de modelos experimentales de hipertensión arterial, han encontrado niveles de endotelina-1 elevados. Un ejemplo es el de las ratas DOCA (tratadas con acetato de desoxicorticosterona) (59). En el caso de los humanos, se ha observado un aumento de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la preproendotelina-1 en el endotelio de las arterias de pequeño calibre del tejido subcutáneo del glúteo (60). El incremento de los niveles de endotelina-1 parece estar asociado con el remodelado vascular hipertrófico, y se puede corregir con los antagonistas de la endotelina (61). Tanto la presión arterial elevada, como el aumento de los niveles de aldosterona en plasma, se han relacionado con la activación de la expresión de endotelina-1 en el endotelio (62, 63).

**c) *Fibrosis de matriz extracelular:*** en el modelo de hipertensión arterial se produce el depósito de material fibrótico, principalmente colágeno, alrededor del vaso. Esto va a alterar la relación presión pasiva/diámetro interno del vaso y aumentará la rigidez de la pared vascular. El acúmulo de colágeno se observa de manera clara en la vascularización coronaria y, en menor medida, en la aorta (64) y en las arterias mesentéricas de las ratas SHR (65, 66). Sin embargo, en pacientes jóvenes que padecen hipertensión arterial, este depósito de colágeno puede asociarse de manera paradójica con una menor rigidez del vaso (67). Este hecho nos indica que, el aumento en la rigidez del vaso, no se debe al depósito de colágeno en si mismo, sino al tipo de reclutamiento de las fibras de colágeno que se produce tras la exposición mantenida a presiones elevadas. Algunos de los mediadores encargados de activar el proceso de fibrosis vascular son, entre otros, la aldosterona (68), la angiotensina II, el factor de crecimiento tisular beta (TGF- $\beta$ ) y la endotelina-1 (62). La angiotensina II estimula la producción de colágeno I en las células musculares lisas de los vasos. La aldosterona promueve la formación de depósitos de colágeno tipo I, de colágeno tipo II y de fibronectina a nivel extravascular (62). Además, existe una relación inversa entre el depósito de colágeno y el nivel de expresión de TGF- $\beta$ . De esta manera, se observa que en las ratas SHR existe un menor nivel en comparación con las ratas normotensas WKY (69).

**d) *Activación del eje renina-angiotensina-aldosterona:*** la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es fundamental en el proceso del remodelado vascular (70, 71). La asociación que existe entre ambos, ha sido estudiada en la rata hipertensa alimentada con fructosa (FFHR, del inglés

“Fructose-fed Hypertensive Rat”), que es un modelo experimental de hipertensión con síndrome metabólico. En dicho modelo, se pudo comprobar la existencia de una mayor expresión de receptores de angiotensina-II-subtipo 1 (AT<sub>1</sub>R) y menor expresión del subtipo 2 (AT<sub>2</sub>R). Esto se asocia a la disfunción endotelial, y al crecimiento e hipertrofia celular del vaso (72). Algunos de los mecanismos fisiopatológicos que relacionan la activación del SRAA con el remodelado vascular son:

- Activación del SRAA: se ha relacionado con un mayor estrés oxidativo y con la activación de los factores de transcripción AP-1 y NK- $\kappa$ B, que son los responsables de amplificar la respuesta inflamatoria y de activar la transcripción de quimiocinas y citoquinas.
- Angiotensina II: se trata de una proteína que regula la homeostasis del sistema cardiovascular, y cuya elevación de manera crónica está implicada en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular.
- Aldosterona: la aldosterona interacciona con los receptores de mineralocorticoides (MR) produciendo así disfunción endotelial, trombosis, hipertrofia vascular, fibrosis cardíaca y también, crecimiento y proliferación de las células musculares lisas de los vasos.

#### **1.2.4. Relevancia clínica del remodelado vascular**

Lo característico de la hipertensión arterial es el mantenimiento en el tiempo de las presiones intravasculares elevadas, inicialmente debido a un aumento del gasto cardíaco y más tarde, por el aumento de las resistencias vasculares periféricas totales (7).

El remodelado vascular asociado a la hipertensión arterial, al principio se comporta como un mecanismo adaptativo compensatorio, pero, con el tiempo, deja de ser adaptativo y compromete la función de los vasos, incrementando el riesgo de poder desarrollar un infarto agudo de miocardio (IAM) u otros eventos tromboembólicos sistémicos.

En la totalidad de los pacientes con hipertensión en estadio I se objetiva una alteración estructural del árbol vascular. Esta alteración no es más que la evolución natural del remodelado de las arterias coronarias. Según progresa el remodelado vascular, a esa primera alteración estructural se le añade la disfunción endotelial y la hipertrofia del ventrículo izquierdo (presentes en el 60% y en el 45% de los pacientes, respectivamente, durante la fase más precoz de la enfermedad) (73). El hecho de que aparezcan alteraciones estructurales en los vasos de pequeño calibre, tiene un valor pronóstico importante en los pacientes hipertensos. Ya ha sido demostrado que los pacientes con un mayor cociente grosor de pared/diámetro interno (GP/DI), experimentan con mayor frecuencia, eventos cardiovasculares adversos, ya sea en forma de infarto agudo de miocardio o de accidente cerebrovascular (74, 75). En la actualidad, una de las prioridades en la investigación

cardiovascular es la búsqueda de terapias eficaces para revertir dichas alteraciones estructurales.

### **1.2.5. Índice de remodelado arterial**

Como ya se ha explicado con anterioridad, Baumbach y Heistad definieron en 1989 el “índice de remodelado” para poder cuantificar el remodelado vascular. Dicho índice constituye la variación en porcentaje de la luz del vaso atribuible al remodelado eutrófico, en función de los cambios de la sección de área de la pared.

Baumbach y Heistad observaron que el remodelado que conducía a un aumento de la proporción media/lumen, implicaba necesariamente una reducción en el diámetro externo y que, por tanto, era posible calcular el cambio que se producía en el diámetro de la luz del vaso que hubiese ocurrido si no hubiese cambios en la sección de la capa media.

Según esto, el índice de remodelado es la proporción del cambio en el diámetro de la luz calculado (diámetro del lumen en el vaso normotenso menos el diámetro del lumen en el vaso con remodelado calculado) con respecto al cambio en el diámetro de la luz observado (diámetro del lumen en el vaso normotenso menos el diámetro del lumen hipertenso), expresado en porcentaje.

Si el índice de remodelado es mayor de 100%, indica que la sección de la capa media es mayor, implicando remodelado por crecimiento.

Las situaciones en las que la proporción media/lumen disminuye (por ejemplo como resultado del tratamiento antihipertensivo) también pueden ser resultado del remodelado, atrofia o ambos. Este “remodelado inverso” también se puede definir con el índice de remodelado y, en este caso, un índice menor de 100% implicaría atrofia.

Al usar esta terminología es importante reconocer sus limitaciones. Primero, el remodelado y el crecimiento son procesos que pueden ocurrir tanto en individuos normotensos como en aquellos que han desarrollado hipertensión, en los que sus vasos han tenido con el tiempo, un desarrollo diferente.

Segundo, una comparación entre la sección del área de la capa media de vasos hipertensos y normotensos, señala solo el resultado final del proceso. Un área puede ser resultado del crecimiento en una parte del vaso y atrofia en la otra parte, dando al final un tamaño considerado normal.

Tercero, el índice de remodelado no es una medida precisa. Un índice del 100% puede deberse a la existencia de remodelado a la vez que atrofia, y un índice del 0% puede ser el resultado del crecimiento del vaso por la superficie abluminal con posterior remodelado para mantener un diámetro externo del tamaño original.

Cuarto, el incremento de la proporción media/lumen sin crecimiento, puede ser consecuencia de la disminución del material elástico de la pared.

Quinto, el índice es la proporción de cambio en el lumen que se puede atribuir al remodelado, no un valor absoluto, por lo que se pueden obtener índices altos con pequeños cambios en el lumen.

También se ha estudiado la base celular de los cambios morfológicos que se observan en las arterias. En los modelos experimentales de hipertensión arterial, tanto en arterias de pequeño calibre subcutáneas, arterias de pequeño calibre de ratas transgénicas y en las mismas SHR, se ha observado que el tamaño de los miocitos es normal. En el caso de las SHR, la alteración estructural de las arterias de gran calibre se debe, en gran medida, a la existencia de hipertrofia celular, mientras que en las arterias de pequeño calibre, el tamaño de las células es normal. Por tanto, esto sugiere que el remodelado que se observa en estas SHR, se debe al reordenamiento de las células, manteniendo un tamaño normal. Esta ausencia de hipertrofia celular indica que el crecimiento observado se debe en parte al incremento en el número de células de músculo liso vascular, es decir, hiperplasia (25).

## 1.3. FÁRMACOS BETABLOQUEANTES

### 1.3.1. Farmacología básica

Los  $\beta$ -bloqueantes son fármacos que se unen selectivamente a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (ADR- $\beta$ ), produciendo un antagonismo competitivo y reversible de la estimulación que producen los neurotransmisores endógenos noradrenalina y adrenalina sobre dichos receptores.

El bloqueo del receptor inhibe los efectos fisiológicos mediados por la activación del sistema nervioso simpático, por lo que podría decirse que actúan como simpaticolíticos. Paradójicamente, algunos  $\beta$ -bloqueantes pueden ejercer una respuesta agonista parcial (actividad simpaticomimética intrínseca), estimulando y bloqueando el ADR- $\beta$  al mismo tiempo. Otros, además, tienen actividad vasodilatadora periférica mediada por el bloqueo del receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico (carvedilol, labetalol), por agonismo al receptor  $\beta$ 2-adrenérgico (celiprolol) o mediante mecanismos independientes del bloqueo del receptor adrenérgico (bucindolol, nebivolol) (80). Por otro lado, ciertos  $\beta$ -bloqueantes poseen “actividad estabilizadora de membrana”, y su efecto es similar al estabilizador de membrana que producen los bloqueantes de los canales de sodio de los antiarrítmicos de la clase I de la clasificación de Vaughan Williams.

Los ADR- $\beta$  que se expresan en la membrana celular pertenecen a la familia de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Estos receptores se

conforman por una sola proteína con 7 dominios transmembrana, un dominio amino-terminal extracelular y un largo dominio carboxi-terminal intracelular (Fig.5).

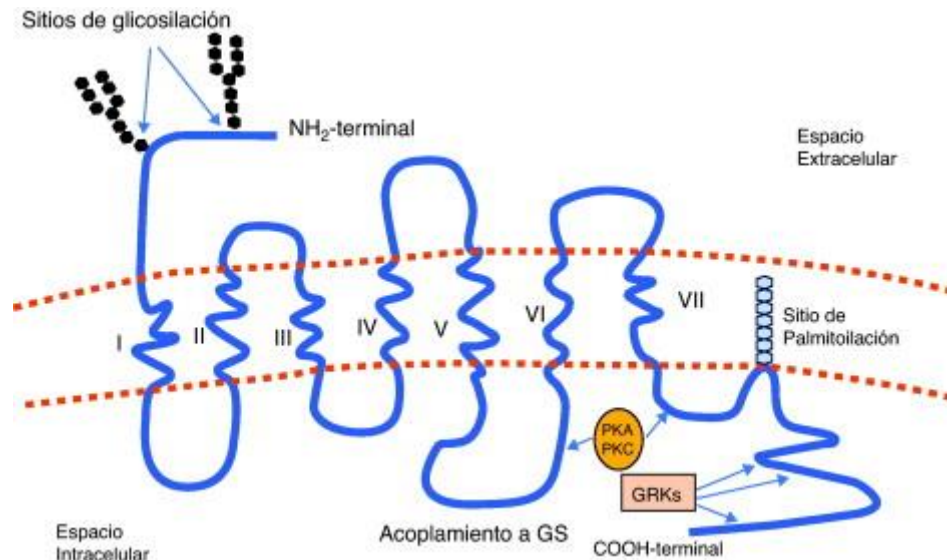


Figura 5: Representación de la estructura terciaria del receptor  $\beta$ -adrenérgico. Extraído de Sanz-Rosa, D. «Los receptores  $\beta$  adrenérgicos en la enfermedad cardiovascular». *Hipertensión y Riesgo Vascular* 28, n.º 2 (1 de marzo de 2011): 55-62.

El grupo de Ahlquist y cols fue el primero en identificar los ADR- $\beta$  (77). Fueron ellos quienes consiguieron diferenciar este receptor del receptor adrenérgico- $\alpha$  (ADR- $\alpha$ ) en base a la diferente afinidad que presentan uno y otro por diversos agonistas. Según esto, la noradrenalina es, de manera predominante, un agonista del ADR- $\alpha$ , el isoproterenol del ADR- $\beta$  y la adrenalina se une a ambos receptores.

Posteriormente, se han identificado diferentes subtipos de receptores pertenecientes a cada una de las dos clases de adenorreceptores, entre los que se encuentran los ADR- $\alpha$ 1 (postsinápticos) y los ADR- $\alpha$ 2 (post- y presinápticos).

La activación de los ADR- $\alpha$ 1 y los ADR- $\alpha$ 2 postsinápticos, a través de su acoplamiento con la proteína heteromérica Gq, activa la fosfolipasa C, incrementando la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), y elevando los niveles intracelulares de calcio  $[Ca^{2+}]_i$ . Por su parte, los ADR- $\alpha$ 2 presinápticos forman parte de un mecanismo de autorregulación negativa a través de la proteína Gi, produciendo la inactivación de la adenilatociclasa que, a su vez, provoca la disminución de los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) y de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Dentro del ADR- $\beta$ , se han identificado tres subtipos ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3) cuya activación, acoplada a las proteínas Gs, estimula de la adenilatociclasa y aumenta la conversión de ATP en AMPc. Al aumentar el AMPc en el miocito, se activa la protein-kinasa A (PKA), y se favorece la apertura de los canales de calcio voltaje-dependientes, incrementándose el  $[Ca^{2+}]_i$  y con ello la contracción del miocito (76).

Se han purificado los tres subtipos de receptores  $\beta$ , se ha determinado su secuencia de aminoácidos y se ha clonado sus genes a partir de material humano.

De manera esquemática (Tabla 1), se puede ver las implicaciones funcionales de cada subtipo de ADR- $\beta$  en los diferentes lugares donde se expresan:

$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inotropismo positivo</li> <li>- Cronotropismo positivo</li> <li>- Nódulo A-V: acorta el PR, acelera la velocidad de conducción</li> <li>- Producción de humor acuoso</li> <li>- Secreción de renina</li> <li>- Liberación de ADH</li> <li>- Estimula la lipólisis</li> <li>- Calorigénesis</li> <li>- Estimula la apoptosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vasodilatación arterio-venosa</li> <li>- Broncodilatación</li> <li>- Relajación intestinal y uterina</li> <li>- Relajación del músculo detrusor</li> <li>- Estimula la glucogenólisis</li> <li>- Estimula la liberación de NA</li> <li>- Temblor</li> <li>- Hipopotasemia</li> <li>- Liberación de insulina y glucagón</li> <li>- Inhiben la apoptosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vasodilatación</li> <li>- Liberación de NO</li> <li>- Estimula la lipólisis</li> <li>- Estimula la glucogenólisis</li> <li>- Calorigénesis</li> </ul>

NA: noradrenalina; NO: óxido nítrico; PR: periodo refractario

Tabla 1: Efectos mediados a través de la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

**a) Receptor  $\beta 1$ :** los receptores  $\beta 1$  son el subtipo de adreno-receptores mayoritarios en el corazón (70-80% del total de receptores); sin embargo, en pacientes con patología cardíaca (miocardiopatía isquémica o dilatada) hay una regulación a la baja con una relación  $\beta 1:\beta 2$  de 50:50 (78).

Su localización es postsináptica y al activarse, producen un aumento en la fuerza de contracción (efecto inotrópico positivo), en la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico positivo) y en la velocidad de conducción de impulso cardíaco (efecto dromotrópico positivo). El aumento de la fuerza de contracción y de la frecuencia cardíaca, provoca un aumento del consumo de oxígeno y del trabajo del corazón por aumento del volumen sistólico y volumen minuto. El aumento del automatismo

cardíaco que produce la sobreestimulación el ADR- $\beta$ 1 en el nodo sinusal, nodo aurículoventricular, haz de Hiss y fibras de Purkinje, puede provocar extrasístoles o la aparición de marcapasos ectópicos.

La noradrenalina y la adrenalina estimulan por igual los ADR- $\beta$ 1. Además, estos receptores pueden ser activados por dobutamina, dopamina o isoproterenol. A nivel del aparato yuxtaglomerular, la activación de ADR- $\beta$ 1 da lugar a un aumento en la secreción de renina.

**b) Receptor  $\beta$ 2:** este subtipo de receptor presenta una localización postsináptica y presináptica, y es más sensible a la adrenalina que a la noradrenalina.

El efecto de la activación del ADR- $\beta$ 2 postsináptico es la relajación del músculo liso en arteriolas, vénulas, bronquios, intestino, estómago, vesícula, conductos biliares, músculo detrusor de la vejiga, útero y cápsula esplénica. A nivel de la musculatura esquelética, su activación produce un aumento de la gluconeogénesis, glucógenolisis, captación de potasio y aumento de la contractilidad. A nivel hepático, su activación produce un aumento de la gluconeogénesis y glucógenolisis y en el páncreas, activa la secreción de insulina por parte de las células beta de los islotes de Langerhans.

El ADR- $\beta$ 2 presináptico y el ADR- $\alpha$ 2 presináptico, forman parte del mecanismo de autorregulación de la liberación de catecolaminas en el terminal adrenérgico. Dichos receptores se localizan en la membrana axonal presináptica. Son sensibles a las concentraciones de aminas en el espacio sináptico, facilitando la liberación de neurotransmisores en respuesta al estímulo nervioso. Los ADR- $\beta$ 2 presinápticos son más sensibles a las catecolaminas que los ADR- $\alpha$ 2 presinápticos, por lo que se activan en presencia de pocas moléculas de aminas, favoreciendo la liberación de más neurotransmisor.

Estos receptores también son activados con el isoproterenol y con los agonistas selectivos de los ADR- $\beta$ 2.

**c) Receptor  $\beta$ 3:** se considera un receptor atípico porque no es bloqueado por propranolol ni por otros  $\beta$ -bloqueantes clásicos. Son de 3 a 10 veces más sensibles a la noradrenalina que a la adrenalina, y también son activados por el isoproterenol. Se localiza en los adipocitos, produciendo lipólisis y elevación de la lipemia cuando se activa. También se le atribuye cierto efecto inotrópico negativo, lo que explicaría el alto nivel de expresión de este subtipo de receptor en los pacientes con fallo cardíaco y su posible papel en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca (79).

➤ *Propiedades farmacocinéticas*

Dentro de los fármacos  $\beta$ -bloqueantes existen diferencias farmacocinéticas que permiten clasificarlos en 3 grupos (80):

- Los fármacos lipofílicos (metoprolol, propranolol, timolol, labetalol) se absorben por completo y con rapidez en el tracto gastrointestinal, pero son metabolizados de manera importante en la pared intestinal y en el hígado (efecto de primer paso), por lo que su biodisponibilidad oral es baja (10-30%). Se pueden acumular en pacientes con un flujo sanguíneo hepático reducido o en ancianos. Presentan una vida media de eliminación corta (1-5 h) y pueden penetrar con facilidad en el sistema nervioso central, con mayor incidencia de efectos secundarios centrales.
- Los fármacos hidrofílicos (atenolol, esmolol, nadolol, sotalol) se absorben de forma incompleta desde el tracto gastrointestinal (50%, pero sin apenas efecto de primer paso hepático) y son eliminados por el riñón sin modificación o como metabolitos activos. Presentan una vida media más larga (6-24 h) y no interactúan con otros fármacos metabolizados por el hígado. Su vida media de eliminación puede ser más larga en pacientes con una tasa de filtración glomerular disminuída (enfermedad renal, ancianos). Raramente cruzan la barrera hematoencefálica.

Dentro de este grupo se encuentra el esmolol, con la peculiaridad de tener una acción ultracorta (vida media de 9 minutos), ya que su metabolismo es

por hidrólisis gracias a las esterasas eritrocitarias. Se utiliza por vía intravenosa para el control de las taquicardias supraventriculares o de taquicardia e hipertensión perioperatorias (76).

- Los fármacos de eliminación equilibrada (renal y hepática), como el bisoprolol, que presenta buena disponibilidad oral (80-90%), un metabolismo de primer paso bajo, penetra en el sistema nervioso central (SNC) y se elimina a partes iguales por las vías hepática y renal. El carvedilol tiene una baja biodisponibilidad oral como resultado de un intenso efecto de primer paso. Se liga a las proteínas plasmáticas y se elimina por el metabolismo hepático.

➤ *Propiedades farmacodinámicas*

Los efectos farmacológicos de los  $\beta$ -bloqueantes son diversos, ya que tienen una amplia distribución en el organismo. Estos efectos pueden ser detectados o no, dependiendo del nivel de activación simpática que produzcan sobre el órgano diana. Por ejemplo, en un corazón en reposo, el  $\beta$ -bloqueo no produce efectos evidentes, pero tiene una gran importancia cuando existe una descarga simpática como respuesta a situaciones fisiológicas o patológicas.

Además, existen diferentes efectos farmacológicos en función de la selectividad a los diferentes subtipos de ADR- $\beta$  (Tabla 2).

$\beta_1 + \beta_2$	$\beta_1$	$\beta + \alpha_1$
- Alprenolol*	- Atenolol	- Carvedilol
- Carteolol*	- Bisoprolol	- Labetalol
- Nadolol	- Celiprolol	
- Oxprenolol*	- Esmolol	
- Propranolol	- Metoprolol	
- Timolol	- Nebivolol	

\* Presentan actividad simpaticomimética intrínseca

Tabla 2: Clasificación de los fármacos  $\beta$ -bloqueantes atendiendo a su selectividad por los distintos subtipos de receptores adrenérgicos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\alpha$ .

La primera generación de fármacos era poco selectiva, mientras que la segunda ya fue más cardioselectiva, bloqueando específicamente los receptores del subtipo  $\beta_1$ . Sin embargo, dicha selectividad se pierde ante dosis altas del fármaco. La tercera generación posee además efecto vasodilatador, gracias a la acción combinada con el bloqueo de ADR- $\alpha$ .

Los efectos del bloqueo de los receptores adrenérgicos  $\beta$  sobre el corazón son, la disminución de la contractilidad (inotropismo negativo), la disminución de la frecuencia cardíaca (cronotropismo negativo) y la disminución de la velocidad de conducción (dromotropismo negativo). Sobre los vasos sanguíneos, se produce una discreta vasoconstricción (76, 80).

Los mecanismos de acción son diversos y no se conocen en profundidad, observando una gran diferencia de unos agentes a otros. Los principales efectos

farmacológicos de estos fármacos, no solo a nivel cardiovascular sino en todo el organismo son:

- Efecto antihipertensivo: los mecanismos por los cuales los  $\beta$ -bloqueantes poseen un efecto antihipertensivo no son del todo conocidos, pero se relaciona con la reducción del gasto cardíaco, la inhibición de la actividad de la renina y la producción de angiotensina II, el aumento de niveles plasmáticos y la excreción de prostaglandina E<sub>2</sub> y prostaciclina, la menor síntesis y liberación de endotelina-1, la disminución del tono simpático en el SNC, la disminución del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y el bloqueo de los ADR- $\alpha$ <sub>2</sub> presinápticos que disminuye el tono simpático vascular.
- Efecto antiisquémico: los fármacos  $\beta$ - bloqueantes consiguen disminuir la demanda de oxígeno del miocardio al reducir la frecuencia cardíaca, la contractilidad y la presión arterial sistólica. Además, esta disminución de la frecuencia, prolonga el tiempo de diástole y con ello mejora la perfusión coronaria, sobre todo el flujo subendocárdico.
- Mejoría de la estructura y función del ventrículo izquierdo: los fármacos  $\beta$ -bloqueantes son capaces de reducir el tamaño del ventrículo y aumentar la fracción de eyección. La mejoría de la función cardíaca se produce a expensas de la disminución de la frecuencia cardíaca (prolongando el periodo de llenado diastólico y la duración de la perfusión coronaria), la reducción de la demanda de oxígeno por parte del miocardio, la inhibición de los ácidos grasos que

inducen las catecolaminas de los tejidos adiposos, la regulación al alza de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y la reducción del estrés oxidativo en el miocardio.

- Efecto antiarrítmico: los  $\beta$ -bloqueantes pertenecen a la clase II de la clasificación de fármacos antiarrítmicos de Vaughan Williams. Su eficacia se debe a la capacidad de inhibir el tono simpático sobre la actividad eléctrica cardíaca, disminuyendo el automatismo del nodo sinusal, la velocidad de conducción a través del nodo aurículoventricular y la actividad eléctrica en los focos ectópicos. Además, estos fármacos interfieren en los potenciales de acción de los miocitos cardíacos, incrementando el tiempo que dura el potencial de acción y el periodo refractario efectivo. Esto último, los hace eficaces para tratar arritmias por reentrada.
- Otros efectos cardiovasculares: cabe destacar la inhibición de la apoptosis cardíaca mediada por su efecto bloqueante de los ADR- $\beta_1$ , la capacidad de prevención de la ruptura de la placa de ateroma al reducir el estrés mecánico, y la alteración en la expresión de genes miocárdicos, como el aumento de la adenosintrifosfatasa (ATPasa) cálcica del retículo sarcoplasmático, el ARNm y ARNm de la cadena pesada de la  $\alpha$ -miosina y la reducción de los valores de ARNm de la cadena pesada de la  $\beta$ -miosina. Por último, algunos  $\beta$ -bloqueantes presentan propiedades antioxidantes e inhiben la proliferación de las células musculares lisas de los vasos.

- Efecto sobre la musculatura lisa bronquial: el bloqueo de los ADR- $\beta$ 2 del músculo liso bronquial produce un efecto broncoconstrictor.
- Efectos metabólicos: tienen efecto sobre la reducción de la tolerancia a la glucosa, además de un enlentecimiento de la respuesta a la hipoglucemia insulínica, un bloqueo de la lipólisis que induce el ejercicio y un aumento de los triglicéridos en el plasma. Estos fármacos disminuyen también la producción de renina y angiotensina II, y la producción de aldosterona, gracias al bloqueo de los receptores  $\beta$ 1 presentes en las células del aparato yuxtaglomerular. Como consecuencia, se reduce la absorción de sodio y agua, y predispone a una hiperkalemia leve.
- Efectos sobre el SNC: como ya hemos comentado, los  $\beta$ -bloqueantes liposolubles atraviesan la barrera hematoencefálica y producen efectos a ese nivel, principalmente insomnio. Los no selectivos suprimen los síntomas somáticos y psíquicos de la ansiedad, siendo también útiles en el tratamiento del temblor esencial. Además, el propranolol mejora los síntomas del síndrome de retirada de narcóticos y alcohol.
- Otras acciones farmacológicas: estos fármacos tienen actividad como anestésico local al disminuir la despolarización de la célula miocárdica por inhibición de la conductancia del sodio a través de canales específicos voltaje-dependientes en la membrana (acción de estabilización de membrana). Asimismo, poseen efecto antiagregante plaquetario y reducen la afinidad de

la hemoglobina por el oxígeno. Estos efectos contribuyen a la acción antianginosa de estos fármacos. También inhiben la producción de humor acuoso, disminuyendo así la presión intraocular. Por último, hay que mencionar que reducen la conversión periférica de tiroxina en triyodotirosina (T3), disminuyendo por tanto los niveles de esta.

### **1.3.2. Aplicabilidad clínica**

El uso de los fármacos  $\beta$ -bloqueantes está muy bien definido en multitud de enfermedades cardiovasculares (80, 81). Su utilización es segura cuando se han descartado las contraindicaciones y se administra un régimen adecuado. Se debe evitar la interrupción repentina para prevenir los efectos de rebote. Los beneficios del tratamiento con bloqueadores beta están ampliamente documentados en las siguientes enfermedades:

**a) *Infarto agudo de miocardio:*** el uso de  $\beta$ -bloqueantes durante la fase aguda del infarto de miocardio, está recomendado en todos los pacientes sin excepción (clase I, grado de evidencia A). Esto se debe a su capacidad para limitar el área del infarto, reducir la incidencia de arritmias que puedan ser letales, aliviar el dolor y reducir la mortalidad, incluida la muerte cardíaca súbita.

**b) *Prevención secundaria tras infarto agudo de miocardio:*** los  $\beta$ -bloqueantes por vía oral están recomendados en el tratamiento a largo plazo (de forma indefinida) en todos los pacientes que se recuperen de un infarto agudo de

miocardio y no presenten contraindicaciones (clase I, grado de evidencia A). Esta indicación está infrautilizada. En diversos estudios se ha demostrado que su uso en esta indicación, puede reducir hasta en un 20-25% la mortalidad cardíaca, por muerte cardíaca súbita y el reinfarto. Este beneficio es aún mayor en los pacientes de alto riesgo, como aquellos que han tenido un infarto extenso.

**c) Síndrome coronario agudo sin elevación del ST:** estos pacientes deben recibir tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes tan pronto como sea posible, para controlar la isquemia y prevenir el IAM/reinfarto (clase I, grado de evidencia B). Tras la fase aguda, todos los pacientes deben ser tratados con  $\beta$ -bloqueantes durante un periodo de tiempo prolongado como prevención secundaria (clase I, grado de evidencia A).

**d) Cardiopatía isquémica crónica estable:** todos los pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable deben ser tratados con bloqueadores beta a largo plazo para controlar la isquemia, prevenir el infarto y mejorar la supervivencia. En pacientes con infarto previo, el nivel de evidencia es alto (clase I, grado de evidencia A). Estos fármacos deben considerarse como tratamiento de primera elección en pacientes con angina o isquemia crónica e hipertensión, infarto previo o función ventricular deprimida. Sin embargo, parece ser que bajo estas indicaciones está infrautilizado. Asimismo, son fármacos muy efectivos en el control de la angina inducida por el ejercicio, en mejorar la capacidad de ejercicio y reducir o suprimir los episodios isquémicos, ya sean sintomáticos o asintomáticos.

**e) Insuficiencia cardíaca:** todos los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable (leve, moderada o severa) causada por una miocardiopatía isquémica o no isquémica, y que presenten una fracción de eyección del ventrículo izquierdo reducida (clase II-IV de la New York Heart Association [NYHA]), deben recibir tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes si no existen contraindicaciones (clase I, grado de evidencia A). En pacientes con disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, con o sin insuficiencia cardíaca sintomática tras un infarto agudo de miocardio, se recomienda el tratamiento a largo plazo con  $\beta$ -bloqueantes junto con un IECA para reducir la mortalidad (clase I, grado de evidencia A). Por último, los  $\beta$ -bloqueantes están recomendados en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica con función ventricular izquierda conservada (clase IIa, grado de evidencia C). Como ocurre en otras indicaciones, en el caso de los pacientes con insuficiencia cardíaca, también están infrautilizados.

**f) Arritmias:** el uso de  $\beta$ -bloqueantes está indicado en el tratamiento de la taquicardia supraventricular, taquicardia en el síndrome de Wolff-Parkinson-White, en la fibrilación auricular, en el flutter auricular y en las arritmias ventriculares. La taquicardia sinusal no se considera una enfermedad primaria, y por tanto, se debe tratar la causa que la desencadenó. Sin embargo, en algunos individuos se puede utilizar  $\beta$ -bloqueantes para reducir la frecuencia cardíaca, sobre todo en aquellos con ansiedad, tras el infarto de miocardio, en pacientes con insuficiencia cardíaca, hipertiroidismo y estado  $\beta$ -adrenérgico hiperdinámico.

**g) Otras indicaciones:** estos fármacos también se utilizan en la prevención de la muerte súbita, en el tratamiento de la hipertensión arterial, en la miocardiopatía hipertrófica y como profilaxis en el perioperatorio de la cirugía no cardíaca.

### **1.3.3. Contraindicaciones y efectos adversos de los $\beta$ -bloqueantes**

Entre las contraindicaciones para iniciar el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes están el asma, la hipotensión sintomática o la bradicardia y la insuficiencia cardíaca descompensada severa. Siempre hay que valorar riesgo-beneficio, y en algunos pacientes estas contraindicaciones son relativas, ya que los beneficios de la terapia podrían superar a los riesgos. Un ejemplo de esto sería el paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica sin actividad broncoespástica o la enfermedad vascular periférica.

Por norma general, los  $\beta$ -bloqueantes se toleran bien, aunque pueden aparecer efectos secundarios, sobre todo, cuando se utilizan a altas dosis. Algunos de estos efectos secundarios son:

**a) A nivel cardiovascular:** los  $\beta$ -bloqueantes reducen la frecuencia cardíaca, disminuyen el índice de activación automática de los marcapasos ectópicos cardíacos, enlentecen la conducción y aumentan el período refractario del nodo aurículoventricular, lo que puede tener como consecuencia la aparición de bradicardia extrema y bloqueo aurículo-ventricular.

Los  $\beta$ -bloqueantes disminuyen el flujo sanguíneo tisular debido al bloqueo de los receptores  $\beta_2$  vasculares y a la estimulación sin oposición de los  $\alpha$ -adrenoceptores vasculares. Por consiguiente, pueden producir frialdad en las extremidades, propiciar el fenómeno de Raynaud y empeorar los síntomas en pacientes con enfermedad periférica vascular severa. Estos efectos secundarios son menos pronunciados con fármacos que presentan efectos vasodilatadores y con agentes  $\beta_1$  selectivos.

Es muy recomendable prestar atención a los posibles efectos sinérgicos cardíacos que se desarrollan con la co-administración de otros fármacos, como algunos calcio-antagonistas (diltiazem, verapamilo).

**b) Otros efectos adversos:** los  $\beta$ -bloqueantes, especialmente los no cardioselectivos, pueden tener efectos no deseados en diversos territorios del organismo donde los ADR- $\beta_2$  están presentes.

A nivel metabólico, pueden enmascarar algunos síntomas que alertan de la hipoglucemia (temblor, taquicardia) en los pacientes con diabetes mellitus insulino dependientes.

A nivel pulmonar, los  $\beta$ -bloqueantes pueden favorecer la broncoconstricción en pacientes asmáticos o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, por lo que, en estos casos, debe utilizarse un fármaco  $\beta_1$ -selectivo.

Los efectos que producen sobre el SNC (fatiga, dolor de cabeza, alteración del sueño, insomnio y sueños intensos, depresión) son menos habituales con los fármacos hidrofílicos, ya que, como se ha explicado previamente, no atraviesan la barrera hematoencefálica.

Por último, otros efectos adversos menos conocidos son la hipertrigliceridemia, la astenia, el mareo o inestabilidad y la disfunción eréctil.

### 1.3.4. Clorhidrato de esmolol

#### 1.3.4.1. Farmacocinética y farmacodinamia

El esmolol es un derivado del grupo fenoxipropanolamina con la estructura  $C_{16}H_{26}NO_4$  (Fig.6).

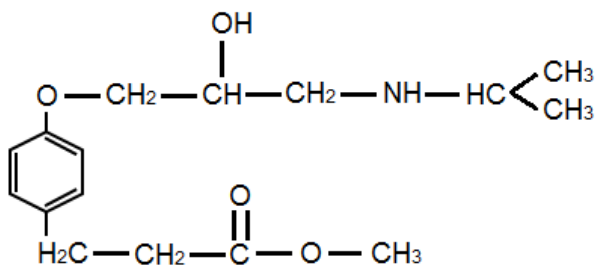


Figura 6: Estructura química del esmolol.

Se trata de un fármaco  $\beta$ -bloqueante cardiosselectivo sin actividad simpaticomimética intrínseca y estabilizadora de membrana a dosis terapéuticas.

Al bloquear los ADR- $\beta$ 1, produce un efecto cronotrópico e inotrópico negativos, disminuyendo tanto la frecuencia como la contractilidad del miocardio.

Además, presenta algunas peculiaridades farmacocinéticas y cardiohemodinámicas que lo hacen especial dentro del grupo de fármacos  $\beta$ -bloqueantes. Administrado de manera intravenosa, tiene una rápida distribución por el organismo, con un inicio de acción muy rápido (en aproximadamente 2 minutos) y una vida media de eliminación también muy corta (unos 9 minutos, en el rango entre 4 a 16 minutos). Se une hasta en un 55% a proteínas plasmáticas (82), y se metaboliza de manera precoz por las esterasas eritrocitarias, dando lugar a un metabolito ácido (ASL-8123) y a metanol. A los 20-30 minutos de suspender la perfusión continua de esmolol, su concentración en plasma es casi indetectable. El aclaramiento es 3 veces superior al gasto cardíaco en reposo, y hasta 14 veces superior al flujo sanguíneo hepático. Este rápido aclaramiento es debido a su rápida distribución desde la sangre a los tejidos y, sobre todo, a la rápida metabolización a cargo de las esterasas eritrocitarias. Por tanto, ni el metabolismo ni la eliminación de este fármaco dependen de la función hepática o renal, siendo únicamente el 1-2% del total de esmolol administrado el que se eliminará a través de la orina sin ser degradado. El metabolito ASL-8123 sí que se elimina por la orina, y tiene una actividad  $\beta$ -bloqueante mínima (hasta 1500 veces menos potente que el esmolol). Puede acumularse en pacientes que presenten una insuficiencia renal grave, con aclaramiento de creatinina inferior a 30 ml/min, lo que obliga a ajustar la dosis en estos pacientes.

Puede decirse que el esmolol, en comparación con otros  $\beta$ -bloqueantes, ofrece la posibilidad de tener un rápido efecto terapéutico con una rápida reversibilidad de los efectos (83).

Por otro lado, actúa sobre el sistema de conducción del nodo sinusal y del nodo aurículoventricular, prolongando el tiempo de repolarización del potencial de acción y el período refractario, lo que da lugar al alargamiento del intervalo PR y a la disminución de la frecuencia cardíaca.

También produce una disminución de presión arterial más marcada que otros  $\beta$ -bloqueantes, siendo 4-5 veces mayor el descenso de la presión arterial sistólica que la diastólica. Dicha reducción de la presión arterial es tan marcada, incluso a dosis bajas, que no puede deberse exclusivamente a la disminución de la contractilidad cardíaca, debiendo existir otros mecanismos adicionales implicados que se desconocen aún (84-86).

También se sabe que, a dosis altas, el esmolol pierde su cardioselectividad y bloquea receptores  $\beta_2$ . Los efectos sobre la frecuencia cardíaca y sobre la presión arterial son dosisdependientes (87).

#### **1.3.4.2. Indicaciones y contraindicaciones**

La principal indicación del esmolol es el tratamiento a corto plazo de la taquicardia supraventricular, con excepción de los síndromes de preexcitación. También se puede utilizar para tratar las arritmias y la hipertensión arterial que aparecen en el periodo perioperatorio.

Está contraindicado en aquellos pacientes que presenten hipersensibilidad al clorhidrato de esmolol, así como en las bradicardias graves (con menos de 50 latidos por minuto), en el síndrome de disfunción sinusal, en el bloqueo grave auriculoventricular sin marcapasos, en los bloqueos auriculoventriculares de segundo o tercer grado, en el shock cardiogénico, en la hipotensión grave, en la insuficiencia cardíaca descompensada, en el feocromocitoma no tratado previamente, en pacientes con hipertensión pulmonar, en las crisis agudas de asma y con acidosis metabólica.

#### **1.3.4.3. Interacciones y efectos secundarios**

El esmolol también presenta interacciones con otros fármacos que hay que conocer:

- Reduce la frecuencia y la excitabilidad cardíaca potenciada por reserpina, alfa-metildopa, clonidina, guanfacina, glucósidos cardíacos o fentanilo.
- Potencia la acción hipotensora de los anestésicos volátiles.
- Potencia el efecto de la insulina y de los antidiabéticos orales.
- Potencia la toxicidad de la digoxina.

- Su concentración plasmática puede estar aumentada con la morfina intravenosa y la warfarina.

En cuanto a sus efectos secundarios, son similares a los ya explicados en el grupo general de  $\beta$ -bloqueantes: vértigo, somnolencia, confusión, cefalea, agitación, fatiga, parestesias, astenia, depresión, dificultad para concentrarse, ansiedad, anorexia, hipotensión, sudoración, náuseas y vómitos, y reacciones locales en el lugar de inyección del fármaco.

#### **1.3.4.4. Clorhidrato de esmolol en la práctica clínica**

El esmolol es utilizado en la práctica clínica tanto en quirófano como en las Unidades de Cuidados Intensivos, debido a sus peculiaridades farmacocinéticas y a sus efectos cardio-hemodinámicos. Un metaanálisis publicado que incluye 67 ensayos clínicos randomizados, confirma el efecto cardioprotector del esmolol al disminuir la incidencia de isquemia miocárdica en el paciente quirúrgico (87).

Otros estudios demuestran que la administración de esmolol durante el periodo perioperatorio en pacientes sometidos a cirugía cardíaca (88) y no cardíaca (89), disminuye la incidencia de arritmias. De hecho, es uno de los fármacos de elección en la taquicardia supraventricular (fibrilación auricular, flutter auricular y taquicardia sinusal) y en la hipertensión arterial que aparece durante el perioperatorio. Se cree que el bloqueo de los ADR- $\beta$ 1 con esmolol, puede mejorar

las condiciones hemodinámicas en el paciente séptico (90, 91), aunque todavía no hay estudios concluyentes respecto a esto.

Podríamos decir entonces que, el esmolol es empleado en situaciones clínicas que requieren bloqueo de los ADR- $\beta$ 1 fácilmente reversible (78). Presenta además resultados beneficiosos en la prevención de náuseas y vómitos perioperatorios (92).

Por último, no olvidar que el esmolol tiene la capacidad de disminuir los requerimientos anestésicos y del uso de opioides perioperatorios, aunque se desconoce el mecanismo subyacente (93, 94).

#### **1.4. REGRESIÓN DEL REMODELADO VASCULAR HIPERTENSIVO**

El hecho de que la vasoconstricción crónica sea un mecanismo de remodelado arterial concéntrico permite hipotetizar que la vasodilatación que provocan los fármacos antihipertensivos debe inducir un efecto contrapuesto, favoreciendo el remodelado excéntrico, disminuyendo el daño tisular y los fenómenos isquémicos que se asocian a la HTA (7). Dicha hipótesis está sustentada por estudios in vivo que se realizaron sobre las arterias mesentéricas de ratas con hipertensión inducida con adrenalina. En estos modelos experimentales, la infusión de amlodipino consiguió revertir el remodelado vascular (95).

Diversos estudios posteriores han corroborado estos resultados, sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos que explicarían la reversión del remodelado con este fármaco, no han sido esclarecidos por completo.

Se ha observado que, según se utilice un fármaco vasodilatador u otro, los efectos sobre las resistencias vasculares periféricas son dispares. La diferencia en la eficacia mostrada por los distintos fármacos en cuanto a la normalización de la estructura del vaso, podría explicarse por la expresión de diversos subtipos de NADPH-oxidasas (nox1, nox2 y nox4) y sus correspondientes subunidades, tanto en el músculo liso como en el endotelio (96). De esta manera, varios estudios que utilizan métodos pletismográficos, muestran la normalización de la estructura

vascular de pequeño calibre en pacientes que han sido tratados con IECAS, ARA II o calcio-antagonistas, pero no en los tratados con  $\beta$ -bloqueantes (97).

#### **1.4.1. Tratamiento farmacológico del remodelado vascular hipertensivo**

Existen varios ensayos clínicos prospectivos y randomizados que se realizaron en pacientes con hipertensión arterial, que sugieren que el tratamiento antihipertensivo evita la aparición de eventos cardiovasculares y que, en dicho efecto, tiene un papel fundamental la capacidad del anterior tratamiento para revertir el remodelado vascular.

También se ha demostrado que, en este grupo poblacional, la sola normalización de las cifras tensionales, sin producir una regresión del remodelado vascular (por ejemplo, lo que ocurre tras la administración de nitroglicerina), no mejora el pronóstico (98). La evidencia sugiere que la regresión del remodelado vascular se manifiesta de diferente forma según sea utilizado un vasodilatador u otro, y también según la arteria estudiada. En este sentido, se puede diferenciar:

**a) Regresión del remodelado en vasos de gran calibre:** ciertos fármacos hipotensores, tales como IECA, ARA II, calcio-antagonistas o espironolactona, parecen alterar las propiedades estructurales de las arterias de gran calibre o de conducción. Los antagonistas del calcio, como el nifedipino (99) y el amlodipino (100), los IECA y los ARA II, estimulan el proceso de apoptosis de los miocitos de

la aorta torácica en las ratas SHR. Sin embargo, la hidralazina no consiguió dicho efecto a pesar de su acción hipotensora (101). Poco se conoce sobre la fisiopatología que relaciona el proceso de apoptosis con el remodelado vascular y, además, los datos son contradictorios. Algunos estudios afirman que la apoptosis se manifiesta de manera cíclica, durante periodos de tiempo limitados (102, 103). Otros estudios, por el contrario, encuentran un incremento mantenido de la apoptosis durante 12 meses de tratamiento con amlodipino y enalapril (100), y durante 16 semanas con quinapril (104).

Por otro lado, se ha visto que ciertos fármacos ( $\beta$ -bloqueantes, nitratos, antagonistas del calcio, IECA, ARA II y espironolactona) disminuyen la rigidez de la pared vascular (105-107). Algunos de los mecanismos implicados en esto son los siguientes:

- Reversión de la rigidez: los nitratos consiguen esto gracias a su efecto vasodilatador (105). El resto de fármacos citados, aumentan la complianza vascular gracias a mecanismos antifibróticos, sobre todo mediante la inhibición del TGF- $\beta$ 1. Al disminuir la rigidez del vaso, disminuye la impedancia, retrasando la reflexión de la onda de pulso y, consecuentemente, reduciendo la presión de pulso a nivel central en la aorta.

- Bloqueo del SRAA: tanto los IECA como los ARA II, actúan bloqueando el eje renina-angiotensina-aldosterona y con ello, evitan la activación de AT<sub>1</sub>R y reducen el  $[Ca^{2+}]_i$  y la actividad de la proteína tirosina-quinasa Pyk-2 y NADPH-

oxidasa, además de otros mecanismos de remodelado vascular. La aldosterona favorece el depósito de colágeno, y por eso, al administrar su antagonista, el fármaco eplerenona, se reduce la rigidez en todo tipo de arterias, tanto de gran calibre como de pequeño calibre (108, 109).

- Cambios en la distensibilidad del vaso: algunos  $\beta$ -bloqueantes como el atenolol producen estos cambios de distensibilidad (110). Además, producen una reducción en la frecuencia cardíaca que incrementa la presión de pulso junto a una vasoconstricción periférica (111). Esto explicaría en parte, la menor eficacia de los fármacos  $\beta$ -bloqueantes en la prevención de eventos cardiovasculares, comparándolos con otros inhibidores del SRAA (112).

***b) Regresión del remodelado en vasos de pequeño calibre:***

- Cambios en la estructura de los vasos: los cambios que aparecen en el remodelado de las arterias de pequeño calibre subcutáneas, parecen reflejar los cambios producidos en estos mismos vasos de otros territorios, como en las arterias coronarias (113-115).

Diferentes estudios demuestran que tanto los IECA (116-118) como los ARA II (119, 120) y ciertos antagonistas del calcio (121, 122), son capaces de normalizar la estructura de las arterias de pequeño calibre a nivel subcutáneo glúteo en pacientes con hipertensión arterial. Sin embargo, otro estudio muestra como el verapamilo aumenta en número las células musculares lisas apoptóticas en arterias coronarias de ratas SHR (101).

Asimismo, la eplerenona, al reducir los depósitos de colágeno y el cociente colágeno/elastina en la pared vascular, disminuye la rigidez de las arterias de pequeño calibre en pacientes hipertensos (109).

Los fármacos que actúan bloqueando el SRAA (IECA, ARA II) también mejoran el remodelado de las arterias de pequeño calibre en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (123, 124).

Recientemente, un agonista selectivo del receptor AT<sub>2</sub>R, el compuesto 21, ha demostrado ser capaz de reducir el colágeno alrededor de la aorta y de las arterias coronarias, y reducir la rigidez de los vasos de pequeño calibre a la vez que mejora la disfunción endotelial en el modelo de ratas SPSHR (ratas espontáneamente hipertensas con propensión al accidente cerebrovascular, del inglés “Stroke-prone spontaneously hypertensive rat”). Al asociar un ARA II, este último efecto se vio potenciado, independientemente del efecto observado sobre la presión arterial (125).

En la literatura podemos encontrar que los  $\beta$ -bloqueantes como el atenolol, no mejoran la estructura de los vasos de pequeño calibre (129). Sin embargo, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo estudios preclínicos en los que se observa la existencia de una regresión del remodelado de las arterias intramiocárdicas (130) y de las arterias coronarias (131) tras el tratamiento durante 48h con un  $\beta$ -bloqueante cardioselectivo, el esmolol.

- Cambios en la función de los vasos: en diversos estudios se ha observado que el tratamiento antihipertensivo parece mejorar la función deteriorada de las arterias de pequeño calibre causada por la hipertensión arterial. Todo apunta a que la normalización de la función del endotelio depende, en gran medida, del fármaco que se utilice más que del efecto que tenga sobre la presión arterial. De esta forma, está descrito que el tratamiento con enalapril o con amlodipino mejora la relajación inducida por acetilcolina (66). Existen estudios similares con ARA II (119, 120, 126) y con antagonistas del calcio (121, 122), pero cuando se analizó la literatura, los resultados obtenidos eran muy variables.

El tratamiento agudo con IECA no mostró mejoría en la función del endotelio in vivo (127, 128), pero el tratamiento crónico durante 2 años con cilazapril sí fue capaz de normalizar in vitro la función de las arterias de pequeño calibre humanas (129). Del mismo modo, los ARA II han mostrado ser capaces de normalizar la función del endotelio en un modelo experimental de diabetes mellitus precoz (132). Sin embargo, en los casos de diabetes mellitus tipo 2 asociada a hipertensión arterial, la terapia combinada de ARA II con antagonistas del calcio, no mostró mejoría en la función vascular, a pesar de que las alteraciones en la estructura del vaso se corregían parcialmente (124).

En lo que respecta a los fármacos  $\beta$ -bloqueantes, el esmolol sí que produjo una mejoría de la relajación inducida por acetilcolina (130), sin embargo, el atenolol no produjo mejoría en la función endotelial (116, 133, 134). El fracaso de este fármaco podría explicarse porque los mecanismos por los que actúa, pueden ser

diferentes en la capa media y en el endotelio vascular. Otra posible explicación podría ser que la disfunción endotelial es más resistente a esta terapia antihipertensiva, incluso cuando la presión arterial se ha normalizado (117, 120). Sin embargo, se ha observado que otro  $\beta$ -bloqueante, el nebivolol, un antagonista del ADR- $\beta_1$  y agonista del ADR- $\beta_{2,3}$ , mejoraba la disfunción endotelial en la arteria pulmonar en un modelo de hipertensión arterial pulmonar en humanos (135).

Los efectos que pudieran tener ciertos antioxidantes como las vitaminas E y C o los carotenos sobre el remodelado arterial, han sido estudiados en un modelo experimental de hipertensión con resultados poco satisfactorios (136, 137). Una posible explicación al fracaso de estos antioxidantes es que la formación de los scavengers de ROS podría ser muy tardía, cuando ya se ha establecido el daño tisular. Algunos estudios clínicos que evalúan a los inhibidores de la xantina oxidasa (109-111) y a la N-acetilcisteína, muestran una mejoría en la función del endotelio y un poder hipotensor en pacientes hipertensos con enfermedad renal crónica y con hipertensión pulmonar (111-113). Recientemente, la imperatorina OW1 (138) ha demostrado producir regresión en el remodelado vascular en un modelo experimental de rata con hipertensión renovascular.

- Efecto sobre arteriolas: las arteriolas, con un diámetro interno  $<100 \mu\text{m}$ , están implicadas en el aumento de resistencias vasculares que se observa en el paciente con hipertensión arterial (139). La hipertensión induce el remodelado eutrófico en las arteriolas de gran calibre, tal y como se describió en las arteriolas piales de las ratas SPSHR (25). La rarefacción es un tipo de remodelado que

implica la reducción en la densidad de los vasos de pequeño calibre, y es la responsable de un 15-30% del incremento de la resistencia arterial periférica en la hipertensión arterial (140). El efecto de los fármacos antihipertensivos sobre el proceso de rarefacción ha sido demostrado en modelos experimentales (141), pero aún no en la hipertensión humana. Los IECAS por su parte, han demostrado ser capaces de revertir la rarefacción al reducir los niveles de angiotensina II y a través de mecanismos de vasodilatación arterial. Se ha relacionado la activación de los AT<sub>1</sub>R con el desarrollo de rarefacción a través de mecanismos proapoptóticos, mientras que los AT<sub>2</sub>R participan en la vasodilatación arterial y en la corrección de la rarefacción (142). Algunos investigadores además, sugieren un efecto antiangiogénico del receptor AT<sub>2</sub>R con un papel aún desconocido sobre la regresión del remodelado (143).

#### **1.4.2. Permanencia en el tiempo del efecto farmacológico en la regresión del remodelado vascular hipertensivo**

Tal y como ya se ha explicado, la hipertensión es una enfermedad compleja y un importante factor de riesgo para padecer eventos cardiovasculares adversos, los cuales se relacionan con el remodelado estructural y funcional que ocurre en el sistema cardiovascular. La regresión de dichos cambios es un objetivo primordial de la terapia antihipertensiva. El tratamiento crónico con diversos fármacos antihipertensivos (IECA, ARA II, antagonistas del calcio,  $\beta$ -bloqueantes y diuréticos), ha demostrado revertir el remodelado vascular tanto en humanos como en modelos experimentales de hipertensión (144). Incluso, ya hay estudios que

demuestran que el tratamiento a corto plazo con esmolol, produce una reversión en el remodelado cardiovascular (1, 17).

Sin embargo, los estudios aportan resultados más diversos con respecto al mantenimiento a largo plazo del efecto beneficioso de estos fármacos sobre el remodelado vascular. Algunos autores afirman que, tanto en humanos como en el modelo de las SHR, los efectos beneficiosos sobre el remodelado cardiovascular que produce el tratamiento a largo plazo con estos fármacos antihipertensivos, desaparecen si el tratamiento se abandona (145).

Estudios realizados hace más de 30 años, analizaban el efecto que tenía el tratamiento con diversos antihipertensivos en la presión arterial y en la estructura de vasos mesentéricos en un modelo experimental de rata SHR, viendo que el control sobre estos parámetros que se producía durante el tratamiento, no se mantenía tras abandonar el mismo (146). Asimismo, concluyeron que el fármaco que mayor eficacia parecía demostrar era el grupo de los IECA.

En un estudio de Marque y colaboradores realizado en el modelo de las SHR, se observó que el tratamiento durante un año con captopril asociado a hidroclorotiazida, producía una disminución en la presión arterial, la tensión de la pared y aumentaba el contenido de elastina, y que al retirar el tratamiento, aunque el contenido de elastina permanecía elevado, tanto la presión arterial como la

rigidez de la pared, se equiparaban de nuevo a los valores que presentaban las SHR no tratadas (147).

Otro estudio realizado por Rocha y publicado en 2010, demostró que el tratamiento de ratas SHR en fase de prehipertensión con captopril durante 10 semanas, producía una disminución de la presión arterial y evitaba el remodelado aórtico. Sin embargo, dichos efectos beneficiosos sobre el remodelado desaparecían 8 semanas después de haber abandonado el tratamiento (145).

Al estudiar esto mismo en ratas adultas SHR, con la hipertensión ya establecida, vieron que los IECA, los ARA II y la hidralazina, producían una disminución de los niveles de presión arterial durante el tratamiento, pero una vez finalizado el mismo, solo el IECA mantenía bajos esos niveles de presión arterial (147). En cuanto al remodelado cardiovascular, únicamente los bloqueadores del SRAA mantenían cierto efecto beneficioso 8 semanas después de haber finalizado el tratamiento.

En el estudio de Sevilla y colaboradores, el tratamiento con amlodipino durante 6 meses produjo una disminución de la presión arterial, de la HVI y de la fibrosis cardíaca de las ratas SHR. A los 3 meses de la suspensión del tratamiento, sólo mantuvo el efecto sobre la fibrosis cardíaca (148).

## **1.5. SHR: MODELO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL PRIMARIA EN HUMANOS**

La fisiopatología de la hipertensión esencial humana es altamente compleja, y por ello, los modelos experimentales de hipertensión han sido útiles para identificar los diferentes mecanismos que están implicados tanto en su desarrollo como en su mantenimiento, además de ser un instrumento con el cual ensayar el efecto de los fármacos antihipertensivos.

Dentro de estos modelos animales de hipertensión arterial, cabe destacar el de las ratas espontáneamente hipertensas, las SHR. Esta cepa fue desarrollada por el grupo de Okamoto al seleccionar y cruzar las ratas de la cepa Wistar Kyoto (WKY) que presentaban una presión arterial elevada (149). La cepa WKY es el control normotenso que se desarrolló en 1971 a partir del cruce entre animales de una misma camada (150). A pesar de su origen, la diferencia genética entre las WKY y las SHR es muy importante, comparable a la que podría existir entre personas no emparentadas (151-153).

La cepa SHR se ha convertido en un modelo experimental excelente para estudiar la hipertensión esencial humana, ya que existe multitud de similitudes entre ambas. En ambas, partimos de una predisposición genética a desarrollar una presión arterial elevada de etiología desconocida, existe un incremento de la resistencia vascular periférica y una respuesta muy similar al tratamiento antihipertensivo (154).

El modelo de las SHR, además, presenta una progresión a lo largo de la vida del animal de las alteraciones hemodinámicas, al igual que ocurre en los pacientes que padecen hipertensión arterial. De este modo, las SHR tienen una fase de “pre-hipertensión”, continuada por una fase de desarrollo de la enfermedad que culminará con el establecimiento de la hipertensión arterial. Durante las primeras fases del desarrollo de la hipertensión, al igual que ocurre en el humano, en las SHR existe un aumento del gasto cardíaco, seguido de una normalización del mismo con aumento de la resistencia periférica total cuando la hipertensión ya está establecida (155-157). Como se observa en los humanos, en la cepa SHR también existe diferencias según el género del animal en cuanto al desarrollo de la hipertensión, siendo los machos los que alcanzan valores mayores de presión arterial (158), lo que va a favor del dimorfismo sexual en cuanto a la hipertensión arterial en este modelo animal (159-161). En los estudios realizados con ecocardiografía, se ha observado diferencias en la estructura del ventrículo izquierdo entre machos y hembras, y aunque en ambos sexos existe hipertrofia ventricular izquierda, sólo en machos aparece una dilatación del ventrículo con aumento de la rigidez del mismo (162). En cuanto a la función cardíaca, las diferencias observadas pueden deberse a las diferencias anatómicas entre ambos sexos, ya que las hembras poseen unos músculos papilares con más capacidad de acortamiento, generando mayor tensión por unidad de masa (163, 164). Además en la hembra existe una reserva hipertrófica adaptativa mayor, lo que retrasa la aparición de insuficiencia cardíaca (165), llegando incluso algunos autores a no poder observar insuficiencia cardíaca en hembras estudiadas durante los dos años y medio de edad (162).

Basándonos en estos argumentos, es el macho de las SHR la que se utiliza como modelo experimental de hipertensión arterial crónica humana (162).

Otro factor a tener en cuenta es la edad del animal. La hipertrofia ventricular izquierda aparece a las 4 semanas de edad, la disminución de la función sistólica a las 8 semanas y la disfunción diastólica a los 3 meses de vida (166). Cuando se alcanza los 11 meses de edad, el animal presenta un estado de hipercontractilidad, con aumento de la función sistólica, que es reflejo del aumento progresivo de la hipertrofia ventricular, manteniendo la disfunción diastólica (167). En el último estadio de la enfermedad, alrededor de los 18-24 meses, aparece la insuficiencia cardíaca. El modelo de las SHR, como modelo de hipertrofia del miocardio, presenta alteraciones del metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos a nivel cardíaco, igual que ocurre en los humanos. En la hipertrofia ventricular existe una disminución en el transporte y en la oxidación de los ácidos grasos, además de alteraciones en el complejo enzimático del ciclo de Krebs (168, 169). El corazón de las SHR, tiene suprimida la oxidación de los ácidos grasos y aumentada la oxidación de la glucosa (170).

En el caso de las ratas normotensas, las WKY, el metabolismo de los ácidos grasos es mayor que en las SHR, aunque se ve disminuido con la edad (171).

El modelo SHR además, tiene un importante déficit del transportador de ácidos grasos CD36 (cromosoma 4), que es el encargado de transportarlos hacia

el interior de la célula (172). Dicho déficit, compromete por tanto la utilización adecuada de los ácidos grasos y aumenta el metabolismo de la glucosa (171). Se ha comprobado que la administración de una dieta con ácidos grasos, que no requiere el transportador CD36, suprime el metabolismo de la glucosa y con ello la hipertrofia miocárdica en las SHR (172). Varios estudios 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 SHR cuando ya tiene 4 meses de edad (173) y la hipertrofia ventricular con solo 4 semanas de edad.

## 1.6. JUSTIFICACIÓN

Los principales resultados que podemos extraer de la revisión bibliográfica y de la trayectoria de nuestro grupo en esta línea de investigación, y que justifican el planteamiento de la hipótesis y objetivos que desarrollaremos más adelante, se exponen a continuación:

- La hipertensión arterial es un síndrome complejo que fomenta la aparición de eventos cardiovasculares adversos, y la actuación temprana sobre el remodelado cardiovascular utilizando la terapia antihipertensiva, disminuye la incidencia de estos eventos y la mortalidad asociada a la hipertensión arterial.
- El tratamiento crónico, durante meses o años, con diversos fármacos antihipertensivos, incluidos los  $\beta$ -bloqueantes, ha demostrado favorecer la regresión del remodelado arterial coronario en modelos experimentales de hipertensión arterial.
- Nuestro grupo de investigación ha demostrado con anterioridad que, el tratamiento durante un periodo corto (48h) con un  $\beta$ -bloqueante cardiosselectivo de acción ultracorta, el esmolol, produce una regresión precoz de la hipertrofia ventricular izquierda (17) y del remodelado de las arterias coronarias (1).

- Hasta el momento, no se ha estudiado si este efecto que se produce de manera precoz con el esmolol, se mantiene una vez finalizado el tratamiento, motivo por el cual, decidimos poner en marcha este estudio experimental.

## ***2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

## 2.1. HIPÓTESIS

En el presente estudio se estableció como **Hipótesis**, que el efecto beneficioso del clorhidrato de esmolol sobre la regresión del remodelado vascular persiste más allá de las 48 horas de tratamiento ( $H_1$ ), asumiendo como hipótesis nula ( $H_0$ ) la ausencia de dicho efecto una vez finalizado el tratamiento.

## 2.2. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo es estudiar la permanencia en el tiempo de los efectos producidos por el clorhidrato de esmolol sobre el remodelado vascular tras 48 horas de tratamiento, en un modelo experimental de rata espontáneamente hipertensa (SHR).

Los **objetivos secundarios** son:

1. Analizar si el efecto del esmolol sobre la estructura de las arterias coronarias permanece una vez finalizado el tratamiento.
2. Averiguar si la mejora en la capacidad funcional de las arterias coronarias tratadas con esmolol permanece una vez finalizado el tratamiento.
3. Evaluar el efecto que tiene el esmolol sobre diversos biomarcadores de estrés oxidativo y su evolución a lo largo del tiempo, una vez finalizado el tratamiento.

### **2.3. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

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

El animal de experimentación seleccionado fue la rata genéticamente hipertensa (SHR), escogiendo ratas macho adultas de 14 meses de edad como población de estudio. Es el modelo animal utilizado en estudios previos por nuestro grupo de investigación, manteniendo una continuidad en la línea de investigación.

Los animales se distribuyeron, de manera aleatoria, en dos grupos según recibieran a través de una perfusión intravenosa durante 48h, una solución de clorhidrato de esmolol (300 µg/kg/min) o de placebo (suero salino fisiológico).

Posteriormente, en cada grupo se establecieron tres subgrupos, atendiendo al momento en el que se realizaron los distintos experimentos: SHR tras 48h de tratamiento (esmolol o placebo), SHR a la semana de la finalización del tratamiento (esmolol o placebo), y SHR al mes de la finalización del tratamiento (esmolol o placebo).

Para la realización de la totalidad de los experimentos y grupos, se incluyeron 102 animales.

En el presente trabajo se han combinado técnicas de análisis de función y de estructura vascular que se relacionan a continuación:

**a) Estudio de los parámetros fisiológicos**

Medición de la presión arterial sistólica y de la frecuencia cardíaca en cuatro momentos: antes de iniciar el tratamiento, a las 48h, a la semana y al mes de haber finalizado el tratamiento.

**b) Análisis de la función de la arteria coronaria**

El miógrafo de alambre nos permitió estudiar la respuesta vasoconstrictora a 5-hidroxitriptamina (5-HT), y la vasodilatadora a acetilcolina (Ach) y a nitroprusiato (NPS) de la arteria coronaria descendente anterior en los tres momentos del estudio (48h, a la semana y al mes de la finalización del tratamiento) (174).

**c) Evaluación de la estructura de la arteria coronaria**

Gracias a la microscopía confocal, pudimos estudiar la geometría del vaso y analizar la composición de su pared (tanto la capa media como la adventicia). Para ello volvimos a utilizar la arteria coronaria descendente anterior, analizándola en los tres momentos del estudio (48h, una semana y un mes tras finalizar el tratamiento) (175).

**d) Estudio de biomarcadores de estrés oxidativo**

Para identificar posibles mecanismos implicados en el efecto observado con el esmolol sobre la regresión del remodelado vascular, determinamos cuatro

biomarcadores de estrés oxidativo en plasma: nitratos, glutatión (GSH), malondialdehído + 4-hidroxiacetonal (MDA + HNE) y carbonilos. Siguiendo el proceder del resto de los experimentos, dichos biomarcadores fueron analizados en los tres momentos del estudio (tras 48h de tratamiento, una semana y un mes tras finalizar el tratamiento).

# ***3. MATERIAL Y MÉTODOS***

### **3.1. MATERIAL**

#### **3.1.1. Animal de experimentación**

En este estudio fueron seleccionadas ratas adultas de 14 meses de edad, machos, de la cepa *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR/NHsd, Laboratorio Harlan S.A. Castellar del Valles, Barcelona).

Los animales fueron criados y estabulados en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (nº de Registro/EX021-U), bajo condiciones controladas de humedad (44 - 55%) y temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), con ciclos de 12h de luz y 12h de oscuridad. La alimentación que se suministró fueron pellets de pienso AO4 (PANLAB S.L.) junto con agua “ad libitum”.

Todo el proceso de crianza, mantenimiento y manipulación de los animales se realizó siguiendo la normativa legal establecida por la Directiva 2010/63/UE y el RD 53/2013 sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

El desarrollo experimental del estudio se llevó a cabo 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). Ambos centros tienen sus animalarios 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 del 4 de agosto de 1989 (BOCM del 24 de agosto). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal y el Comité de Investigación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, el Órgano Habilitado y la Comunidad de Madrid (PROEX 110/17).

El total de animales empleados para la realización de los distintos experimentos fue de 102 ratas, divididas en los diferentes grupos según se muestra en las tablas 3 y 4.

<b>Grupo</b>	<b>SHR 48h</b>	<b>SHR 7 días</b>	<b>SHR 1 mes</b>	<b>SHR-E 48h</b>	<b>SHR-E 7 días</b>	<b>SHR-E 1 mes</b>
<b>Nº animales</b>	9	9	9	9	9	9

Tabla 3: Grupos experimentales y número de animales incluidos en cada grupo para el estudio hemodinámico, de la función y de la estructura del vaso. **SHR 48h**, ratas espontáneamente hipertensas no tratadas y analizadas a las 48h; **SHR 7 días**, ratas espontáneamente hipertensas no tratadas y analizadas a los 7 días; **SHR 1 mes**, ratas espontáneamente hipertensas no tratadas y analizadas al mes; **SHR-E 48h**, ratas espontáneamente hipertensas tratadas con esmolol y analizadas a las 48h; **SHR-E 7 días**, ratas espontáneamente hipertensas tratadas con esmolol y analizadas a los 7 días; **SHR-E 1 mes**, ratas espontáneamente hipertensas tratadas con esmolol y analizadas al mes.

<b>Grupo</b>	<b>SHR 48h</b>	<b>SHR 7 días</b>	<b>SHR 1 mes</b>	<b>SHR-E 48h</b>	<b>SHR-E 7 días</b>	<b>SHR-E 1 mes</b>
<b>Nº animales</b>	8	8	8	8	8	8

Tabla 4: Grupos experimentales y número de animales incluidos en cada grupo para el estudio del estrés oxidativo. **SHR 48h**, ratas espontáneamente hipertensas no tratadas y analizadas a las 48h; **SHR 7 días**, ratas espontáneamente hipertensas no tratadas y analizadas a los 7 días; **SHR 1 mes**, ratas espontáneamente hipertensas no tratadas y analizadas al mes; **SHR-E 48h**, ratas espontáneamente hipertensas tratadas con esmolol y analizadas a las 48h; **SHR-E 7 días**, ratas espontáneamente hipertensas tratadas con esmolol y analizadas a los 7 días; **SHR-E 1 mes**, ratas espontáneamente hipertensas tratadas con esmolol y analizadas al mes.

### 3.1.2. Fármaco

El fármaco utilizado en este estudio fue el clorhidrato de esmolol (Brevibloc<sup>®</sup>, Baxter S.A. United Kingdom), solución de 10 mg/ml. El fármaco se administró en perfusión intravenosa continua a la dosis de 300 µg/kg/min durante 48 horas.

### 3.1.3. Material anestésico y quirúrgico

#### a) Fármacos anestésicos

Administrados por vía intraperitoneal:

- Ketamina 80 mg/Kg (Ketolar<sup>®</sup> 50 mg/ml; Parke-Davis, Madrid, España).
- Diazepam 10 mg/Kg (Valium<sup>®</sup> 10mg/ml; Roche Pharmaceuticals, Madrid, España).

### **b) Material quirúrgico**

El catéter venoso central así como el material quirúrgico utilizado para su colocación en el animal, fueron los siguientes:

- Catéter de polietileno, PE 10, diámetro interno 0,28 mm, diámetro externo 0,61 mm (Clay Adams, U.S.A.).
- Material de microcirugía (Schreiberg 70-0950, Germany).
- Hojas de bisturí nº 11 y 22.
- Seda trenzada, sutura no absorbible de 5/0 para ligar la vena yugular interna y de 2/0 para la piel (Lorca-Marin, Murcia, España).

### **3.1.4. Material para el estudio fisiológico**

- Balanza de tres barras (OHAUS, Florham Park, N.Y. 07932, U.S.A.) para el pesado de animales pequeños.
- Estufa para animal pequeño (JP Selecta S.A. Barcelona, España).
- Dispositivo para medir tensión arterial y frecuencia cardíaca: 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 programa NIPREM 1.5 para analizar los datos. La presión arterial sistólica se mide mediante pletismografía.

### **3.1.5. Material de estudio de la estructura arterial: microscopía**

#### **confocal**

- Marcador nuclear DAPI (1:500 de la solución 5 mg/mL).
- Citifluor (AF2, Aname, España).
- Equipo de microscopía 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).

### **3.1.6. Material de estudio de la función arterial: miógrafo de alambre**

- Solución Krebs-Henseleit.
- Fármacos: acetilcolina (Ach), serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) y nitroprusiato (NPS).
- Material quirúrgico de disección para arterias coronarias.
- Miógrafo de alambre myograph (Multi Myograph System, model 610M; Danish Myo-Technology).
- Programa de adquisición de datos: Powerlab (AD-Instruments, Castle Hill, Australia).

### **3.1.7. Material para el estudio del estrés oxidativo plasmático**

#### **a) Reactivos**

- N-etilmaleimida (NEM) E3876 Sigma-Aldrich.
- Ácido tricloroacético (TCA) Sigma-Aldrich T6399-100G.

- Metanol Panreac 141091.1211
- Nitrato Merck 70155228
- Cloruro de vanadio Sigma-Aldrich 20,827-2.
- Sulfanilamida 2% Sigma S-9251
- N-1-naftil-etilenediamina diclorhidrato (NED) Sigma-Aldrich N 9125-10G
- L-Glutation reducido (GSH) G4251-300MG Sigma-Aldrich.
- O-ftalaldehido (OPT) 9253 Fluka.
- Dinitrofenilhidrazina (DNPH) Sigma-Aldrich D199303-25G.
- Ácido clorhídrico 37% Panreac 131020.1611
- Etanol Sigma-Aldrich 147559.
- Acetato de etilo Sigma-Aldrich 324027.
- Guanidina Sigma-Aldrich G4505-100G.
- Reactivo de Bradford (colorante de azul Coomassie) Protein Assay 161-0700 Bio-Rad.
- Albúmina de suero de bovino (BSA) Sigma-Aldrich A7906-10G.
- Agua Milli-Q

***b) Equipo utilizado***

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

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Método anestésico y quirúrgico**

Para la colocación del catéter venoso central en la vena yugular interna derecha, primero se procedió a sedar al animal con ketamina (80 mg/kg) y diazepam (10 mg/kg) por vía intraperitoneal.

Con el animal sedado, se realizó una incisión longitudinal de unos 2 cm con un bisturí en la región lateral del cuello, a la altura del paquete vascular. De esta manera, los vasos quedaron expuestos y se pudo disecar la vena yugular interna derecha separándola de otras estructuras vecinas.

Realizando una mínima incisión en la vena, se logró introducir el catéter en su interior, fijándolo mediante ligaduras para evitar su deslizamiento, una vez comprobada su permeabilidad.

Cuando el catéter estuvo introducido, se procedió a tunelizarlo por el tejido subcutáneo del animal hacia la nuca, por donde se exteriorizó. Se fijó de nuevo y se suturaron las incisiones realizadas. Como medida de protección adicional, se colocó un dispositivo cervical en el animal.

Una vez que el efecto de la sedación desapareció, se comenzó a infundir a través del extremo distal del catéter el tratamiento en perfusión continua, ya fuese

la solución salina estéril (grupo control SHR) o la solución de esmolol a 300 µg/kg/min (grupo tratado SHR-E) durante 48 horas.

Finalizado el tratamiento, tanto el grupo de SHR (controles) como el de SHR-E (tratadas con esmolol) que fueron destinadas para la realización de los distintos experimentos a las 48h, fueron sacrificadas por los métodos más adecuados para cada experimento, mientras que el resto de animales, continuaron siendo cuidados.

Tras una semana o tras un mes de haber finalizado el tratamiento según el grupo de estudio, se procedió de nuevo al sacrificio del resto de ejemplares.

Para los estudios estructurales y funcionales de la arteria coronaria, se llevó a cabo la decapitación del animal, con la extracción inmediata del corazón. En el caso del estudio de los biomarcadores de estrés oxidativo, la obtención de la sangre se obtuvo por punción intracardiaca, previa sedación del animal con CO<sub>2</sub>.

### **3.2.2. Método del estudio fisiológico**

Las medidas de la presión arterial no invasiva y de la frecuencia cardíaca, se realizaron en el animal consciente. Antes de la toma de la presión arterial sistólica, se mantuvo al animal a 37°C sin humedad durante 20 minutos para producir vasodilatación de las arterias caudales. A continuación, se colocó el manguito del esfigomanómetro y la pinza-sensor en la cola del animal. La medición de la presión

arterial se realizó a través del método de la pletismografía. Es una técnica que, a pesar de ser no invasiva, puede ocasionar estrés al animal, por lo que, para evitar sesgos en la recogida de datos, se realizaron 10 mediciones consecutivas durante 3 días a cada animal, escogiéndose las medidas obtenidas el último día. Los momentos de medición de las diferentes variables fueron: basal (antes de la administración del fármaco o placebo, según el grupo), a las 48h (cuando finaliza el tratamiento), a los 7 días y transcurrido 1 mes.

### **3.2.3. Método del estudio de la estructura arterial**

#### ***Microscopía Confocal***

El principio de la microscopía confocal consiste en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello, se ilumina una zona pequeña de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces de los planos inferiores y superiores.

Este método se empleó para cuantificar el grosor de la pared, pudiendo diferenciar la capa media y la adventicia de la arteria coronaria descendente anterior, analizando para ello segmentos de 1 mm de longitud. Asimismo, se pudo contar el número de células presentes en ambas capas.

Con este fin se emplearon 54 ratas: SHR 48h (n=9), SHR 7 días (n=9), SHR 1 mes (n=9), SHR-E 48h (n=9), SHR-E 7 días (n=9) y SHR-E 1 mes (n=9).

### **a) *Procesamiento del vaso***

Los vasos se procesaron siguiendo el mismo procedimiento utilizado en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (175).

Tras obtener la arteria coronaria descendente anterior por disección, se prepararon segmentos de 1 mm de longitud, los cuales fueron fijados con paraformaldehído al 4%. De cada segmento se obtuvo un corte transversal en forma de anillo y otro longitudinal de la zona media del vaso, el cual fue dividido en dos partes iguales longitudinales para posteriormente montarlos por la cara adventicia uno y por la cara endotelial otro.

A continuación, los cortes fueron lavados durante 10 minutos con suero salino y teñidos con colorante nuclear DAPI (1:500 de una solución 5 mg/mL) durante 15 minutos, para finalizar de nuevo con dos lavados de 10 minutos cada uno en solución salina .

Tanto el anillo como los dos segmentos longitudinales, se montaron en portas con citifluor. Una sección longitudinal se montó con la capa endotelial hacia arriba, para visualizar la capa media, y la otra sección con la capa adventicia hacia arriba, para estudiar esta capa.

### ***b) Visualización***

En cada arteria se analizó, de forma aleatoria, tres regiones por cada sección longitudinal, visualizando las imágenes con un microscopio confocal con objetivo 20x y zoom de 8, longitud de onda de 405 nm de excitación y 410-475 nm de emisión.

Se capturaron de cada región las imágenes correspondientes a los cortes seriados de 1  $\mu\text{m}$  de grosor, de la capa adventicia (desde la parte externa hasta la aparición de la primera célula muscular de la capa media) y de la capa media (desde el endotelio hasta la aparición de la primera célula de la capa adventicia). De esta forma, se pudo determinar el grosor de ambas capas, tanto media como adventicia. La tinción de los núcleos de las células con el colorante DAPI, permitió el conteo celular de las dos capas.

Las imágenes correspondientes a los anillos (dos anillos por segmento y rata), fueron capturadas con un objetivo 20x y zoom de 2, longitud de onda de 488 nm de excitación y 515 nm de emisión, y sirvieron para la cuantificación del grosor de la capa media.

### ***c) Análisis cuantitativo de la estructura general y celular del vaso***

El análisis cuantitativo de la estructura del vaso se realizó a partir de las imágenes seriadas obtenidas con el microscopio confocal, utilizando el software de

análisis de imagen MetaMorph (Universal Imaging, Co., UK), el cual ya había sido utilizado en estudios previos del grupo (174).

Se cuantificaron los siguientes parámetros:

- Grosor de las capas media y adventicia ( $\mu\text{m}$ ): tanto las células de la capa media (células musculares lisas) como las de la capa adventicia, son reconocibles por su morfología y orientación en el plano. Como la distancia entre las secciones es de  $1 \mu\text{m}$ , el grosor de la capa media y de la adventicia se corresponde con el número de planos en los que aparecen sus células respectivamente (área de contaje  $8731,03 \mu\text{m}^2$ ).
- Número de células y densidad de las mismas: el número de células por milímetro de longitud se obtiene contando el número de núcleos que aparecen en las imágenes seriadas correspondientes a cada una de las capas, calculado por milímetro de longitud. Para estudiar la densidad celular en cada capa, se cuenta el número de células por  $\text{mm}^3$ .
- Grosor de la capa media (anillos): la captura de los anillos permite cuantificar el perímetro interno del vaso. Gracias a él, se puede calcular el diámetro interno (DI,  $\mu\text{m}$ ). El diámetro externo (DE,  $\mu\text{m}$ ) se obtiene sumando el grosor de la pared (GP  $\mu\text{m}$ , media + adventicia) y el diámetro interno (DI). Con el DE y el DI es posible calcular el área del vaso (CSA  $\mu\text{m}^2$ , media + adventicia).

### **3.2.4. Método del estudio de la función arterial**

#### ***Miógrafo de alambre***

Para el estudio de la función de la arteria coronaria descendente anterior izquierda, se emplearon un total de 54 ratas distribuidas de la siguiente manera: SHR 48h (n=9), SHR 7 días (n=9), SHR 1 mes (n=9), SHR-E 48h (n=9), SHR-E 7 días (n=9) y SHR-E 1 mes (n=9).

La metodología utilizada en esta parte del experimento, también se corresponde con la desarrollada por nuestro grupo de investigación en estudios previos (131).

Tras el sacrificio del animal, se extrajeron los corazones y se mantuvieron a 4°C en una solución previamente oxigenada de Krebs-Henseleit (KHS), cuya composición es la siguiente (en mmol/L): 115 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 4,7 KCl, 1,2 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11,1 glucosa, 0,01 Na<sub>2</sub>EDTA, ajustada a pH 7,4.

Con ayuda de un microscopio óptico y del material quirúrgico, se disecó la arteria coronaria descendente anterior izquierda, eliminando el tejido conjuntivo circundante, y fue cortada en segmentos de unos 2 mm de longitud. Unos segmentos fueron conservados refrigerados en tubos eppendorf con paraformaldehído al 4%, con la finalidad de realizar estudios de la estructura del vaso como ya se ha explicado.

Los otros segmentos, fueron montados en los canales diseñados para ese fin del miógrafo de alambre, conectado a un Sistema Powerlab de adquisición de datos, y manteniéndolos ya desde ese momento en solución de KHS oxigenada a 37°C (174).

Una vez estuvieron montados todos en sus respectivos canales, se realizó la normalización al diámetro de luz efectivo (0,9 L100), que se corresponde con el 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 mmHg.

Tras dejar pasar un periodo de estabilización de 30 minutos, para asegurar la integridad funcional de la arteria, se estimuló esta con una solución KHS con alto contenido en potasio (K<sup>+</sup>-KHS, 120 mmol/L), generando una tensión activa.

#### **3.2.4.1. Respuesta vasodilatadora endotelio dependiente**

Tras haber asegurado la integridad funcional de la arteria, dejamos otro periodo de 30 minutos de estabilización antes de comenzar el estudio de la función vasodilatadora dependiente de endotelio.

Para ello, realizamos la curva dosis-respuesta a la Ach, administrando dosis crecientes de Ach desde 10<sup>-9</sup> hasta 10<sup>-4</sup> mol/L, a los segmentos previamente contraídos con 5-HT (3x10<sup>-7</sup> mol/L). La respuesta vasodilatadora obtenida se

expresó como porcentaje de la contracción máxima inducida por 5-HT en cada segmento.

#### **3.2.4.2. Respuesta vasoconstrictora**

Tras un nuevo periodo de lavado de 30 minutos, realizamos la curva de dosis-respuesta a la 5-HT para el estudio de la función vasoconstrictora. Para ello, administramos dosis crecientes de 5-HT desde  $10^{-9}$  hasta  $3 \times 10^{-5}$  mol/L. La respuesta vasoconstrictora mediada por 5-HT se expresó como porcentaje de la respuesta máxima de la arteria contraída con  $K^+$ -KHS.

#### **3.2.4.3. Respuesta vasodilatadora endotelioindependiente**

En último lugar, se realizó la curva dosis-respuesta a NPS de ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  mol/L) en segmentos precontraídos con 5-HT ( $3 \times 10^{-7}$  mmol/L) para estudiar la función vasodilatadora endotelioindependiente.

### **3.2.5. Medición de parámetros de estrés oxidativo**

En la parte del estudio del estrés oxidativo en plasma, se emplearon 48 ratas: SHR 48h (n=8), SHR 7 días (n=8), SHR 1mes (n=8), SHR-E 48h (n=8), SHR-E 7días (n=8) y SHR-E 1mes (n=8).

#### ***a) Preparación del plasma***

Tras sedar a los animales con CO<sub>2</sub>, se obtuvo la sangre por punción intracardiaca. Las muestras de sangre se conservaron en tubos eppendorf con heparina al 5%, para someterlas a continuación a centrifugación a 900 g durante 10 minutos a 4°C. El plasma resultante se almacenó a -80°C en alícuotas de 200 µL hasta su análisis posterior.

#### ***b) Cuantificación de la capacidad antioxidante plasmática***

##### **3.2.5.1. Glutación reducido (GSH)**

El glutatión es el mayor antioxidante endógeno producido por las células, participando directamente en la neutralización de radicales libres y compuestos de oxígeno reactivo, así como en el mantenimiento de los antioxidantes exógenos como las vitaminas C y E en sus formas reducidas (activas).

A través de la conjugación directa, desintoxica muchos xenobióticos (compuestos extraños) y agentes carcinógenos, tanto orgánicos como inorgánicos.

Es esencial en el sistema inmunológico, y desempeña un papel fundamental en numerosas reacciones metabólicas y bioquímicas como la síntesis y reparación del ADN, la síntesis de prostaglandinas, la síntesis de proteínas y el transporte de aminoácidos (176).

Para medir los niveles de GSH se empleó un método espectro-fluorimétrico, que se basa en la reacción entre el o-ftaldialdehído (OPT) y el GSH, la cual produce una intensa señal de fluorescencia (Hissin, Hilf 1976) (177).

❖ **Protocolo:**

Se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de plasma con 12,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{HPO}_3$  (25%) y 37  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0). Esa mezcla se incubó durante 10 minutos a 4°C para permitir que las proteínas plasmáticas precipitasen. A continuación se preparó el sobrenadante mediante centrifugación a 2100 g durante 20 minutos a 4°C. Tras eso, se colocó 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante diluido en una placa multipocillo, y se hizo reaccionar con 10  $\mu\text{L}$  de OPT (0.1% p/v en metanol) y 180  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0). Esa mezcla se tuvo a temperatura ambiente y sin luz durante 15 minutos.

Para medir la fluorescencia, se utilizó un lector de placa Synergy™ HT con  $\lambda$  excitación = 360  $\pm$  40 nm y  $\lambda$  emisión = 460  $\pm$  40 nm y una sensibilidad de 75.

La concentración de GSH ( $\mu\text{g GSH/mg}$  de proteína) se estimó a partir de la recta de calibrado de GSH preparado en el rango de 0-10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y del contenido de proteína del plasma (método de Bradford).

### **3.2.5.2. Nitratos plasmáticos**

El óxido nítrico (NO) media en múltiples procesos fisiológicos y como consecuencia, interviene en diversas patologías. Pero el NO es difícil de medir debido a su corta vida media en presencia de oxígeno u otras moléculas como la hemoglobina. De esta forma, se mide indirectamente por los metabolitos intermedios que se acumulan de su degradación como los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). En plasma predominan los nitratos.

El método más comúnmente utilizado es el ensayo por espectrofotometría, el cual se basa en la formación de un colorante ácido por la reacción de los nitritos con el reactivo de Griess.

Bajo condiciones ácidas, los nitritos reaccionan con la sulfanilamida para producir el ión diazonio, el cual se une al NED para dar un producto cromóforo que puede leerse con absorbancia a 545 nm (Fig.7).

Los nitratos se pueden medir por este método tras la reducción a nitritos, algo que se logra enzimáticamente por la nitrato-reductasa o bien por la reducción metálica con cadmio o vanadio.

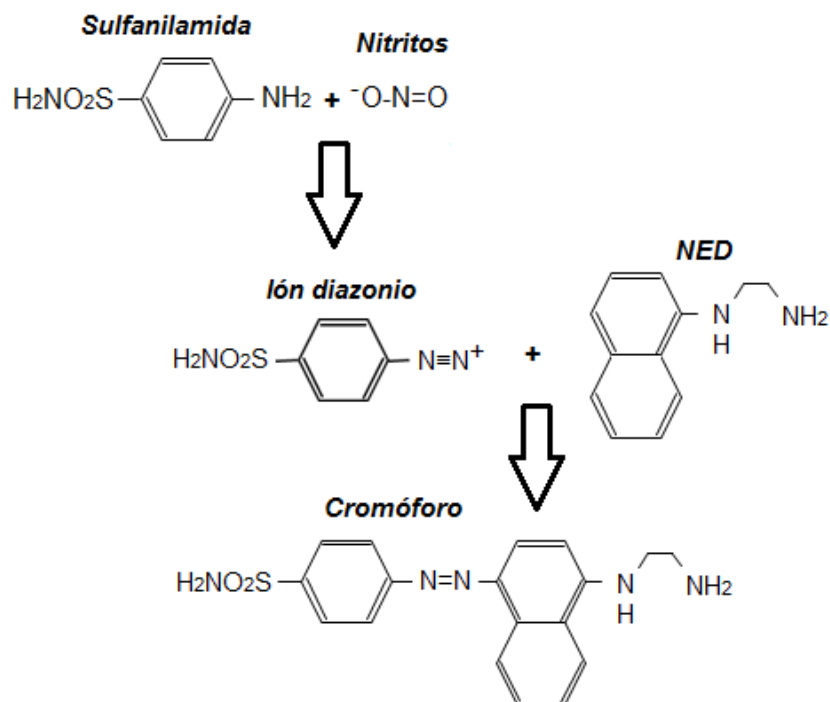


Figura 7: Representación esquemática del principio de reacción de Griess.

#### ❖ **Protocolo:**

Para la cuantificación de los niveles de nitratos plasmáticos en nuestras muestras se siguió el protocolo de Miranda (178), con algunas modificaciones.

Comenzamos combinando 100  $\mu\text{L}$  de plasma o nitrato estándar (concentración de 0 a 100  $\mu\text{M}$ , para confeccionar la recta de calibrado) y 10  $\mu\text{L}$  de NEM (150 mM) para eliminar grupos tioles que pudieran interferir con la reacción de Griess. A continuación, se añadió a la mezcla 110  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (20% p/v) incubando todo en hielo durante 5 minutos para precipitar las proteínas plasmáticas.

Tras centrifugar a 12 000 g a 4°C durante 5 minutos, se tomaron 40 µL del sobrenadante que se mezclaron, en una placa de 96 pocillos, con 40 µL cloruro de vanadio (saturado y disuelto en HCl 1M), 20 µL sulfanilamida (2% p/v; disuelta en HCl al 5% v/v) y 20 µL NED (0,1% p/v, disuelta en agua).

Posteriormente, la mezcla se incubó a 37°C durante 1 h, tras lo cual, leímos la placa con una absorbancia de 540 nm. El contenido de nitratos plasmáticos se expresó en µM de nitratos estimados a partir de la recta de calibrado descrita en el protocolo experimental.

### ***c) Cuantificación de la capacidad oxidante***

#### **3.2.5.3. Peroxidación lipídica (MDA + HNE)**

La peroxidación lipídica es un ejemplo ampliamente estudiado de daño oxidativo en las membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contengan lípidos. El malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinoneal (4-HNE) son subproductos tóxicos importantes de la peroxidación de lípidos. La medición de las cantidades de dichos aldehídos se ha utilizado ampliamente como índice de peroxidación lipídica in vitro e in vivo (179, 180).

El 4-HNE es un producto principal de la descomposición peroxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados ω-6 (PUFA) y posee propiedades citotóxicas, hepatotóxicas, mutagénicas y genotóxicas (181, 182). Se han encontrado niveles aumentados de HNE en plasma y varios órganos bajo condiciones de estrés oxidativo.

El MDA es en muchos casos el aldehído individual más abundante resultante de la peroxidación lipídica y se ha visto en condiciones in vitro, que puede alterar proteínas, ADN, ARN y muchas otras biomoléculas (183). Es producto de la descomposición de lípidos insaturados derivado del metabolismo del ácido araquidónico presente, sobre todo, en la membrana celular. El MDA aumenta con el daño de los tejidos, y reacciona con residuos de lisina, lo que provoca alteraciones proteicas que desencadenan mecanismos inmunológicos relacionados con enfermedades cardiovasculares (179, 184).

❖ **Protocolo:**

Para la realización de este experimento utilizamos el protocolo KB-03-002 de BiQuoChem (Gijón, España).

En primer lugar, añadimos 100  $\mu$ L de plasma a 325  $\mu$ L de reactivo A, el cual había sido previamente preparado siguiendo las especificaciones del protocolo. A continuación, añadimos 75  $\mu$ L del reactivo B y mezclamos. Incubamos las muestras a 40°C durante 40 minutos, tras lo cual, centrifugamos a 5 000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Colocamos 200  $\mu$ L de sobrenadante de cada tubo de eppendorf en los correspondientes pocillos de la placa. Por último, leímos la absorbancia a 586 nm en un lector de placa Synergy™ HT.

#### **3.2.5.4. Proteínas carboniladas**

El estrés oxidativo se describe como una situación en la cual las defensas antioxidantes son insuficientes para inactivar completamente a las especies reactivas de oxígeno. Este desequilibrio entre producción-destrucción de ROS puede afectar a gran parte de los componentes celulares, con la pérdida total o parcial de su función.

Los cambios producidos por el estrés oxidativo sobre las proteínas pueden ser reversibles o irreversibles, como es el caso de la carbonilación de las mismas. La formación de grupos carbonilo es el producto de la oxidación de proteínas más estudiado gracias a su estabilidad y fácil detección.

El método más comúnmente utilizado para la cuantificación de grupos carbonilo de las proteínas es el basado en su reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona. Este método se basa en que el DNPH es capaz de unirse covalentemente a los grupos carbonilos para dar lugar a hidrazonas estables.

El grupo dinitrodenilo (DNP) puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente debido a que exhibe un espectro de absorción característico con una absorbancia máxima a 365-375 nm.

Es importante tener en cuenta que como en cualquier análisis proteómico, el estudio de las proteínas carboniladas está sesgado a favor de aquellas más abundantes. Por tanto la determinación del nivel de carbonilación relativo de una determinada proteína es más informativo que el contenido total de proteína modificada, por ello se hacen ensayos Bradford previo a ensayos de carbonilo (185).

❖ **Protocolo:**

En primer lugar, colocamos en eppendorf 25  $\mu$ L de cada muestra de plasma con 25  $\mu$ L de DNPH 10 mM preparado previamente. A continuación, lo incubamos durante 15 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, realizando cada 5 minutos un mezclado de la muestra con vórtex. Tras esto, añadimos 50  $\mu$ L de TCA 20% a cada muestra y dejamos incubado en hielo otros 30 minutos. Pasado ese tiempo, centrifugamos las muestras a 2 100 g a 4°C durante 30 minutos. Finalizado el tiempo de centrifuga, eliminamos el sobrenadante y lavamos el precipitado con 200  $\mu$ L de etanol/acetato de etilo (1:1 v/v). Mezclamos bien el contenido y volvimos a centrifugar a 2 100 g, 4°C durante otros 30 minutos. Este proceso de centrifugado, eliminación de sobrenadante y lavado con etanol/acetato de etilo se realizó un total de tres veces.

Una vez realizados los pasos anteriores, disolvimos el pellet en 75  $\mu$ L de guanidina-HCl 6M y dejamos incubando durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, permitiendo así que las muestras solubilizaran.

Transcurrido ese tiempo, cargamos el total del volumen de las muestras en los pocillos de las placas junto con otros dos pocillos más de blanco (guanidina-HCl 6M) con el mismo volumen. La absorbancia la leímos a 370 nm y el cálculo de grupos carbonilo se realizó por coeficiente de extinción molar.

### **3.2.6. Método estadístico**

#### ***Tamaño muestral***

Por razones propias del modelo experimental utilizado, y teniendo en cuenta estudios previos, realizados por nuestro grupo de investigación (1), se incluyó un total de 102 ratas.

#### ***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***

Para las variables continuas, en primer lugar se analizó si la variable seguía una distribución normal o no (Kolmogorov-Smirnov). En caso afirmativo, se aplicó la T-Student de medidas repetidas. En los casos donde no hubo distribución normal, utilizamos test no paramétricos.

La T-Student de medidas repetidas se aplicó para estudiar si existían o no diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de estructura, función vascular (curvas dosis-respuesta de Ach, 5-HT y NPS) y estrés oxidativo, tanto intragrupo como intergrupo.

Para comparar la respuesta vasoconstrictora a la 5-HT y vasodilatadora a la Ach de los segmentos de la arteria coronaria descendente anterior, algunos resultados se expresaron como área bajo la curva dosis-respuesta (AUC).

Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . En todos los supuestos, 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.

## ***4. RESULTADOS***

#### 4.1. EFECTO DEL ESMOLOL SOBRE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y SU PERMANENCIA EN EL TIEMPO

Las ratas SHR machos de 14 meses de edad presentan hipertensión arterial establecida. Al comparar los parámetros fisiológicos (frecuencia cardíaca y presión arterial sistólica) entre los animales tratados con esmolol y los que recibieron placebo observamos que, en el momento basal (antes de iniciar el tratamiento) no había diferencias significativas entre ambos grupos, mientras que a las 48h, justo finalizando el tratamiento, sí existían diferencias estadísticamente significativas, con una reducción tanto de la frecuencia cardíaca como de la presión arterial sistólica en las ratas tratadas con esmolol. Dada la vida media corta del fármaco, comprobamos como a los 7 días y al mes de finalizar el tratamiento, dichas diferencias desaparecían, y los valores de frecuencia cardíaca y presión arterial sistólica en los grupos tratados con esmolol recuperaban sus niveles basales (Fig. 8 y 9).

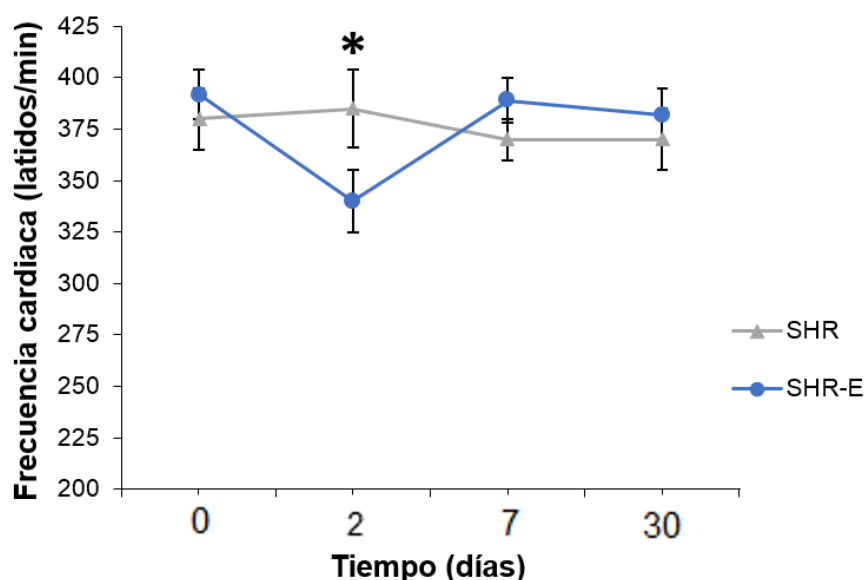


Figura 8: Frecuencia cardíaca de los grupos SHR y SHR-E medida en cuatro momentos: basal, a las 48 horas, a los 7 días y al mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. \* p<0.05 vs. SHR.

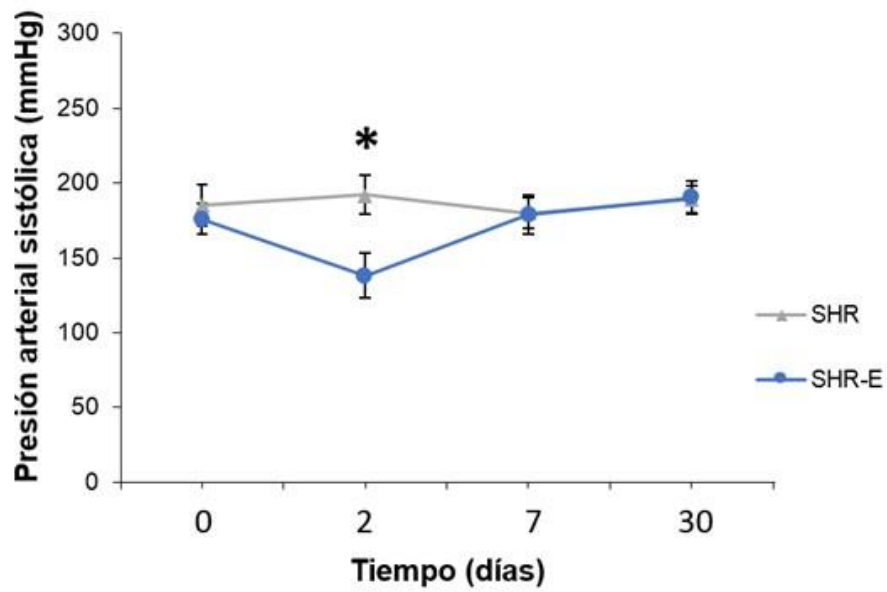


Figura 9: Presión arterial sistólica de los grupos SHR y SHR-E medida en cuatro momentos: basal, a las 48 horas, a los 7 días y al mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. \* p<0.05 vs. SHR.

## 4.2. EFECTO DEL ESMOLOL SOBRE LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES DE LA ARTERIA CORONARIA Y SU PERSISTENCIA EN EL TIEMPO

A continuación se exponen los resultados obtenidos al estudiar los cambios en la geometría de la arteria coronaria descendente anterior, utilizando para ello la técnica de microscopía confocal, tal y como se explica en el apartado de *Material y Métodos*.

En cuanto al **diámetro interno** del vaso, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles (SHR 48h, SHR 7d, SHR 1m) ni entre los grupos tratados con esmolol (SHR-E 48h, SHR-E 7d, SHR-E 1m). Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar cada grupo tratado con esmolol con su respectivo grupo control en los tres momentos del estudio (tras 48h del tratamiento, y una vez finalizado este a los 7 días y al mes) (Fig.10).

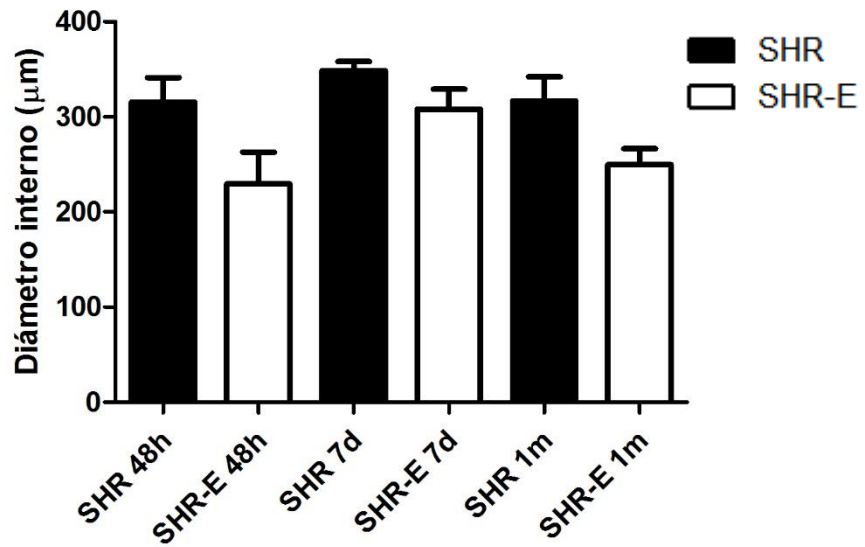


Figura 10: Valores del diámetro interno de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo.

Al analizar los resultados obtenidos del **diámetro externo** del vaso, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con esmolol y su respectivo control, tanto a las 48h, como su permanencia en el tiempo a la semana y al mes de finalizar el tratamiento, siendo el diámetro externo menor en los grupos que recibieron esmolol con respecto a los grupos que recibieron placebo (Fig.11).

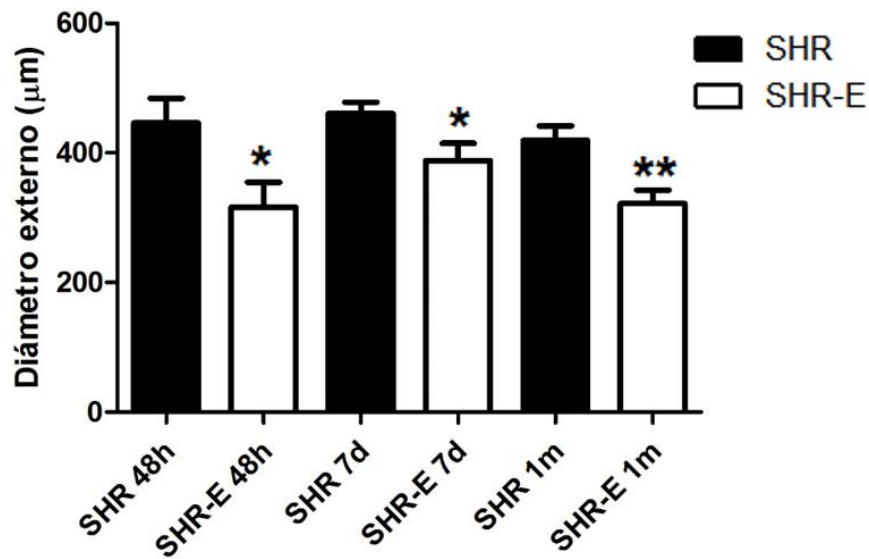


Figura 11: Valores del diámetro externo de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. SHR.

Al estudiar el **grosor de la pared**, observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con esmolol y su respectivo control, tanto a las 48h, como su permanencia en el tiempo a la semana y al mes de finalizar el tratamiento, siendo el grosor de pared menor en los grupos que recibieron esmolol con respecto a los grupos que recibieron placebo (Fig.12).

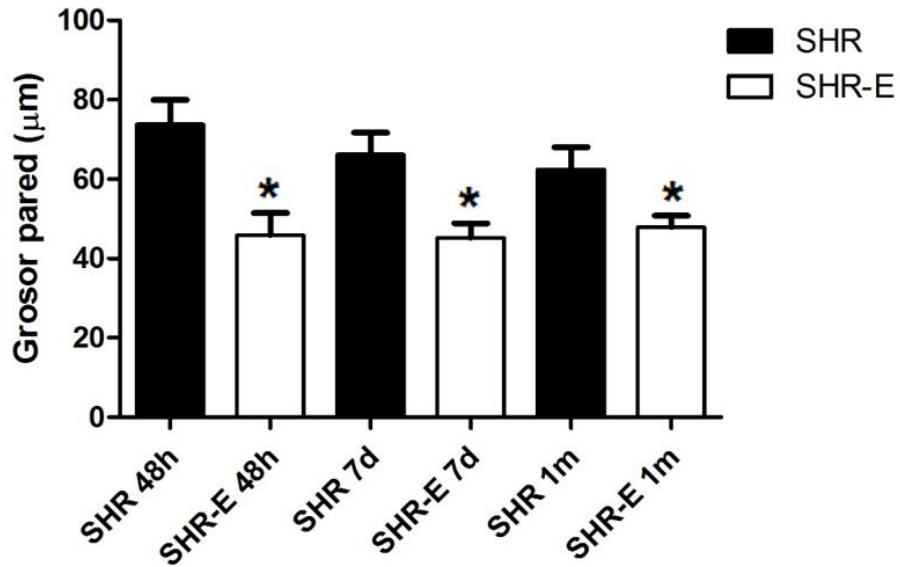


Figura 12: Valores del grosor de la pared de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. \*  $p < 0.05$  vs. SHR.

Al analizar la **relación entre el grosor de la pared y la luz del vaso**, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos tratados con esmolol y sus respectivos grupos tratados con placebo, en los tres momentos del estudio (Fig.13).

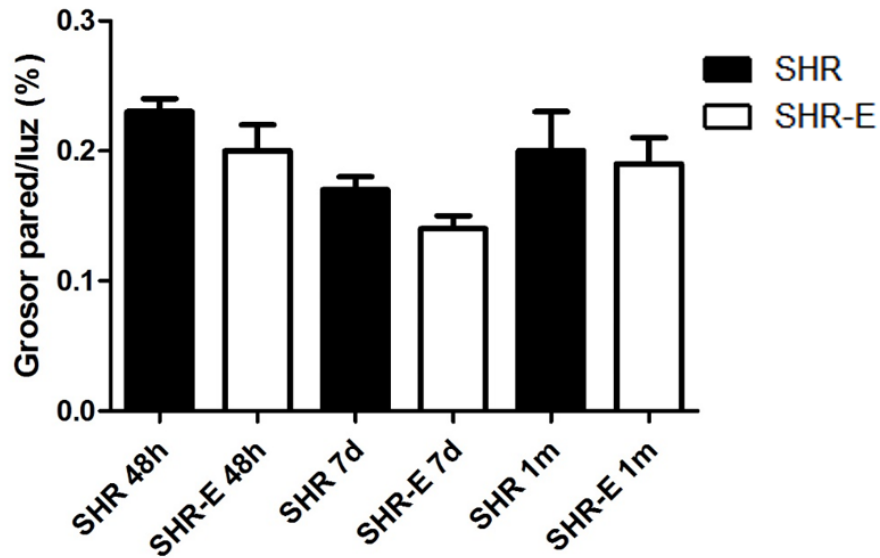


Figura 13: Valores de la relación entre el grosor de la pared y la luz de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo.

Al analizar el **área de sección de corte** del vaso, observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con esmolol y su respectivo control, tanto a las 48h, como su permanencia en el tiempo a la semana y al mes de finalizar el tratamiento, siendo el área de sección de corte menor en los grupos que recibieron esmolol con respecto a los grupos que recibieron placebo (Fig.14).

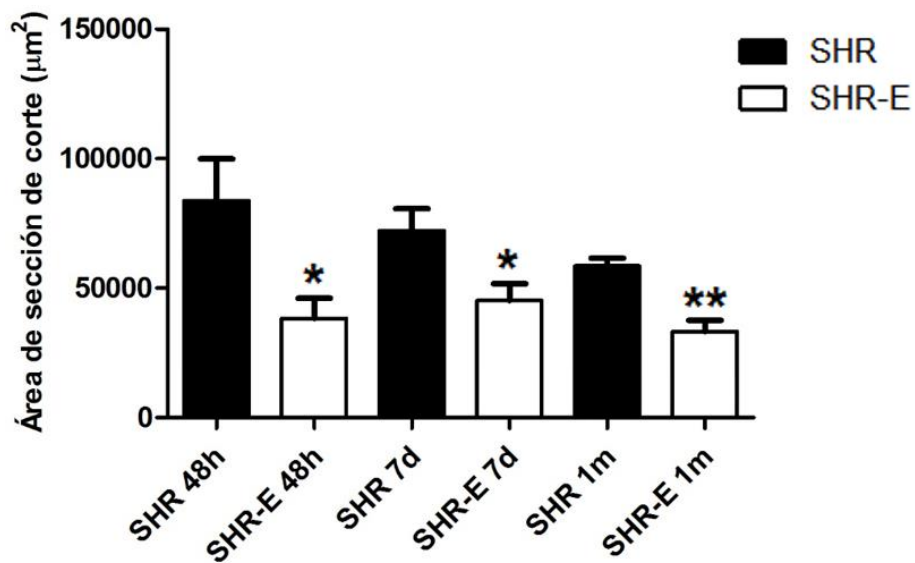


Figura 14: Valores de la sección de corte de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs. SHR.

A continuación, analizamos las capas media y adventicia del vaso, estudiando el grosor, el número de células y la densidad celular.

### **Capa media:**

Encontramos diferencias estadísticamente significativas en el **grosor de la capa media** entre el grupo tratado con esmolol y su respectivo control, tanto a las 48h, como su permanencia en el tiempo a la semana y al mes de finalizar el tratamiento, siendo el dicho grosor menor en los grupos que recibieron esmolol con respecto a los grupos que recibieron placebo (Fig.15 y 16).

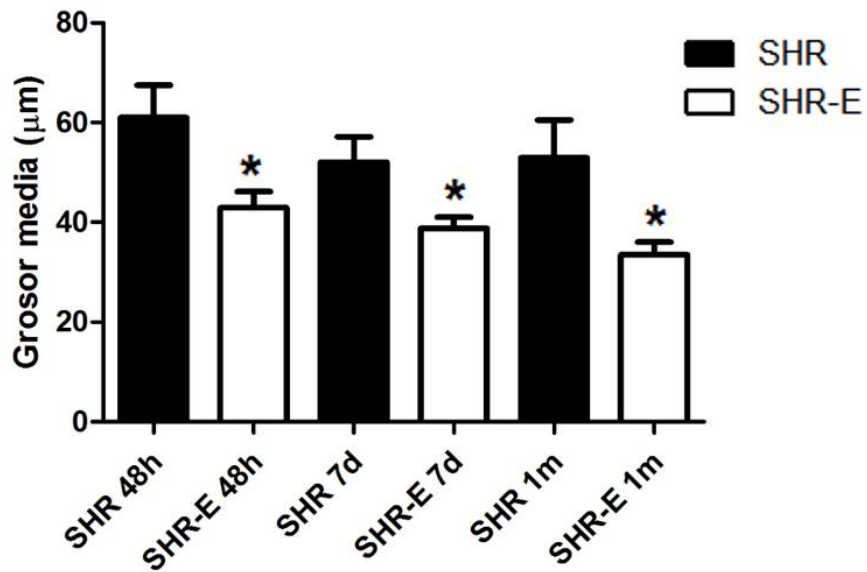


Figura 15: Valores del grosor de la capa media de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. \*  $p < 0.05$  vs. SHR.

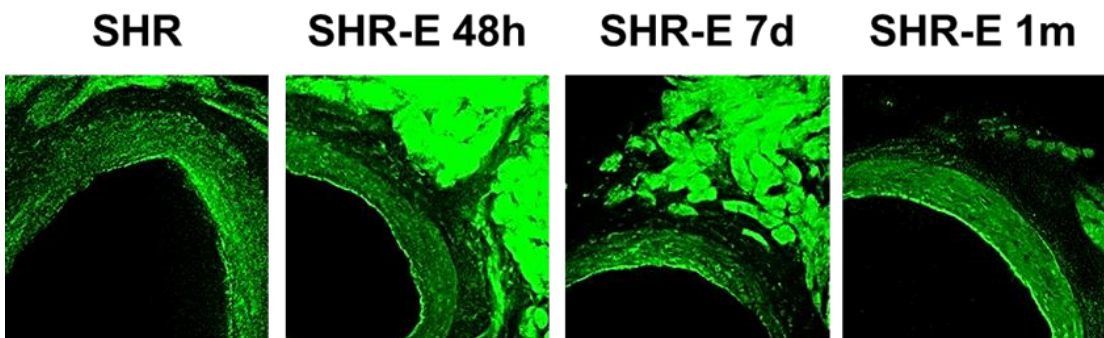


Figura 16: Imágenes de microscopía confocal representativas del detalle de un corte transversal del anillo de la arteria coronaria descendente anterior de los grupos SHR, SHR-E 48h, SHR-E 7d y SHR-E 1m. La capa media se visualizó de forma directa gracias a su autofluorescencia (verde), con un objetivo 20x y zoom de 2. Se puede observar que el grosor de dicha capa es mayor en la SHR que en las SHR-E en los tres momentos del estudio.

El análisis del **número de células de la capa media**, mostró una disminución estadísticamente significativa entre los grupos que recibieron esmolol con respecto a los grupos que recibieron placebo, en los tres momentos del estudio (Fig.17 y 18).

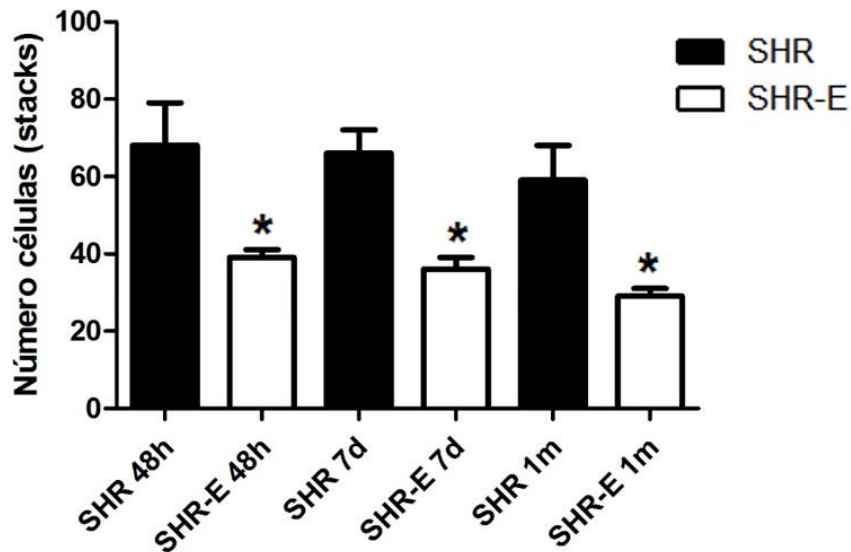


Figura 17: Valores del número de células de la capa media de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. \* p<0.05 vs. SHR.

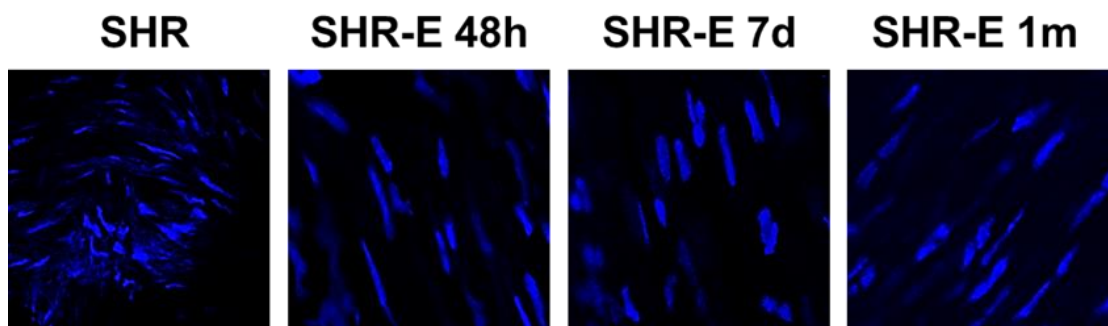


Figura 18: Imágenes de microscopía confocal representativas de las proyecciones de núcleos de células musculares lisas de la capa media, en corte longitudinal de la arteria coronaria descendente anterior de los grupos SHR, SHR-E 48h, SHR-E 7d y

SHR-E 1m. Los núcleos se visualizaron gracias a la tinción con DAPI (azul), con un objetivo 20x y zoom de 8. Nótese la disminución del número de núcleos (y, por tanto, de células) en la capa media de las SHR tratadas con esmolol en los tres momentos del estudio, comparado con la SHR control.

Por último, se analizó la **densidad celular de la capa media**, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con esmolol y sus respectivos controles en los tres momentos del estudio (Fig.19).

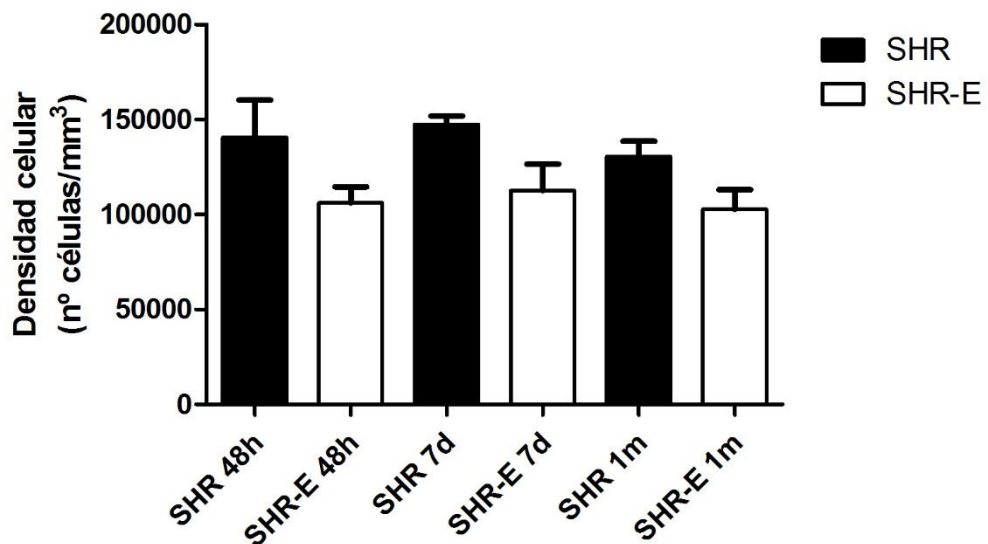


Figura 19: Valores de la densidad celular de la capa media de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo.

### Capa adventicia

Siguiendo la misma dinámica que con la capa media, analizamos en primer lugar el **grosor de la capa adventicia**, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con esmolol y sus respectivos controles en los tres momentos del estudio. Sin embargo, el esmolol produjo una disminución estadísticamente significativa del grosor de pared en el grupo SHR-E 7d con respecto al grupo SHR-E 48h (Fig. 20).

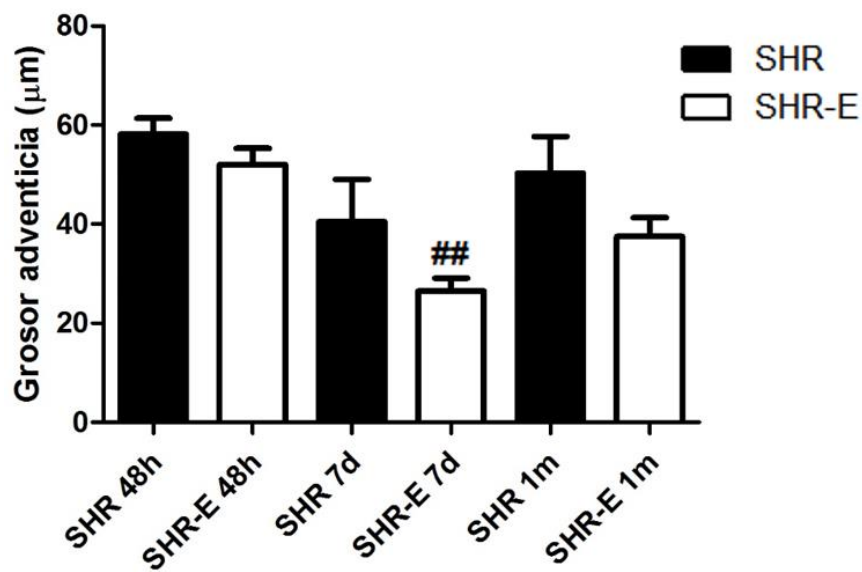


Figura 20: Valores del grosor de la capa adventicia de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. <sup>##</sup>p < 0.01 SHR-E 7d vs. SHR-E 48h.

Al analizar el **número de células de la capa adventicia**, encontramos una disminución estadísticamente significativa tras 48h de tratamiento con esmolol con respecto al grupo control, sin embargo esta disminución no se mantuvo a los 7 días y 1 mes de haber finalizado el tratamiento. El esmolol produjo una disminución estadísticamente significativa del número de células en el grupo SHR-E 7d con respecto al grupo SHR-E 48h (Fig.21 y 22).

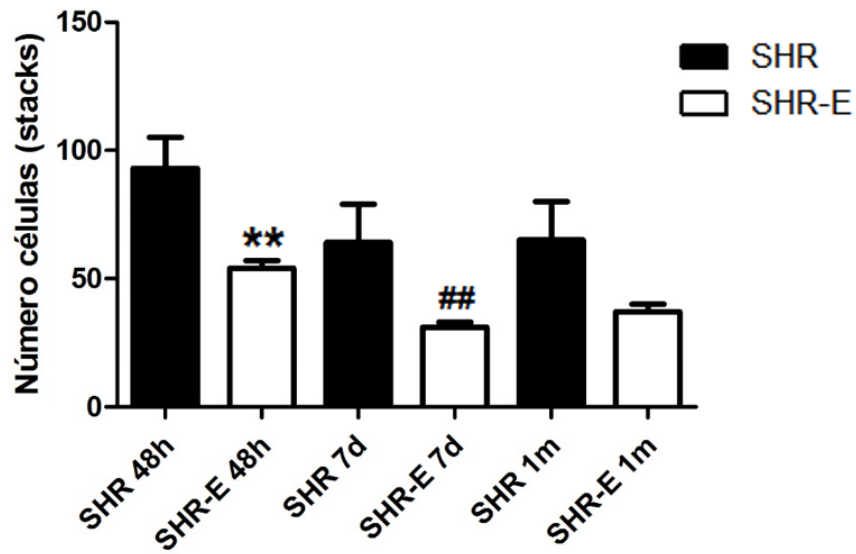


Figura 21: Valores del número de células de la capa adventicia de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM,  $n = 9$ . \*\* $p < 0.01$  vs. SHR; ## $p < 0.01$  SHR-E 7d vs. SHR-E 48h.

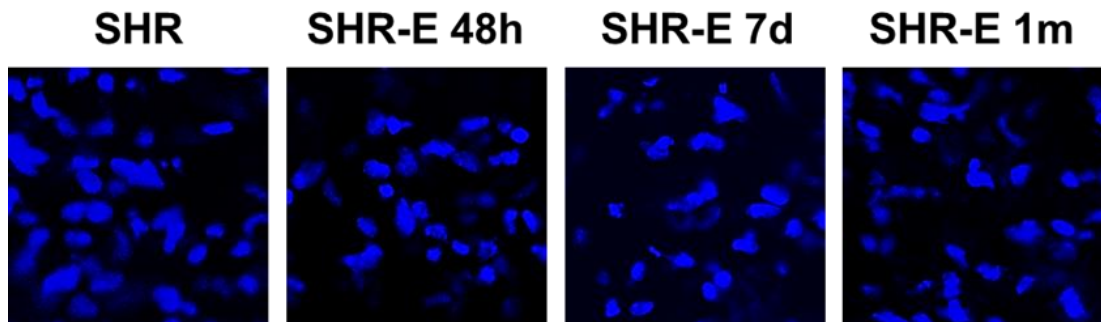


Figura 22: Imágenes de microscopía confocal representativas de las proyecciones de núcleos de células de la capa adventicia, en corte longitudinal de la arteria coronaria descendente anterior de los grupos SHR, SHR-E 48h, SHR-E 7d y SHR-E 1m. Los núcleos se visualizaron gracias a la tinción con DAPI (azul), con un objetivo 20x y zoom de 8. Nótese la disminución del número de núcleos (y, por tanto, de células) en la capa adventicia de las SHR tratadas con esmolol con respecto a las SHR control, únicamente a las 48h de la finalización del tratamiento, sin mantenerse dicha diferencia a la semana y al mes.

Por último, estudiando la **densidad celular de la capa adventicia**, encontramos una disminución estadísticamente significativa tras 48h de tratamiento con esmolol con respecto a su grupo control. Estas diferencias no permanecieron a los 7 días y al mes (Fig.23).

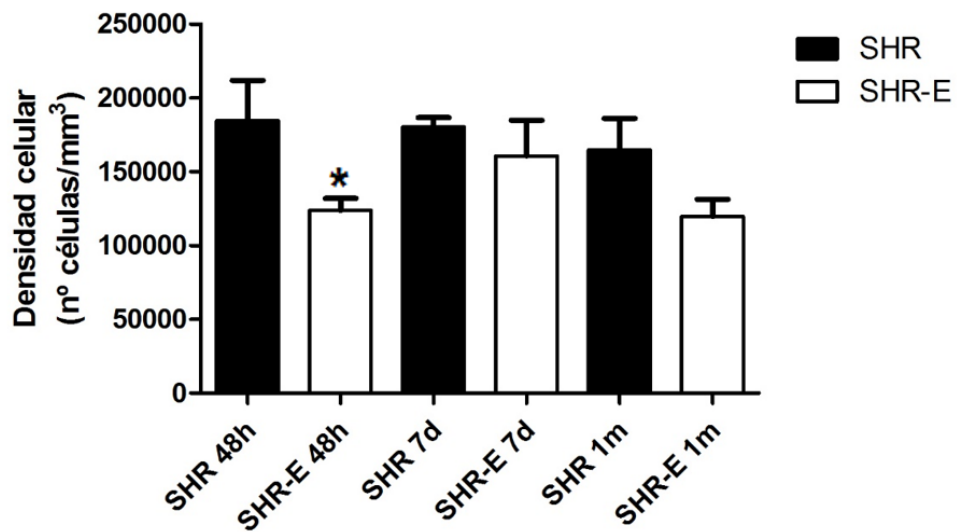


Figura 23: Valores de la densidad celular de la capa adventicia de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. \*  $p < 0.05$  vs. SHR.

### **4.3. EFECTO DEL ESMOLOL SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR DE LA ARTERIA CORONARIA Y SU PERMANENCIA EN EL TIEMPO**

El estudio del efecto que produce el esmolol tras 48h de tratamiento y de la permanencia de los cambios a nivel funcional en las arterias coronarias de ratas SHR, tanto en lo que respecta a su capacidad vasodilatadora como vasoconstrictora, se llevó a cabo utilizando el miógrafo de alambre, siguiendo los protocolos desarrollados en el apartado de *Material y Métodos*.

#### **4.3.1. Efecto del esmolol tras 48h del tratamiento**

Segmentos de la arteria coronaria descendente anterior de la rata SHR se utilizaron para analizar el efecto que produce el esmolol sobre la reactividad vascular, tras 48h de tratamiento.

- **Función vasodilatadora**

Para analizar el efecto sobre la función vasodilatadora endotelio-dependiente y endotelio-independiente inducida por la acetilcolina (ACh) o el nitroprusiato (NPS) respectivamente, se utilizaron segmentos de la arteria coronaria previamente contraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT  $3 \times 10^{-7}$  mol/L).

Los segmentos arteriales de las ratas SHR-E, mostraron una mejoría en la función vasodilatadora tras el tratamiento con esmolol durante 48h, que fue

dosisdependiente, en respuesta a concentraciones crecientes de Ach ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  mol/L) (Fig.24.A).

La diferencia observada con respecto a la rata SHR que recibió placebo, fue estadísticamente significativa en todas las dosis de Ach estudiadas.

El área bajo la curva (AUC) vasodilatación-respuesta mediada por la Ach, fue significativamente mayor en el grupo SHR-E 48h que en el grupo SHR 48h ( $209.6 \pm 25.9$  vs.  $74.15 \pm 8.67$ ;  $p=0.0001$ ) (Fig.24.B).

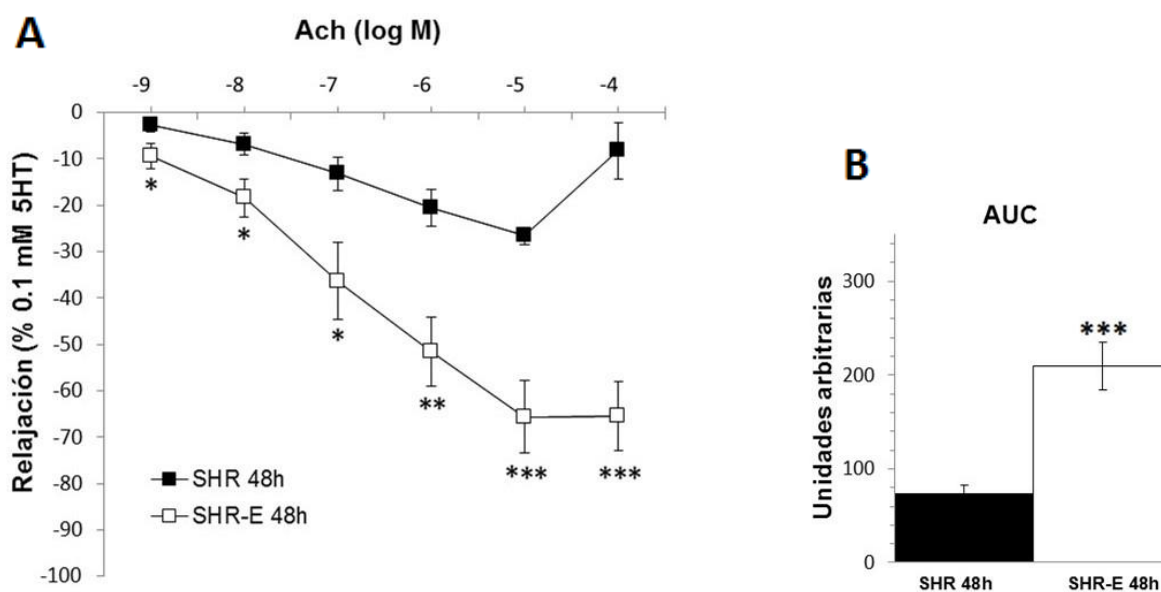


Figura 24: **A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente (inducida por concentraciones crecientes de Ach), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR y SHR tratadas con esmolol (SHR-E), analizadas al finalizar el tratamiento (48h). La respuesta vasodilatadora se expresó como porcentaje de relajación de los segmentos arteriales precontraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT,  $3 \times 10^{-7}$  mol/L). **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de Ach en SHR 48h y SHR-E 48h. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM,  $n = 9$  por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. SHR.

A continuación, se estudió el efecto sobre la respuesta vasodilatadora endotelio-independiente, mediada por concentraciones crecientes de NPS ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  mol/L) bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente.

En este caso, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta vasodilatadora endotelio-independiente entre las SHR tratadas con placebo y las SHR-E analizadas a las 48h, ni en las diferentes dosis medidas ni en el análisis de AUC (AUC SHR 48h =  $271.93 \pm 25.53$ ; AUC SHR-E 48h =  $279.6 \pm 31.2$ ). La máxima respuesta vasodilatadora inducida por NPS fue:  $91.02 \pm 2.37$  % en SHR 48h y  $96 \pm 1.1$  % en SHR-E 48h (Fig.25.A y Fig.25.B).

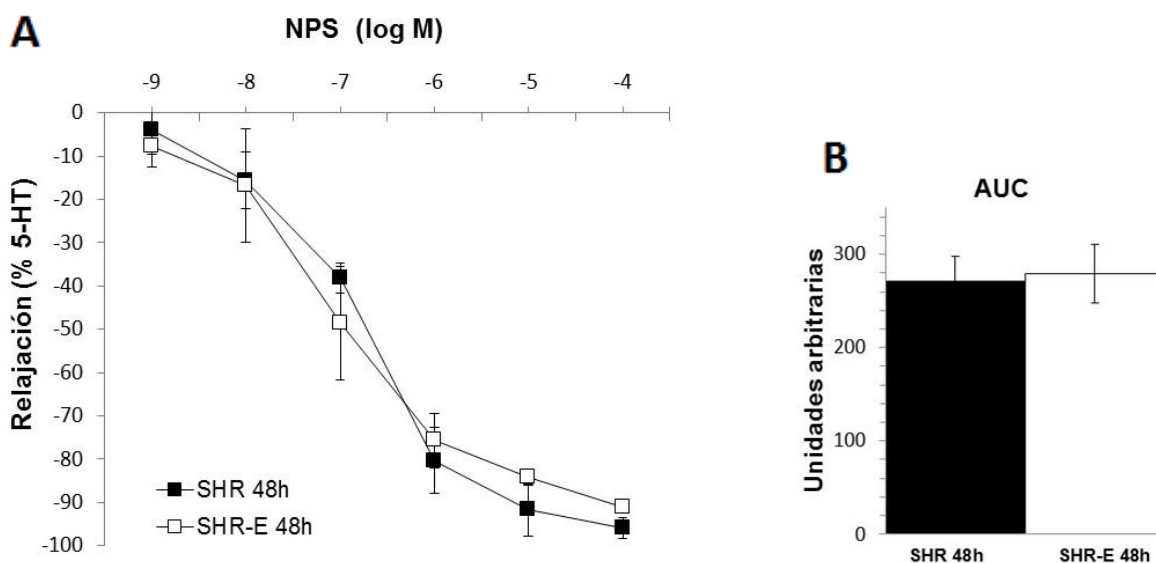


Figura 25: **A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-independiente (inducida por concentraciones crecientes de NPS), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR y SHR tratadas con esmolol (SHR-E), analizadas al finalizar el tratamiento (48h). La respuesta vasodilatadora se expresó como porcentaje de relajación de los segmentos arteriales precontraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT,  $3 \times 10^{-7}$  mol/L). **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de NPS en SHR 48h y SHR-E 48h. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo.

- **Función vasoconstrictora**

Para analizar la respuesta vasoconstrictora tras haber finalizado el tratamiento con esmolol (48h), se estudió de nuevo la arteria coronaria, induciendo vasoconstricción con concentraciones crecientes de 5-HT ( $10^{-7}$ -  $3 \times 10^{-5}$  mol/L). Se pudo observar como, las ratas SHR-E 48h, presentaban una menor respuesta vasoconstrictora al compararlas con las SHR 48h que no fueron tratadas con el fármaco (Fig.26.A).

El AUC, reflejo de la capacidad vasoconstrictora de 5-HT, fue significativamente menor en las SHR-E 48h ( $28.1 \pm 2.4$ ) que en las SHR 48h ( $243.3 \pm 19.66$ ;  $p = 0.00003$ ) (Fig.26.B).

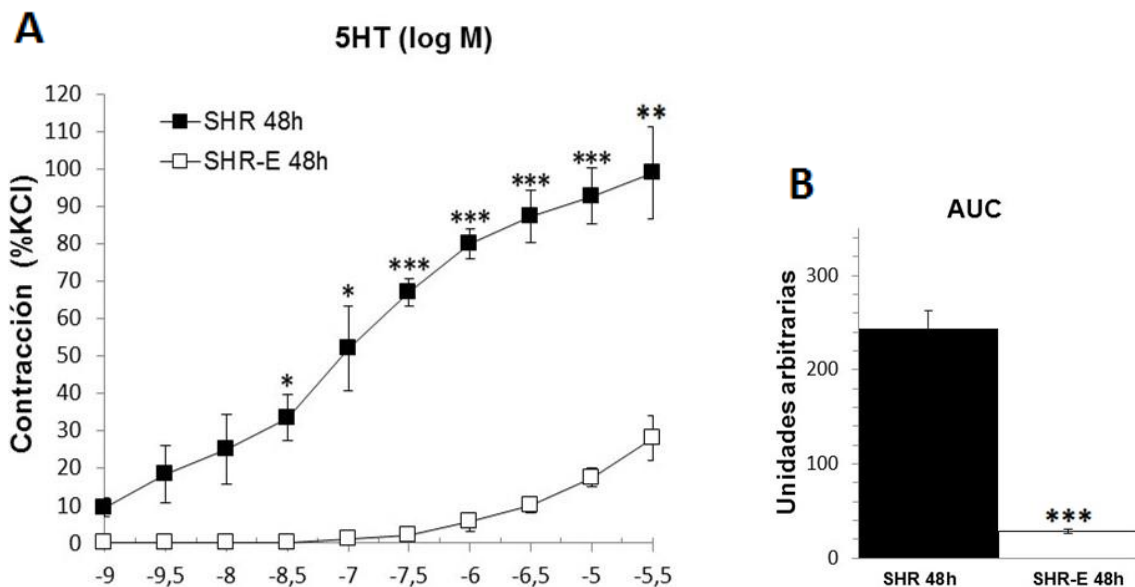


Figura 26: **A**: Respuesta vasoconstrictora inducida por 5-hidroxitriptamina (5-HT) en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR y SHR tratadas con esmolol (SHR-E), analizadas tras finalizar el tratamiento (48h). Se utilizaron concentraciones crecientes de 5-HT (rango de  $10^{-9}$ -  $3 \times 10^{-5}$  mol/L); 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<sup>+</sup>-KHS. Los valores representan media  $\pm$  SEM de 9 ratas por grupo. \*p < 0,05 , \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 vs. SHR. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de 5-HT en SHR 48h y SHR-E 48h. \*\*\*p<0.001 vs. SHR.

#### 4.3.2. Permanencia del efecto tras 1 semana

Se utilizaron los segmentos de arteria coronaria descendente anterior de rata SHR para analizar la permanencia del efecto del esmolol en la reactividad vascular, una semana después de haber finalizado el tratamiento.

- **Función vasodilatadora**

Para analizar la permanencia tras una semana de la función vasodilatadora endotelio-dependiente y endotelio-independiente inducida por la acetilcolina (Ach) o el nitroprusiato (NPS) respectivamente, se utilizaron segmentos de la arteria coronaria previamente contraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT  $3 \times 10^{-7}$  mol/L).

Los segmentos arteriales de las ratas SHR-E, mostraron una permanencia de la función vasodilatadora a los siete días de haber finalizado el tratamiento con esmolol, que fue dosidependiente, en respuesta a concentraciones crecientes de Ach ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  mol/L) (Fig.27.A). Estas diferencias comparadas con ratas SHR tratadas con placebo, fueron estadísticamente significativas a todas las dosis de Ach medidas.

El área bajo la curva (AUC) vasodilatación-respuesta mediada por la Ach, fue significativamente mayor en las SHR-E 7d que en las SHR 7d sin tratar ( $185.16 \pm 27.65$  vs.  $102.07 \pm 18.45$ ;  $p=0.017$ ) (Fig.27.B).

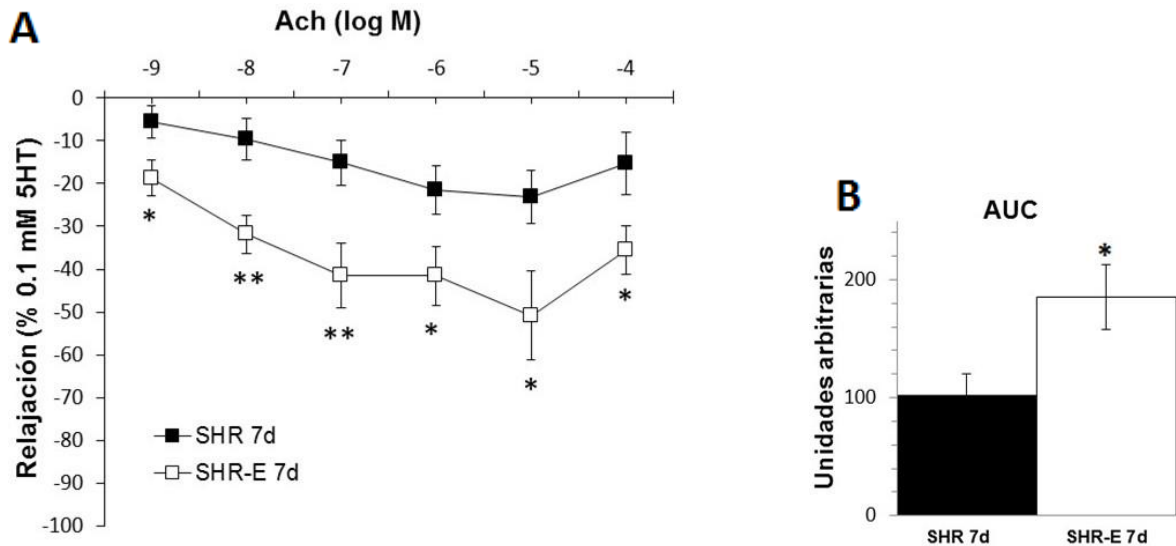


Figura 27: **A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente (inducida por concentraciones crecientes de Ach), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR y SHR tratadas con esmolol (SHR-E), analizadas a los siete días de finalizar el tratamiento. La respuesta vasodilatadora se expresó como porcentaje de relajación de los segmentos arteriales precontraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT,  $3 \times 10^{-7}$  mol/L). **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de Ach en SHR 7d y SHR-E 7d. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM,  $n = 9$  por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. SHR.

A continuación, se estudió la permanencia a los siete días de la respuesta vasodilatadora endotelio-independiente, mediada por concentraciones crecientes de NPS ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  mol/L) bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente.

En este caso, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta vasodilatadora endotelio-independiente entre las SHR tratadas con placebo y las SHR-E analizadas a los 7 días de finalizar el tratamiento, ni en las diferentes dosis medidas ni en el análisis de AUC (AUC SHR 7d =  $299.94 \pm 17.19$ ; AUC SHR-E 7d =  $317.83 \pm 13.03$ ). La máxima respuesta vasodilatadora inducida por NPS fue:  $93.04 \pm 1.42$  % en SHR 7d y  $95.03 \pm 2.55$  % en SHR-E 7d (Fig.28.A y Fig.28.B).

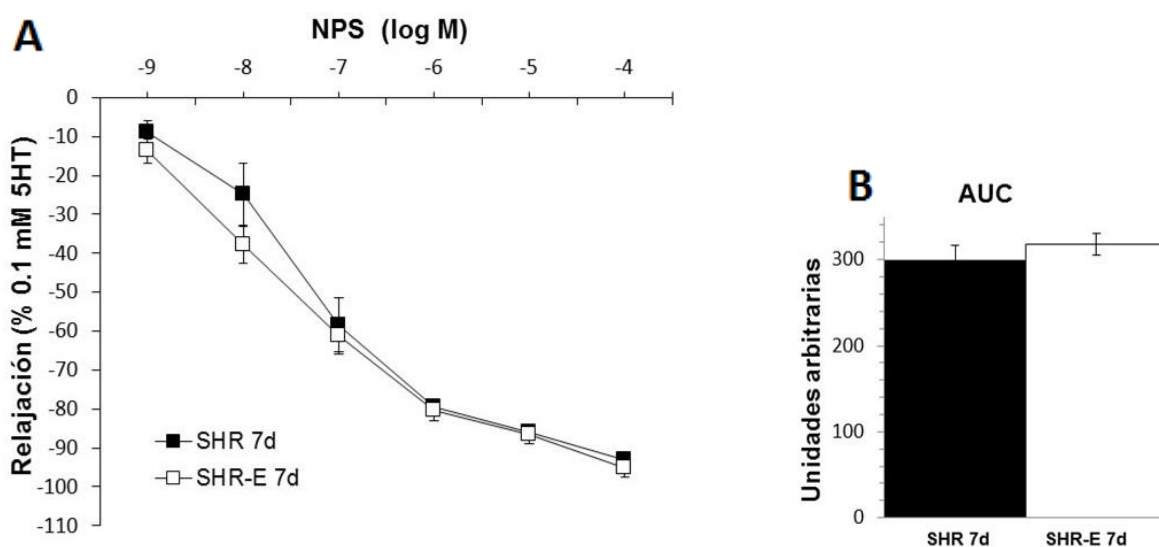


Figura 28: **A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-independiente (inducida por concentraciones crecientes de NPS), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR y SHR tratadas con esmolol (SHR-E), analizadas a los siete días de finalizar el tratamiento. La respuesta vasodilatadora se expresó como porcentaje de relajación de los segmentos arteriales precontraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT,  $3 \times 10^{-7}$  mol/L). **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de NPS en SHR 7d y SHR-E 7d. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo.

- **Función vasoconstrictora**

Para analizar la recuperación o no de la respuesta vasoconstrictora a la semana de haber finalizado el tratamiento con esmolol, se estudió de nuevo la

arteria coronaria, induciendo vasoconstricción con concentraciones crecientes de 5-HT ( $10^{-7}$ -  $3 \times 10^{-5}$  mol/L). Se pudo observar como, las ratas SHR-E 7d, aún conservaban una menor respuesta vasoconstrictora al compararlas con las SHR 7d (Fig.29.A).

El AUC, reflejo de la capacidad vasoconstrictora de 5-HT, fue significativamente menor en las SHR-E 7d ( $74.33 \pm 8.68$ ) que en las SHR 7d ( $133.13 \pm 16.07$ ;  $p = 0.005$ ) (Fig.29.B).

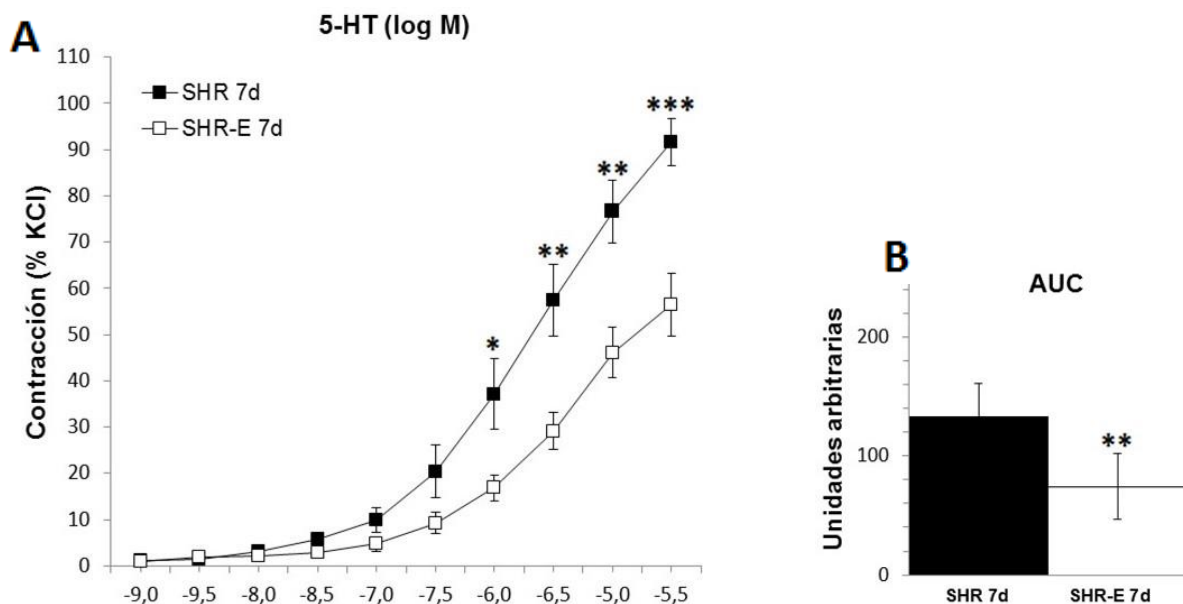


Figura 29: **A:** Respuesta vasoconstrictora inducida por 5-hidroxitriptamina (5-HT) en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR y SHR tratadas con esmolol (SHR-E), analizadas a los siete días de finalizar el tratamiento. Se utilizaron concentraciones crecientes de 5-HT (rango de  $10^{-9}$ -  $3 \times 10^{-5}$  mol/L); 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 se muestran como media  $\pm$  SEM,  $n = 9$  por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. SHR. **B.** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de 5-HT en SHR 7d y SHR-E 7d. \*\* $p < 0.01$  vs. SHR.

### 4.3.3. Permanencia del efecto tras 1 mes

Se utilizaron de nuevo los segmentos de arteria coronaria descendente anterior de rata SHR para analizar la permanencia del efecto del esmolol en la reactividad vascular, una mes después de haber finalizado el tratamiento.

- **Función vasodilatadora**

Para analizar la permanencia tras una mes de la función vasodilatadora endotelio-dependiente y endotelio-independiente inducida por la acetilcolina (Ach) o el nitroprusiato (NPS) respectivamente, se utilizaron segmentos de la arteria coronaria previamente contraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT).

Los segmentos arteriales de las ratas SHR-E, mostraron una permanencia de la función vasodilatadora al mes de haber finalizado el tratamiento con esmolol, pero solo en las concentraciones de Ach mayores, aquellas comprendidas entre  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  mol/L. Además, los animales tratados con esmolol, no presentaban el efecto vasoconstrictor inducido por concentraciones altas de Ach ( $10^{-4}$  mol/L) (Fig.30.A).

El área bajo la curva (AUC) vasodilatación-respuesta mediada por la Ach, fue significativamente mayor en las SHR-E 1m que en las SHR 1m sin tratar, incluso habiendo transcurrido 1 mes tras haber finalizado el tratamiento ( $136.33 \pm 20.84$  vs.  $83.29 \pm 11.87$ ;  $p= 0.05$ ) (Fig.30.B).

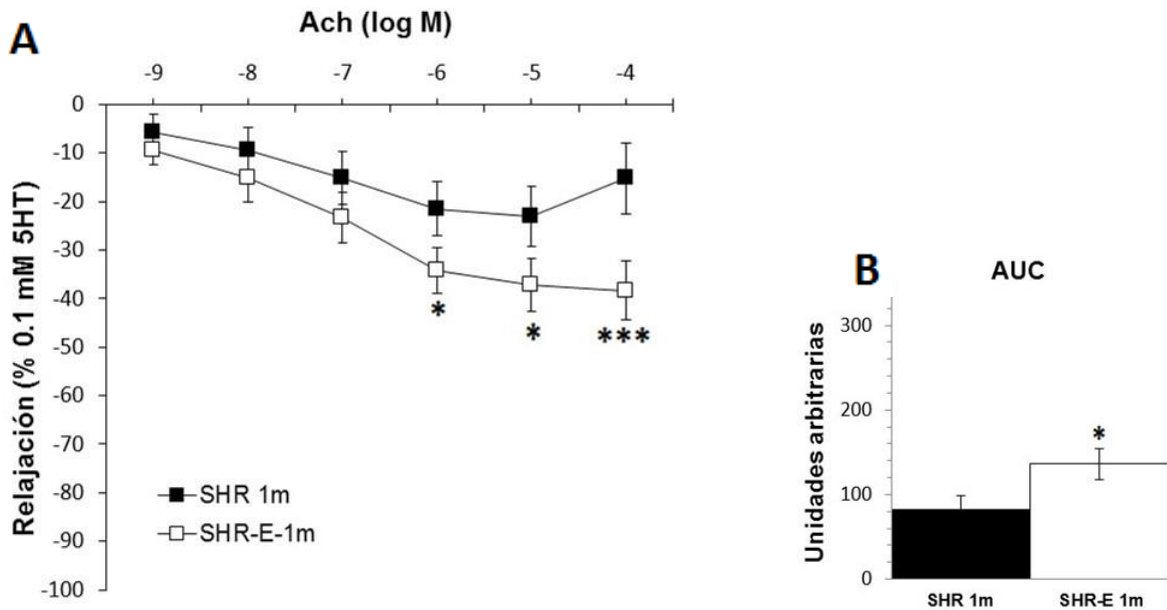


Figura 30: **A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente (inducida por concentraciones crecientes de Ach), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR y SHR tratadas con esmolol (SHR-E), analizadas al mes de finalizar el tratamiento. La respuesta vasodilatadora se expresó como porcentaje de relajación de los segmentos arteriales precontraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT,  $3 \times 10^{-7}$  mol/L). Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. SHR. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de Ach en SHR 1m y SHR-E 1m. \* $p < 0.05$  vs. SHR.

A continuación, se estudió la permanencia al mes de la respuesta vasodilatadora endotelio-independiente, mediada por concentraciones crecientes de NPS ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  mol/L) bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente.

Al igual que ocurría a los 7 días de haber finalizado el tratamiento, trascurrido un mes, tampoco se encontró diferencias estadísticamente significativas entre las

SHR 1m y las SHR-E 1m (AUC SHR 1m =  $295.34 \pm 24.12$  y AUC SHR-E 1m =  $293.31 \pm 11.85$ ) (Fig.31.B).

La respuesta máxima vasodilatadora inducida por NPS fue: en SHR 1m  $93.28 \pm 1.34$  % y en SHR-E 1m  $89.98 \pm 1.49$  % (Fig.31.A).

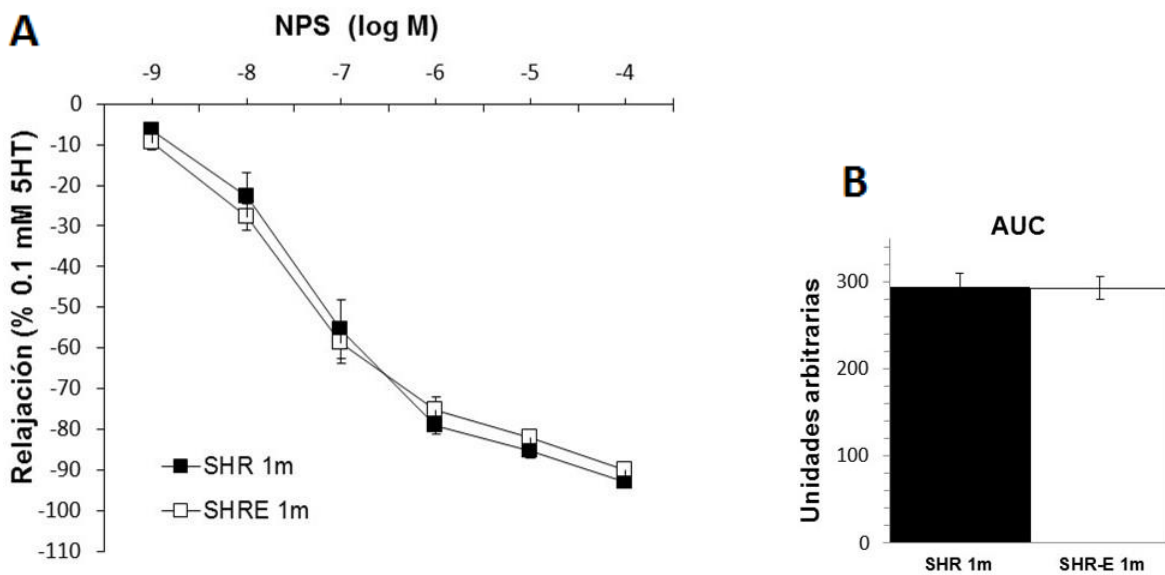


Figura 31: **A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-independiente (inducida por concentraciones crecientes de NPS), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR y SHR tratadas con esmolol (SHR-E), analizadas al mes de finalizar el tratamiento. La respuesta vasodilatadora se expresó como porcentaje de relajación de los segmentos arteriales precontraídos con 5-hidroxitriptamina (5-HT,  $3 \times 10^{-7}$  mol/L). **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de NPS en SHR 1m y SHR-E 1m. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo.

- **Función vasoconstrictora**

Para analizar la recuperación o no de la respuesta vasoconstrictora al mes de haber finalizado el tratamiento con esmolol, se estudió de nuevo la arteria coronaria,

induciendo vasoconstricción con concentraciones crecientes de 5-HT ( $10^{-7}$ -  $3 \times 10^{-5}$  mol/L). En este caso, la función vasoconstrictora de las SHR tratadas con esmolol, se igualaba a las de las SHR no tratadas, tras el transcurso de 1 mes desde la finalización del tratamiento.

Al analizar el AUC, se observaba que no existía diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio (Fig.32.A y Fig.32.B).

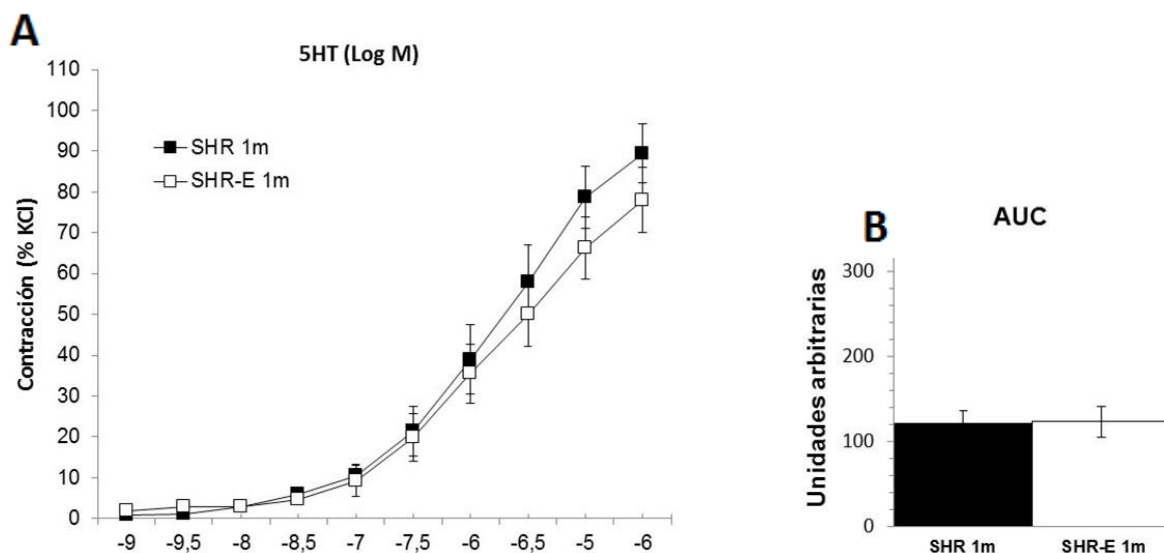


Figura 32: **A:** Respuesta vasoconstrictora inducida por 5-hidroxitriptamina (5-HT) en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR y SHR tratadas con esmolol (SHR-E), analizadas al mes de finalizar el tratamiento. Se utilizaron concentraciones crecientes de 5-HT (rango de  $10^{-9}$ -  $3 \times 10^{-5}$  mol/L); 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 se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 9 por grupo. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de 5-HT en SHR 1m y SHR-E 1m.

#### 4.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESMOLOL SOBRE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y SU PERMANENCIA EN EL TIEMPO

##### 4.4.1. Biomarcadores plasmáticos antioxidantes

- **Glutación reducido (GSH)**

El análisis del glutación reducido en el plasma mostró un aumento estadísticamente significativo en las ratas tratadas con esmolol con respecto a las que recibieron placebo, en los tres momentos del estudio (Fig.33).

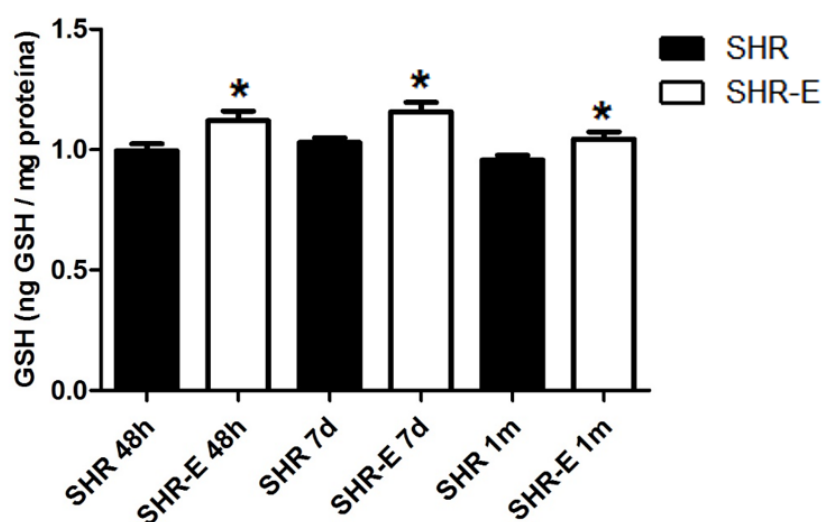


Figura 33: Niveles de glutación reducido (GSH) analizados en el plasma de SHR y SHR-E en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM, n =8 por grupo. \* p<0.05 vs. SHR.

- **Nitratos plasmáticos**

El análisis de los nitratos en plasma mostró un aumento estadísticamente significativo en los grupos tratados con esmolol con respecto a sus respectivos controles, en los tres momentos del estudio (Fig.34).

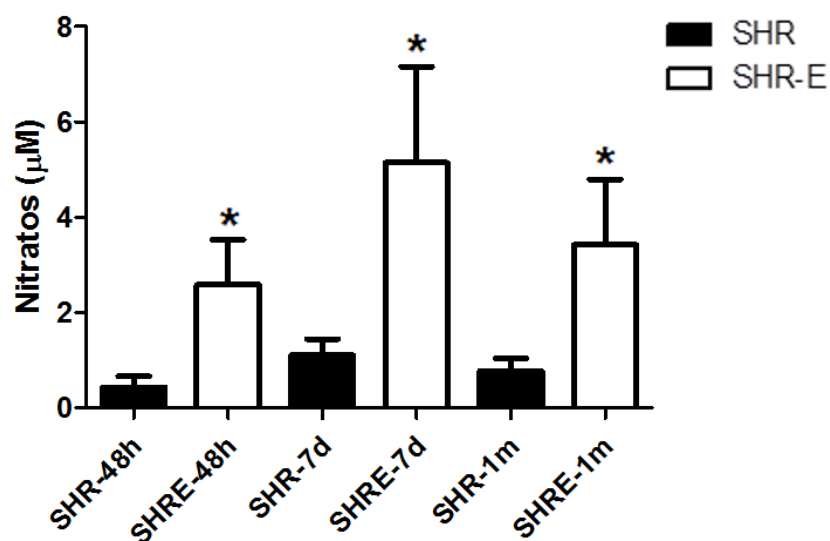


Figura 34: Niveles de nitratos plasmáticos analizados en el plasma de SHR y SHR-E en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 8 por grupo. \* p<0.05 vs. SHR.

#### 4.4.2. Biomarcadores plasmáticos de daño oxidativo

- **Peroxidación lipídica (MDA+HNE)**

En cuanto al daño oxidativo, al analizar la peroxidación lipídica, encontramos que los animales tratados con esmolol presentaban niveles menores de MDA+HNE con respecto a los que recibieron placebo, y dichas diferencias fueron estadísticamente significativas en los tres momentos de estudio (Fig.35).

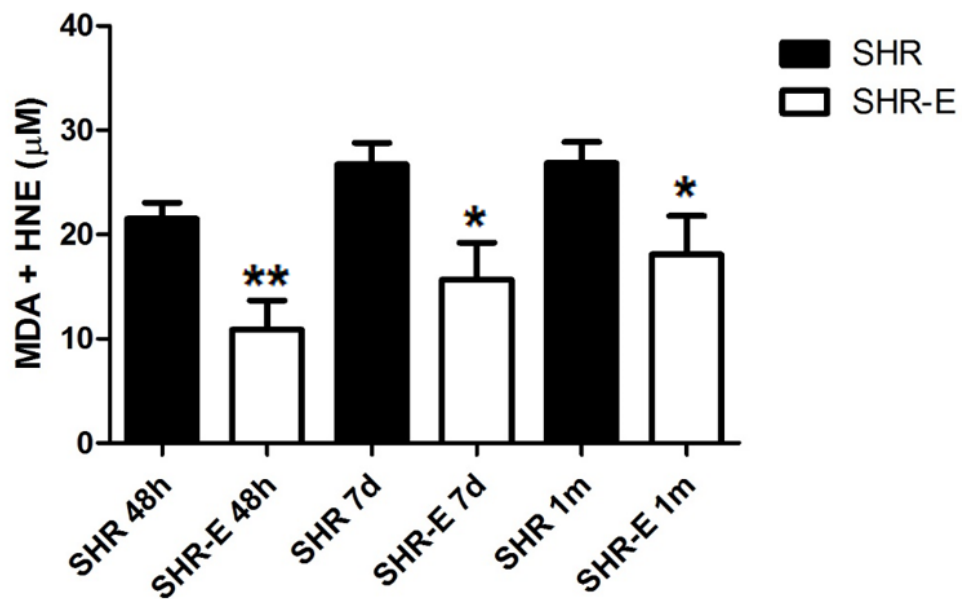


Figura 35: Niveles de malondialdehído + 4-hidroxinonenal (MDA+HNE) analizado en el plasma de las SHR y SHR-E en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 8 por grupo. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. SHR.

- **Proteínas carboniladas**

El biomarcador de daño oxidativo a proteínas, las proteínas carboniladas, mostró una disminución estadísticamente significativa entre los grupos tratados con esmolol con sus respectivos controles, en los tres momentos del estudio. Encontramos un aumento estadísticamente significativo de las proteínas carboniladas en el grupo SHR 1m con respecto a los grupos SHR 48h y SHR 7d. También encontramos un aumento estadísticamente significativo de este biomarcador en el grupo SHR-E 1m con respecto a los grupos SHR-E 48h y SHR-E 7d (Fig.36).

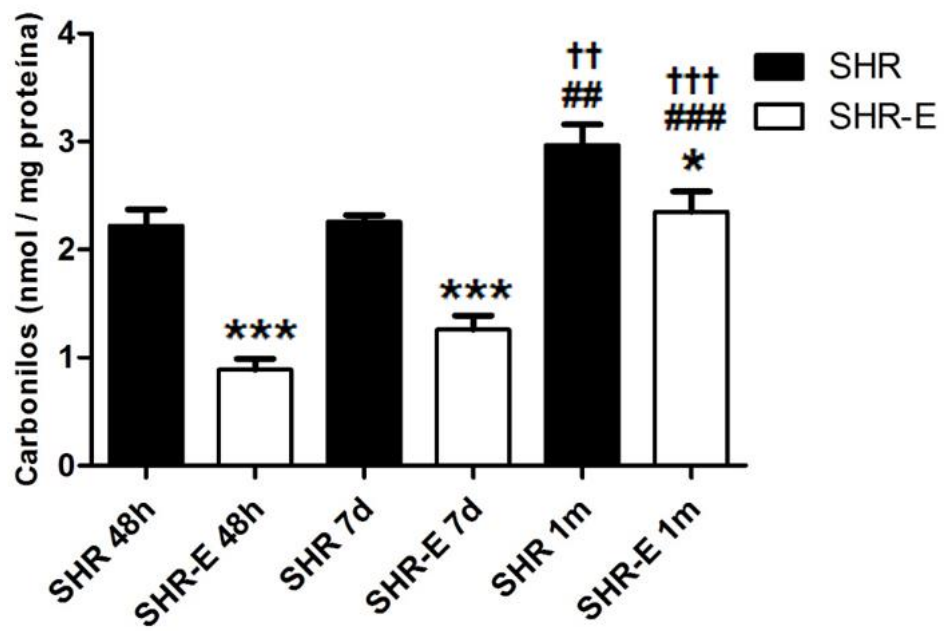


Figura 36: Niveles de carbonilos analizados en el plasma de las SHR y SHR-E en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, n = 8 por grupo. \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 vs. SHR; ## p<0.01, ###p<0.001 SHR 1m/SHR-E 1m vs. SHR 48h/SHR-E 48h; ††p<0.01, †††p<0.001 SHR 1m/SHR-E 1m vs. SHR 7d/SHR-E 7d.

## ***5. DISCUSIÓN***

El presente trabajo experimental corrobora algo que ya conocíamos por estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación: el tratamiento (durante 48 h) con el  $\beta$ -bloqueante cardiosselectivo de acción ultracorta esmolol, produce de manera precoz la regresión del remodelado arterial coronario secundario a la hipertensión arterial (1). Continuando con la línea de investigación, y respondiendo al objetivo planteado en el presente trabajo, hemos comprobado cómo dichos efectos permanecen a lo largo del tiempo, una vez finalizado el tratamiento.

El modelo experimental de remodelado coronario utilizado fue la rata espontáneamente hipertensa (SHR), aleatorizado en el grupo que recibió tratamiento con esmolol y el grupo que recibió placebo. Este modelo es el mismo que ha utilizado nuestro grupo de investigación en estudios previos, asegurando la continuidad y homogeneidad de la línea de investigación.

La SHR representa un modelo experimental bien establecido y utilizado por diversos grupos de investigación para el estudio de la hipertensión arterial primaria con hipertrofia cardíaca asociada. Cuando el animal alcanza los 14 meses de edad, presenta los cambios habituales de la hipertensión arterial crónica, entre los que se encuentran la hipertrofia compensada de ventrículo izquierdo (186) y las alteraciones tanto funcionales como estructurales de las arterias coronarias (187).

Nuestro grupo de investigación, en estudios previos, ha demostrado la regresión precoz de la HVI en las SHR (mediante estudio ecocardiográfico, histológico y metabólico utilizando la tomografía por emisión de positrones) tras

recibir un tratamiento con esmolol durante únicamente 48h (17), así como la regresión precoz del remodelado vascular de la arteria coronaria (estructural y funcional) (1). La siguiente pregunta que nos planteamos fue si dicho efecto podía mantenerse en el tiempo una vez finalizado el tratamiento, o si por el contrario solo se trataba de un efecto pasajero y limitado a corto plazo.

En esta misma línea, encontramos en la literatura algunos estudios realizados en modelos SHR con diversos fármacos antihipertensivos que analizan el mantenimiento en el tiempo de los efectos encontrados sobre el remodelado cardiovascular tras la finalización del tratamiento. Un estudio realizado con amlodipino demostró el mantenimiento de los efectos beneficiosos de dicho fármaco principalmente sobre la fibrosis vascular, transcurridos 3 meses tras la finalización del tratamiento (148). Posteriormente, otro estudio con un beta-bloqueante, el nebivolol, también consiguió demostrar que se mantenía el efecto sobre el remodelado vascular transcurridos 3 meses desde la suspensión del tratamiento (188). Sin embargo, y a diferencia de nuestro estudio con esmolol, en ambos casos, los animales recibieron tratamiento con el fármaco durante 6 meses.

Para responder a nuestro objetivo, realizamos varios experimentos encaminados a estudiar dicho mantenimiento en el tiempo, reproduciendo los experimentos previos para estudiar la estructura y función de las arterias coronarias, y ampliando el análisis de los datos a tres momentos del estudio: tras 48 horas de tratamiento, 7 días y 1 mes tras finalizar el tratamiento. De este modo, obtuvimos seis grupos de estudio: SHR tratadas con esmolol (SHR-E) y analizadas a las 48h, 7 días y 1 mes, y SHR que recibieron placebo y fueron analizadas del

mismo modo a las 48h, 7 días y 1 mes. De todos los grupos realizamos el estudio de la estructura de la arteria coronaria descendente anterior a través de microscopía confocal, la función de la arteria coronaria descendente anterior a través del miógrafo de alambre y los biomarcadores de estrés oxidativo en el plasma.

La literatura científica existente antes del inicio de nuestro estudio ya demostraba la eficacia de diversos fármacos antihipertensivos en la regresión del remodelado de las arterias coronarias (66, 189-193), sin embargo tras tratamientos crónicos. Nuestro grupo demostró que el clorhidrato de esmolol conseguía los mismos efectos beneficiosos sobre el remodelado coronario con un tratamiento de únicamente 48 horas (1). Esto podría tener gran relevancia, debido a la incidencia de eventos adversos de origen cardiovascular como el IAM que se asocian al remodelado vascular coronario secundario a la hipertensión arterial crónica. De este modo, con el esmolol podríamos reducir de manera importante el tiempo hasta conseguir la mejora en el remodelado, disminuyendo la morbimortalidad y costes sanitarios asociados a los eventos adversos.

Los resultados que hemos obtenido reflejan que el tratamiento con esmolol en perfusión continua intravenosa a 300 µg/Kg/min durante 48 horas, induce la regresión del remodelado coronario de las SHR macho adultas (de 14 meses de edad), y que dicho efecto se mantiene una vez finalizado el tratamiento (a los 7 días y al mes).

A continuación se discutirán los resultados más relevantes del presente estudio de manera más exhaustiva.

### **5.1. MANTENIMIENTO DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA ARTERIA CORONARIA INDUCIDOS POR ESMOLOL**

La hipertensión arterial se asocia al remodelado vascular y con ello, al aumento del riesgo de eventos adversos cardiovasculares (194). El tratamiento con esmolol ya ha demostrado mejorar el remodelado de las arterias coronarias produciendo una clara disminución de diversos parámetros estructurales (grosor de pared y área de sección del vaso, así como reducción en el grosor y número de células de la capa media) (1).

Los resultados de nuestro estudio corroboran la disminución de dichos parámetros estructurales en la geometría de arteria coronaria descendente anterior a las 48 horas del tratamiento (diámetro externo, grosor de pared y área de sección de corte del vaso), y revelan el mantenimiento de dichos cambios a la semana y al mes de finalizarlo. De igual modo, en la capa media se mantiene en el tiempo la disminución tanto del grosor como del número de células tras recibir tratamiento con esmolol. Sin embargo, la capa adventicia no muestra cambios relevantes que se mantengan en el tiempo tras la suspensión del tratamiento. Estos resultados podrían indicar la relevancia del efecto del esmolol sobre la capa media (disminución de células del músculo liso) en la regresión de la hipertrofia vascular coronaria.

En la literatura encontramos trabajos que muestran la existencia de estos cambios estructurales en el vaso coronario, sin embargo tras tratamientos crónicos: losartán (tratando SHR jóvenes durante 5 semanas) (189), perindopril (tratando SHR jóvenes durante 20 semanas y haciendo seguimiento de la PA una vez finalizado el tratamiento durante 12 semanas más) (190), amlodipino, enalapril (tratando SHR de 10 semanas de edad durante 3 meses) (66), indapamida (tratando tanto SHR durante 8 semanas como pacientes con HTA durante 6 meses con una combinación de perindopril con indapamida) (191) o carvedilol (tratando SHR que recibían una dieta rica en grasas y sal durante 18 semanas) (193). Sin embargo, son pocos los estudios que han analizado si estos cambios sobre el remodelado vascular se mantienen una vez finalizado el tratamiento.

El nebivolol, un beta-bloqueante cardioselectivo utilizado en el tratamiento de pacientes con hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca leve o moderada en combinación con otros tratamientos, ha demostrado tener un efecto beneficioso sobre el remodelado vascular en el modelo animal de las SHR. El grupo de Guerrero (188) trató durante 6 meses ratas SHR y estudió el mantenimiento de los efectos encontrados a los 3 meses de haber finalizado el tratamiento. Llegaron a la conclusión de que, tras la retirada del tratamiento, la PA aumentaba progresivamente, pero sin llegar a los niveles basales, al contrario que la FC, que se recuperaba inmediatamente tras el fin del tratamiento. En cuanto a los cambios a nivel vascular, a los 3 meses de haber retirado el nebivolol, se mantenía la mejora en la función vasodilatadora endotelio-dependiente mediada por acetilcolina, la disminución de la HVI, la fibrosis vascular y los cambios estructurales vasculares

que, aunque empeoraban levemente, no alcanzaban los niveles basales (antes del tratamiento).

A pesar de que los resultados son prometedores, es importante señalar que, los cambios que se producen aparecen tras tratamientos a largo plazo, en este caso 6 meses, mientras que el esmolol ha conseguido obtener dichos cambios con un tratamiento de únicamente 48 horas (1).

## **5.2. MANTENIMIENTO DE LOS CAMBIOS SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR CORONARIA INDUCIDOS POR ESMOLOL**

El proceso de remodelado vascular asociado a la hipertensión arterial no solo altera la estructura, sino también la funcionalidad del vaso, disminuyendo su capacidad de vasodilatación y aumentando la vasoconstricción en respuesta a diversos estímulos (119). Basándonos en esto, la eficacia de un fármaco antihipertensivo también se va a medir por su capacidad de restituir la funcionalidad del vaso perdida con el remodelado vascular.

Son varios los fármacos antihipertensivos que han demostrado mejorar la función de los vasos dañados por el remodelado vascular, tanto en estudios en modelos animales como en humanos. Sin embargo, al igual que la mejoría estructural, el efecto aparece con tratamientos crónicos: losartán en humanos (tratando pacientes durante un año con losartán o atenolol, encontrando mejoría funcional solo en el caso del losartán) (119), losartán en SHR (tratando SHR con

dos dosis de losartán durante 12 semanas) (192), enalapril (tratando durante 12 meses a pacientes hipertensos y diabéticos con enalapril o con candesartán, se observó mejoría de la función vascular en ambos grupos) (123), cilazapril o atenolol (tratando pacientes durante 1 año o 2, se observó mejoría de la función vascular solo en el caso del cilazapril) (116, 129), candesartán (tratando a 15 pacientes hipertensos durante un periodo de un año, analizando los datos a los 2 meses del tratamiento y a los 12 meses, se encontró mejoría de la función vascular solo tras 12 meses) (134), amlodipino, enalapril (tratando SHR de 10 semanas de edad durante 3 meses) (66).

Nuestro grupo de investigación demostró en estudios previos el efecto beneficioso del tratamiento con esmolol durante únicamente 48 horas sobre la reactividad vascular, mejorando la función vasodilatadora endotelio-dependiente (mediada por Ach), sin encontrar cambios en la función vasodilatadora endotelio-independiente (mediada por NPS) (1), hallazgos también observados en estudios con otros fármacos, tras tratamientos crónicos (119, 188). Por lo tanto, el mecanismo por el que el esmolol produce este efecto sobre la reactividad vascular parece estar relacionado con el aumento de la biodisponibilidad del NO (1). Posteriormente, comprobamos que el esmolol podía tener efecto sobre la vía de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor de la síntesis de NO y considerado factor de riesgo independiente en la mortalidad cardiovascular de pacientes con enfermedad coronaria (198). Encontramos que las SHR tratadas con esmolol presentaban niveles de ADMA menores que las que recibían placebo, tanto a nivel

coronario (131) como en la aorta torácica (130), lo que explicaba la mayor biodisponibilidad de NO y mejoría en la función vasomotora.

En el presente estudio, los resultados muestran que el esmolol es eficaz restaurando la funcionalidad perdida de las arterias coronarias de las SHR de forma precoz, y dicha restauración se mantiene a lo largo del tiempo, una vez finalizado el tratamiento.

El tratamiento durante únicamente 48h con esmolol mejoró la respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente (mediada por Ach) en las SHR, manteniéndose dicha mejoría tanto a la semana como al mes de haber finalizado el tratamiento. Sin embargo, la vasodilatación endotelio-independiente (mediada por NPS) no se vio modificada en ninguno de los momentos del estudio, en consonancia con los hallazgos encontrados en estudios previos de nuestro grupo (1) y de otros grupos de investigación (119, 188).

Paralelamente, hemos observado que la respuesta vasoconstrictora inducida por 5-HT se vio disminuida en las SHR tratadas con el beta-bloqueante, actividad que se mantuvo a la semana de la finalización del tratamiento pero no al mes. Esto podría guardar relación con los cambios estructurales como la reducción del grosor de pared y del número de células musculares de la capa media. De hecho, previamente ya se demostró que determinados cambios estructurales en la arteria coronaria descendente anterior de las SHR (aumento del grosor de pared y del

número de células musculares lisas) se asociaba a un aumento de la respuesta vasoconstrictora del vaso (195).

No hemos encontrado en la literatura estudios que muestren fármacos que produciendo mejora de la funcional vascular, demuestren la permanencia en el tiempo del efecto tras la suspensión del tratamiento.

### **5.3. MANTENIMIENTO DE LOS CAMBIOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDOS POR ESMOLOL**

El estrés oxidativo es un mecanismo de daño que aparece en diversos procesos patológicos, y surge como desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), y el sistema de defensa antioxidante del organismo (52). En condiciones fisiológicas, el organismo dispone de un sistema de defensa antioxidante que protege de los daños que producen ROS y RNS. Existen numerosos antioxidantes, tanto enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa o catalasa) como no enzimáticos (ácido ascórbico o vitamina C, alfa-tocoferol o vitamina E, glutatión reducido, carotenoides o flavonoides) (49).

El aumento en la producción de ROS a nivel vascular promueve el desarrollo de diversas enfermedades crónicas, entre ellas la hipertensión arterial. Esto es debido en gran parte al exceso de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y a la disminución de la biodisponibilidad de NO en vasos y riñones mediado

por ROS. En las personas que padecen HTA, los biomarcadores de estrés oxidativo están elevados, y el aumento de ROS provoca disfunción endotelial, remodelado vascular e inflamación, lo que deriva en daño vascular. ROS regula los receptores acoplados a proteína G (GPCR) en las células vasculares. En las células musculares lisas de los vasos, la activación de la señalización de GPCR mediada por ROS influye en la contracción, crecimiento, migración, depósito de colágeno y activación de matriz metaloproteinasas, los cuales son importantes en la regulación de la función endotelial (55). Por lo anteriormente dicho, podríamos decir que el estrés oxidativo se convierte en causa y consecuencia de la hipertensión (96).

Diversos grupos de fármacos antihipertensivos (beta-bloqueantes, IECAs, ARA II o dihidropiridina) ya han demostrado tener un efecto positivo sobre el estrés oxidativo en los pacientes hipertensos mediado por sus efectos pleiotrópicos antioxidantes (199). En un estudio Sáez y cols., demostraron que la reducción de las cifras tensionales se acompañaba de un descenso de los parámetros oxidativos y una recuperación de los niveles de diversos antioxidantes en 89 pacientes hipertensos bajo tres modalidades de tratamiento diferentes (no farmacológico, atenolol o bisoprolol y telmisartán) durante 3 meses, observando que dichas mejoras en el balance oxidativo aumentaban transcurridos 12 meses de tratamiento (200). Centrándonos en los beta-bloqueantes, un estudio con 57 pacientes hipertensos tratados durante 3 meses con carvedilol o nebivolol demostró que ambos fármacos tenían efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo, si bien en el carvedilol se podía relacionar el efecto beneficioso más con el incremento de la capacidad antioxidante y en el nebivolol con el incremento de NO (201).

Sin embargo, no solo encontramos en la literatura estudios realizados en pacientes, sino también en modelos animales. Schiffrin y Cols., estudiaron ratas Sprague-Dawley hipertensas por la infusión de aldosterona, a las que se les administró durante 6 semanas un antagonista del receptor de endotelina A (receptor localizado en el músculo liso y que produce un efecto vasoconstrictor presor y mitogénico), espironolactona o hidralazina como grupos controles, demostrando que en los dos primeros grupos se producía una disminución de los parámetros de estrés oxidativo (ácido tiobarbitúrico y la actividad de la NADPH) (62). Otro estudio realizado en ratas hiperinsulinémicas por dieta rica en fructosa tratadas con captopril durante 8 semanas, demostró que dicho tratamiento disminuía la PA, nivel de insulina en plasma, marcadores de estrés oxidativo como el peróxido de hidrógeno y el 8-isoprostano, y reducía la expresión del receptor de angiotensina-1, NADPH oxidasa-4 y moléculas de adhesión endotelial tipo 1 hasta igualarlos a niveles de ratas controles (72). En un estudio realizado en conejos hiperlipidémicos tratados con nebivolol durante 8 semanas, llegaron a la conclusión de que dicho fármaco prevenía el desacoplamiento de la NO sintasa III y prevenía la activación de la NADPH oxidasa en neutrófilos entre otros procesos (202).

Nuestro grupo de investigación estudió el efecto del esmolol sobre el estrés oxidativo en las ratas SHR (1), encontrando una mejoría en los marcadores antioxidantes con reducción de los oxidantes. En concreto, vimos cómo el tratamiento durante 48 horas con esmolol aumentaba los niveles de nitritos en plasma, la actividad catalasa y la actividad de la superóxido dismutasa (SOSA, acrónimo en inglés de "Superoxide Anion Scavenging Activity"). Sin embargo, la capacidad antioxidante total no aumentó, lo que podría estar relacionado con que

ese aumento de SOSA se produce, al menos en parte, a expensas del aumento de la actividad de la superóxido dismutasa y no a través de radicales libres-scavengers.

En el presente estudio, no solo buscábamos confirmar (con nuevos biomarcadores) dichos hallazgos a las 48 horas, sino también estudiar si dicho efecto se mantenía en el tiempo una vez finalizado el tratamiento.

Estudiando los biomarcadores antioxidantes plasmáticos, encontramos un aumento significativo del glutatión reducido y los nitratos tras el tratamiento con esmolol, que se mantenía a la semana y al mes de haber finalizado el tratamiento. Con respecto a los biomarcadores de daño oxidativo, comprobamos cómo la peroxidación lipídica medida con MDA + HNE y los carbonilos, disminuían tras el tratamiento con esmolol y dicho efecto se mantenía una vez finalizado el tratamiento. Estos resultados muestran que el esmolol es capaz de disminuir el estrés oxidativo asociado a la hipertensión arterial y al remodelado coronario. La capacidad antioxidante es uno de los mecanismos que parece subyacer en la eficacia de la terapia antihipertensiva en diversos fármacos (196). Sin embargo, el esmolol mantiene el aumento de los biomarcadores antioxidantes una vez finalizado el tratamiento, por lo que el estrés oxidativo podría estar implicado en el efecto positivo del esmolol sobre la regresión del remodelado coronario, y en su permanencia a los 7 y 30 días libres de tratamiento.

#### **5.4. DÓNDE ESTÁBAMOS Y A DÓNDE NOS DIRIGIMOS**

Con el presente trabajo hemos demostrado que existe una permanencia en el tiempo del efecto beneficioso que produce el esmolol sobre el remodelado de las arterias coronarias, en un modelo experimental de hipertensión arterial. Hemos utilizado como referencia la rata espontáneamente hipertensa, como en estudios previos en la misma línea de investigación desarrollados por nuestro grupo, tratándolas o no con esmolol, y analizándolas a las 48h del tratamiento, a los 7 días y al mes de haber finalizado el tratamiento. Lo que estudiamos fue: 1) la estructura del vaso coronario utilizando la microscopía confocal; 2) la función del vaso gracias al miógrafo de alambre; 3) los biomarcadores de estrés oxidativo implicados en dichos cambios estructurales y funcionales.

Siguiendo en la misma línea de investigación, y en base a los resultados del presente trabajo, nuestro grupo de investigación ha continuado diseñando nuevos experimentos encaminados a determinar si el esmolol produce también un efecto positivo mantenido en el tiempo sobre el remodelado del ventrículo izquierdo (HVI) (a través del estudio ecocardiográfico, histológico y metabólico mediante tomografía por emisión de positrones) y del remodelado de vasos de menor resistencia como la aorta torácica (a través de la histología y microscopía confocal, estudio de función y mecánica mediante baño de órganos). Por último, se están diseñando estudios encaminados a investigar posibles mecanismos implicados en este efecto del esmolol mantenido en el tiempo (detección de microRNAs).

## 5.5. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO

Tras analizar nuestro trabajo experimental, hemos detectado las siguientes limitaciones que deberán abordarse en futuros estudios:

1. La dosis de esmolol empleada en los animales del estudio ha sido calculada partiendo de la que se utiliza en la práctica clínica habitual en seres humanos (83). Desconocemos si existen diferencias farmacocinéticas y/o farmacodinámicas entre humanos y roedores, por lo que nuestros resultados no pueden ser totalmente extrapolables al hombre.
2. La disfunción endotelial que se observa en el modelo animal de las SHR difiere de unos animales a otros en función del sexo, la edad, el tipo de arteria y la metodología empleada en su estudio (197). De este modo, los resultados que hemos obtenido sólo pueden aplicarse a la arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR macho de 14 meses de edad con insuficiencia cardíaca compensada.
3. El presente trabajo muestra la permanencia en el tiempo de la reversión del remodelado vascular coronario que produce el esmolol. Sin embargo, no hemos estudiado si este efecto se mantiene también en otros vasos como la aorta, en arterias de resistencia o a nivel del remodelado cardíaco.
4. El fin último de este estudio sería lograr extrapolar este efecto que observamos en el modelo SHR a los pacientes tratados a diario con esmolol en los centros sanitarios, por lo que nuestro trabajo experimental deberá ser contrastado en futuras investigaciones realizando los pertinentes ensayos clínicos.

En contraposición a lo anteriormente mencionado, las fortalezas que posee nuestro estudio son:

1. Se trata de un trabajo experimental complejo, con una metodología validada y ya empleada por nuestro grupo de investigación en estudios previos, para detectar los cambios tanto estructurales como funcionales en las arterias coronarias tras el tratamiento con esmolol, esto garantiza la fiabilidad de los resultados.
2. Es el primer estudio que demuestra el mantenimiento a largo plazo de la regresión en el remodelado coronario tras utilizar un fármaco antihipertensivo durante únicamente 48 horas, sin precisar meses o años de tratamiento crónico.
3. Si los datos obtenidos en este estudio se reproducen en el humano mediante ensayos clínicos, el mantenimiento del efecto que produce el esmolol tras finalizar la administración del mismo lo convertiría en un fármaco muy interesante en la práctica clínica habitual en los pacientes con hipertensión arterial y remodelado vascular coronario, al disminuir los eventos cardiovasculares adversos y con ello la morbilidad.

## ***6. CONCLUSIONES***

Basándonos en los resultados obtenidos de este trabajo, y de la discusión de los mismos, podemos formular las siguientes conclusiones:

1. El esmolol produce regresión precoz del remodelado de la arteria coronaria que persiste más allá del periodo de tratamiento en la SHR, un modelo experimental de hipertensión arterial primaria y alteraciones estructurales y funcionales de las arterias coronarias.
2. Los cambios que se producen en la estructura de la arteria coronaria de la SHR tras el tratamiento con esmolol permanecen al mes de finalizar el tratamiento. Estos cambios incluyen la disminución del grosor de pared a expensas de la capa media, y la disminución del número de células de esta capa.
3. El esmolol es capaz de mejorar la función de la arteria coronaria en la rata hipertensa, manteniéndose el incremento de la capacidad vasodilatadora endotelio-dependiente, y la disminución de su respuesta contráctil más allá del periodo de tratamiento (al mes y a la semana respectivamente).
4. El tratamiento con esmolol disminuye el estrés oxidativo en la SHR como resultado del incremento del glutatión reducido y los nitratos plasmáticos, y la disminución de la peroxidación lipídica y las proteínas carboniladas, efecto que persiste al mes de finalizar el tratamiento.

## ***7. BIBLIOGRAFÍA***

1. Arnalich-Montiel A, González MC, Delgado-Baeza E, et al. Short-term esmolol improves coronary artery remodeling in spontaneously hypertensive rats through increased nitric oxide bioavailability and superoxide dismutase activity. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:531087.
2. Giles TD, Materson BJ, Cohn JN, et al. Definition and classification of hypertension: an update. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2009 Nov; 11(11):611-4.
3. Ortiz Marron H, Vaamonde Martin RJ, Zorrilla Torras B, et al. Prevalence, degree of control and treatment of hypertension in the adult population of Madrid, Spain. *Rev. Esp. Salud Pública.* 2011; 85(4):329-338.
4. Menéndez E, Delgado E, Fernández-Vega F, et al. Prevalencia, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial en España. Resultados del estudio Di@bet.es. *Rev Esp Cardiol.* 2016; 69(6):572-8.
5. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur. Heart J.* 2018; 39(33):3021-3104.
6. Lund-Johansen P. Haemodynamics in essential hypertension. *Clin Sci.* 1980; 59 Suppl 6:343s-54s.
7. Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, et al. Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. *Hypertension.* 1999; 34(4):724-8.
8. Mulvany MJ. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput.* 2008; 46:461-7.
9. Drazner MH. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation.* 2011; 123(3):327-34.

10. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Eng J Med.* 1990; 322(22):1561-6.

11. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J.* 2001; 141(3):334-41.

12. Larsen GC, Griffith JL, Beshansky JR, et al. 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. 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.

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

15. Verdecchia P, Carini G, Circo A, et al. Left ventricular mass and cardiovascular morbidity in essential hypertension: the MAVI study. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38(7):1829-35.

16. Colucci WS, Koliass TJ, Adams KF, 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(1):49-56.

17. Quintana-Villamandos B, Delgado-Martos MJ, Sanchez-Hernandez JJ, et al. Early regression of left ventricular hypertrophy after treatment with esmolol in an experimental rat model of primary hypertension. *Hypertens Res.* 2013; 36(5):408-13.

18. Marín R, Gorostidi M. Nefropatía vascular. Concepto y significado. Epidemiología. Hipertensión arterial esencial e insuficiencia renal. Nefrosclerosis. Nefropatía isquémica o aterosclerótica. NEFROLOGÍA. 2004; 24(S6):73-83.

19. Santamaría-Olmo R, Gorostidi-Pérez M. Presión arterial y progresión de la enfermedad renal crónica. NefroPlus. 2013; 5(1):4-11.

20. Sierra C. Complicaciones cerebrales en la hipertensión arterial. Hipertensión. 2003; 20(5):212-25.

21. Martell Claros N et al. Organic repercussions of the arterial hypertension: vessels, brain, heart and kidney. Hipertens Riesgo Vasc. 2007; 24:239-46.

22. CADIME. Antihipertensivos antagonistas de los receptores de la angiotensina II: puesta al día. Bol Ter ANDAL. 2000; 16(1):1-4.

23. Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. Hypertension. 1989; 13(6 Pt 2):968-72.

24. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. N Eng J Med. 1994; 330(20):1431-8.

25. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, et al. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. Hypertension. 1993; 21(4):391-7.

26. Bund SJ, Lee RMKW. Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. J Vasc Res. 2003; 40:547-57.

27. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. Hypertension. 2001; 38(3 Pt 2):581-7.

28. Schiffrin EL, Deng LY, Laroche P. Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. *Clin Invest Med.* 1993; 16(3):177-86.

29. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, et al. Vascular remodeling. *Hypertension.* 1996; 28(3):505-6.

30. Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, et al. Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J Vasc Res.* 2002; 39(1):12-20.

31. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M, et al. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension.* 1996; 28(5):785-90.

32. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, et al. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.* 2001; 103(9):1238-44.

33. Endemann DH, Pu Q, De Ciuceis C, et al. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. *Hypertension.* 2004; 43(2):399-404.

34. Pasterkamp G, Galis ZS, de Kleijn DP. Expansive arterial remodeling: location, location, location. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:650-7.

35. Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, et al. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2000; 45(3):729-35.

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

37. Hamet P, Richard L, Dam TV, et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*. 1995; 26(4):642-8.
38. Dickhout JG, Lee RM. Apoptosis in the muscular arteries from young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1999; 17(10):1413-9.
39. Rizzoni D, Rodella L, Porteri E, et al. Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2000; 18:885-91.
40. Bakker EN, Buus CL, Spaan JA, et al. Small artery remodeling depends on tissue-type transglutaminase. *Circ Res*. 2005; 96(1):119-26.
41. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007; 115(10):1285-95.
42. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(8):1983-92.
43. 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(6):611-22.
44. 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(1-2):123-35.
45. Van der Meer IM, de Maat MP, Kiliaan AJ, et al. The value of C-reactive protein in cardiovascular risk prediction: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med*. 2003; 163(11):1323-8.

46. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, et al. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(26):14483-8.
47. Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. *Adv Enzyme Regul*. 1985; 23:217-37.
48. Jones DP, Radi R. Redox pioneer: professor Helmut Sies. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 21(18):2459-68.
49. Rodrigo R, Libuy M, Feliú F, et al. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers*. 2013; 35(6):773-90.
50. Ghasemzadeh N, Patel RS, Eapen DJ, et al. Oxidative stress is associated with increased pulmonary artery systolic pressure in humans. *Hypertension*. 2014; 63(6):1270-5.
51. Carrizzo A, Puca A, Damato A, et al. Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension*. 2013; 62(2):359-66.
52. Pechánová O, Simko F. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. *Physiol Res*. 2007; 56(S2):S7-S16.
53. Nava E, Palmer RM, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet*. 1991; 338(8782-8783):1555-7.
54. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*. 1995; 26(5):1235-41.

55. Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, et al. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol.* 2015; 31(5):631-41.
56. Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 884:19-40.
57. Griending KK, Sorescu D, Lassègue B, et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 ; 20(10):2175-83.
58. Vecchione C, Fratta L, Rizzoni D, et al. Cardiovascular influences of alpha 1b-adrenergic receptor defect in mice. *Circulation.* 2002; 105(14):1700-7.
59. Larivière R, Day R, Schiffrin EL. Increased expression of endothelin-1 gene in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension.* 1993; 21(6 Pt 2):916-20.
60. Schiffrin EL, Deng LY, Sventek P, et al. Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension. *J Hypertens.* 1997; 15(1):57-63.
61. Li JS, Larivière 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(2):183-8.
62. Pu Q, Neves MF, Virdis A, et al. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension.* 2003; 42(1):49-55.

63. Stow LR, Gumz ML, Lynch IJ, et al. Aldosterone modulates steroid receptor binding to the endothelin-1 gene (edn1). *J Biol Chem.* 2009; 284(44):30087-96.
64. Bézie Y, Lamazière JM, Laurent S, et al. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 1998; 18(7):1027-34.
65. Intengan HD, Thibault G, Li JS, et al. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation.* 1999; 100(22):2267-75.
66. Sharifi AM, Li JS, Endemann D, et al. Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1998; 16(4):457-66.
67. Thybo NK, Mulvany MJ, Jastrup B, et al. Some pharmacological and elastic characteristics of isolated subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 1996; 14(8):993-8.
68. Schiffrin EL. Effects of aldosterone on the vasculature. *Hypertension.* 2006; 47(3):312-8.
69. 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(4):986-94.
70. Min LJ, Mogi M, Li JM, et al. Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005; 97(5):434-42.

71. Brown NJ. Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertension*. 2008; 51:161-167.

72. Nyby MD, Abedi K, Smutko V, et al. Vascular Angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res*. 2007; 30(5):451-7.

73. Park JB, Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens*. 2001; 19(5):921-30.

74. Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, et al. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation*. 2003; 108(18):2230-5.

75. De Ciuceis C, Porteri E, Rizzoni D, et al. Structural alterations of subcutaneous small-resistance arteries may predict major cardiovascular events in patients with hypertension. *Am J Hypertens*. 2007; 20(8):846-52.

76. Tamargo Menéndez J, Delpón Mosquera E. *Farmacología de los receptores beta-adrenérgicos*. Madrid: CardioTeca; 2013.

77. Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*. 1948; 153(3):586-600.

78. Cruz Pardos P, Fernández Riveira C, Garutti I. *Betabloqueantes: utilidad en cirugía no cardíaca*. *Anesthesiol Reanim* 2005; 52(10):617-26.

79. Gauthier C, Langin D, Balligand JL. Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*. 2000; 21(11):426-31.

80. López-Sendón J, Swedberg K, McMurray J, et al. Expert Consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *Rev Esp Cardiol*. 2005; 58(1):65-90.

81. Gorre F, Vandekerckhove H. Beta-blockers: focus on mechanism of action. Which beta-blocker, when and why? *Acta Cardiol.* 2010; 65(5):565-70.

82. Garnock-Jones KP. Esmolol: a review of its use in the short-term treatment of tachyarrhythmias and the short-term control of tachycardia and hypertension. *Drugs.* 2012; 72(1):109-32.

83. MINISTERIO DE SANIDAD, POLÍTICA SOCIAL E IGUALDAD. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. FICHA TECNICA BREVIBLOC 10 mg/ml SOLUCION PARA PERFUSION. Madrid: 2011. [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/72608/FichaTecnica\\_72608.html#5-propiedades-farmacol-gicas](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/72608/FichaTecnica_72608.html#5-propiedades-farmacol-gicas).

84. Greenspan AM, Spielman SR, Horowitz LN, et al. The electrophysiologic properties of esmolol, a short acting beta-blocker. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1988; 26(4):209-16.

85. Deegan R, Wood AJ. Beta-receptor antagonism does not fully explain esmolol-induced hypotension. *Clin Pharmacol Ther.* 1994; 56(2):223-8.

86. Jordan D, Shulman SM, Miller ED Jr. Esmolol hydrochloride, sodium nitroprusside, and isoflurane differ in their ability to alter peripheral sympathetic responses. *Anesth Analg.* 1993; 77(2):281-90.

87. Yu SK, Tait G, Karkouti K, et al. The safety of perioperative esmolol: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Anesth Analg.* 2011; 112(2):267-81.

88. Zangrillo A, Turi S, Crescenzi G, et al. Esmolol reduces perioperative ischemia in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled studies. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2009; 23(5):625-32.

89. Landoni G, Turi S, Biondi-Zoccai G, et al. Esmolol reduces perioperative ischemia in noncardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled studies. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2010; 24(2):219-29.
90. Jacquet-Lagrèze M, Allaouchiche B, Restagno D, et al. Gut and sublingual microvascular effect of esmolol during septic shock in a porcine model. *Crit Care.* 2015; 19(1):241.
91. Morelli A, Ertmer C, Westphal M, et al. Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2013; 310(16):1683-91.
92. Lee SJ, Lee JN. The effect of perioperative esmolol infusion on the postoperative nausea, vomiting and pain after laparoscopic appendectomy. *Korean J Anesthesiol.* 2010; 59(3):179-84.
93. Chia YY, Chan MH, Ko NH, et al. Role of beta-blockade in anaesthesia and postoperative pain management after hysterectomy. *Br J Anaesth.* 2004; 93(6):799-805.
94. Collard V, Mistracchi G, Taqi A, et al. Intraoperative esmolol infusion in the absence of opioids spares postoperative fentanyl in patients undergoing ambulatory laparoscopic cholecystectomy. *Anesth Analg.* 2007; 105(5):1255-62.
95. Eftekhari A, Rahman A, Schaevel LH, et al. Chronic cystamine treatment inhibits small artery remodelling in rats. *J Vasc Res.* 2007; 44(6):471-82.
96. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res.* 2011; 34(1):5-14.
97. Buus NH, Bottcher M, Jorgensen CG, et al. Myocardial perfusion during long-term angiotensin-converting enzyme inhibition or beta-blockade in patients with essential hypertension. *Hypertension.* 2004; 44(4):465-70.

98. Schiffrin EL. Circulatory therapeutics: use of antihypertensive agents and their effects on the vasculature. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(5):1018-29.
99. Stead S, Werstiuk ES, Lee RMKW, et al. Nifedipine induces apoptosis in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2000; 67(8):895-906.
100. 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(9):1108-16.
101. DeBlois D, Tea BS, Than VD, et al. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997; 29(1 Pt 2):340-9.
102. Hamet P, deBlois D, Dam TV, et al. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996; 74(7):850-61.
103. Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, et al. 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(5):1069-73.
104. Díez J, Panizo A, Hernandez M, et al. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension.* 1997; 29(3):776-80.
105. Van Bortel LM, Kool MJ, Boudier HA, et al. Effects of antihypertensive agents on local arterial distensibility and compliance. *Hypertension.* 1995; 26(3):531-4.

106. Benetos A, Gautier S, Lafleche A, et al. Blockade of angiotensin II type 1 receptors: effect on carotid and radial artery structure and function in hypertensive humans. *J Vasc Res.* 2000; 37(1):8-15.

107. Davies J, Gavin A, Band M, et al. Spironolactone reduces brachial pulse wave velocity and PIIINP levels in hypertensive diabetic patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 59(5):520-3.

108. Epstein M, Safar ME. Aldosterone and large artery vessels. *Hypertension.* 2006; 47(6):e24.

109. Savoia C, Touyz RM, Amiri F, et al. Selective mineralocorticoid receptor blocker eplerenone reduces resistance artery stiffness in hypertensive patients. *Hypertension.* 2008; 51(2):432-9.

110. Williams B, Lacy PS, Thom SM, et al. Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation.* 2006; 113(9):1213-25.

111. 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(3):605-15.

112. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002; 359(9311):1004-10.

113. Motz W, Strauer BE. Improvement of coronary flow reserve after long-term therapy with enalapril. *Hypertension.* 1996; 27(5):1031-8.

114. Schwartzkopff B, Brehm M, Mundhenke M, et al. Repair of coronary arterioles after treatment with perindopril in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2000; 36(2):220-5.
115. Rizzoni D, Palombo C, Porteri E, et al. Relationships between coronary flow vasodilator capacity and small artery remodelling in hypertensive patients. *J Hypertens*. 2003; 21(3):625-31.
116. Schiffrin EL, Deng LY, Larochelle P, et al. Effects of a beta-blocker or a converting enzyme inhibitor on resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension*. 1994; 23(1):83-91.
117. Schiffrin EL, Deng LY, Larochelle P, et al. 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(3):229-36.
118. Thybo NK, Stephens N, Cooper A, et al. Effect of antihypertensive treatment on small arteries of patients with previously untreated essential hypertension. *Hypertension*. 1995; 25(4 Pt 1):474-81.
119. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, et al. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000; 101(14):1653-9.
120. 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(1):71-8.
121. 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(10):1247-55.

122. 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(2 Pt 1):105-10.

123. Rizzoni D, Porteri E, De Ciuceis C, et al. Effect of treatment with candesartan or enalapril on subcutaneous small artery structure in hypertensive patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Hypertension.* 2005; 45(4):659-65.

124. Savoia C, Touyz RM, Endemann DH, et al. Angiotensin receptor blocker added to previous antihypertensive agents on arteries of diabetic hypertensive patients. *Hypertension.* 2006; 48(2):271-7.

125. Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N, et al. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2012; 59(2):291-9.

126. Brassard P, Amiri F, Thibault G, et al. Role of angiotensin type-1 and angiotensin type-2 receptors in the expression of vascular integrins in angiotensin II-infused rats. *Hypertension.* 2006; 47(1):122-7.

127. Creager MA, Roddy MA. Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. *Hypertension.* 1994; 24(4):499-505.

128. Kiowski W, Linder L, Nuesch R, et al. Effects of cilazapril on vascular structure and function in essential hypertension. *Hypertension.* 1996; 27(3 Pt 1):371-6.

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(4 Pt 2):699-703.

130. Quintana-Villamandos B, González MC, Delgado-Martos MJ, et al. Short-term sen attenuated remodeling of the thoracic aorta in hypertensive rats by decreasing concentrations of ADMA down-regulated by oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 2016; 791:502-9.

131. Quintana-Villamandos B, Arnalich-Montiel A, Arribas S, et al. Early Regression of Coronary Artery Remodeling with Esmolol and DDAH/ADMA Pathway in Hypertensive Rats. *Hypertens Res.* 2016; 39:692-700.

132. Malik RA, Schofield IJ, Izzard A, et al. Effects of angiotensin type-1 receptor antagonism on small artery function in patients with type 2 mellitus. *Hypertension.* 2005; 45(2):264-9.

133. Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens.* 2004; 17(12 Pt 1):1192-200.

134. Ghiadoni L, Virdis A, Magagna A, et al. Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension. *Hypertension.* 2000; 35(1 Pt 2):501-6.

135. Perros F, Ranchoux B, Izikki M, et al. Nebivolol for improving endothelial dysfunction, pulmonary vascular remodeling, and right heart function in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 65(7):668-80.

136. Schiffrin EL. Antioxidants in hypertension and cardiovascular disease. *Mol Interv.* 2010; 10(6):354-62.

137. Ardalan MR, Rafieian-Kopaei M. Antioxidant supplementation in hypertension. *J Renal Inj Prev.* 2014; 3(2):39-40.

138. Zhou N, Wang T, Song J, et al. Antihypertensive and vascular remodelling effects of the imperatorin derivative OW1 in renovascular hypertension rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014; 41(8):571-8.

139. Bohlen HG. Localization of vascular resistance changes during hypertension. *Hypertension*. 1986; 8(3):181-3.

140. Prasad A, Dunnill GS, Mortimer PS, et al. Capillary rarefaction in the forearm skin in essential hypertension. *J Hypertens*. 1995; 13(2):265-8.

141. Unger T, Mattfeldt T, Lamberty V, et al. Effect of early onset angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial capillaries. *Hypertension*. 1992; 20(4):478-82.

142. Greene AS. Life and death in the microcirculation: a role for angiotensin II. *Microcirculation*. 1998; 5(2-3):101-7.

143. Lévy 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(1):8-13.

144. Rizzoni D, Agabiti-Rosei E. Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. *Intern Emerg Med*. 2012; 7(3):205-12.

145. Rocha WA, Lunz W, Baldo MP, et al. Kinetics of cardiac and vascular remodeling by spontaneously hypertensive rats after discontinuation of long-term captopril treatment. *Braz J Med Biol Res*. 2010; 43(4):390-6.

146. Christensen KL, Jespersen LT, Mulvany MJ. Development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats after withdrawal of long-term treatment related to vascular structure. *J Hypertens*. 1989; 7(2):83-90.

147. Marque V, Grima M, Kieffer P, et al. Withdrawal reveals lack of effect of prolonged antihypertensive treatment on intrinsic aortic wall stiffness in senescent spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002; 29(10):898-904.

148. Sevilla MA, Voces F, Carrón R, et al. Amlodipine decreases fibrosis and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: persistent effects after withdrawal. *Life Sci*. 2004; 75(7):881-91.

149. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963; 27:282-93.

150. Kurtz TW, Morris RC, Jr. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1987; 10(1):127-31.

151. St Lezin E, Simonet L, Pravenec M, et al. Hypertensive strains and normotensive 'control' strains. How closely are they related? *Hypertension*. 1992; 19(5):419-24.

152. Johnson ML, Ely DL, Turner ME. Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1992; 19(5):425-7.

153. Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 1998; 39(1):89-105.

154. Dickhout JG, Lee RM. Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; 29(3):781-9.

155. Smith TL, Hutchins PM. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. *Hypertension*. 1979; 1(5):508-17.

156. Folkow B. Early structural changes in hypertension: pathophysiology and clinical consequences. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 22:S1-6.

157. Palatini P, Julius S. Association of tachycardia with morbidity and mortality: pathophysiological considerations. *J Hum Hypertens.* 1997; 11 Suppl 1:S19-27.

158. Iams SG, Wexler BC. Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol. *J Lab Clin Med.* 1979; 94(4):608-16.

159. Ganten U, Schröder G, Witt M, et al. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effects of anti-androgen treatment. *J Hypertens.* 1989; 7(9):721-6.

160. Nigro D, Fortes ZB, Scivoletto R, et al. Sex-related differences in the response of spontaneously hypertensive rats to angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Endothelium.* 1997; 5(1):63-71.

161. Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998; 31(1 Pt 2):435-9.

162. Chan V, Fenning A, Levick SP, et al. Cardiovascular changes during maturation and ageing in male and female spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011; 57(4):469-78.

163. Capasso JM, Remily RM, Smith RH, et al. Sex differences in myocardial contractility in the rat. *Basic Res Cardiol.* 1983; 78(2):156-71.

164. Wang SN, Wyeth RP, Kennedy RH. Effects of gender on the sensitivity of rat cardiac muscle to extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Eur J Pharmacol.* 1998; 361(1):73-7.

165. Tamura T, Said S, Gerdes AM. Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure. *Hypertension*. 1999; 33(2):676-80.
166. Kokubo M, Uemura A, Matsubara T, et al. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. *Hypertens Res*. 2005; 28(7):601-9.
167. Cingolani OH, Yang XP, Cavaasin MA, et al. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2003; 41(2):249-54.
168. Carvajal K, Moreno-Sanchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res*. 2003; 34(2):89-99.
169. Wambolt RB, Henning SL, English DR, et al. Glucose utilization and glycogen turnover are accelerated in hypertrophied rat hearts during severe low-flow ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31(3):493-502.
170. Christe ME, Rodgers RL. Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1994; 26(10):1371-5.
171. Reutter BW, Huesman RH, Brennan KM, et al. Longitudinal Evaluation of Fatty Acid Metabolism in Normal and Spontaneously Hypertensive Rat Hearts with Dynamic MicroSPECT Imaging. *Int J Mol Imaging*. 2011; 2011:893129.
172. Hajri T, Ibrahimi A, Coburn CT, 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(26):23661-6.

173. Purushothaman S, Renuka Nair R, Harikrishnan VS, et al. Temporal relation of cardiac hypertrophy, oxidative stress, and fatty acid metabolism in spontaneously hypertensive rat. *Mol Cell Biochem.* 2011; 351(1-2):59-64.

174. Conde MV, Marin J, Balfagon G. Superoxide anion and K<sup>+</sup> channels mediate electrical stimulation-induced relaxation in the rat basilar artery. *Eur J Pharmacol.* 1999; 372(2):179-86.

175. Conde MV, Gonzalez MC, Quintana-Villamandos B, 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(3):H1153-65.

176. Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46(8):965-88.

177. Hissin PJ, Hilf RA. Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Anal Biochem.* 1976; 74(1):214-26.

178. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 2001; 5(1):62-71.

179. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186:407-21.

180. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11(1):81-128.

181. Comporti M. Lipid peroxidation. Biopathological significance. *Mol Aspects Med.* 1993; 14(3):199-207.

182. Spickett CM. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-noneal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biol.* 2013; 1(1):145-52.
183. Feron VJ, Til HP, de Vrijer F, et al. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat Res.* 1991; 259(3-4):363-85.
184. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(12):1685-96.
185. Irazusta V, Moreno-Cermeño A, Ros J, et al. Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas. *Proteómica.* 2008; 2:51-8.
186. Brooks WW, Conrad CH, Robinson KG, et al. L-arginine fails to prevent ventricular remodeling and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 2009; 22(2):228-34.
187. Tanaka M, Fujiwara H, Onodera T, et al. Quantitative analysis of myocardial fibrosis in normals, hypertensive hearts, and hypertrophic cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1986; 55(6):575-81.
188. Guerrero EI, Ardanaz N, Sevilla MA, et al. Cardiovascular effects of nebivolol in spontaneously hypertensive rats persist after treatment withdrawal. *J Hypertens.* 2006; 24(1):151-8.
189. 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(3):327-35.
190. Thybo NK, Korsgaard N, Eriksen S, et al. Dose-dependent effects of perindopril on blood pressure and small-artery structure. *Hypertension.* 1994; 23(5):659-66.

191. Neglia D, Fommei E, Varela-Carver A, et al. Perindopril and indapamide reverse coronary microvascular remodelling and improve flow in arterial hypertension. *J Hypertens*. 2011; 29(2):364-72.

192. Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT1 angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997; 30(1):75-83.

193. Barone FC, Campbell WG Jr, Nelson AH, et al. Carvedilol prevents severe hypertensive cardiomyopathy and remodeling. *J Hypertens*. 1998; 16(6):871-84.

194. Xu Q, Chakravorty A, Bathgate RA, et al. Relaxin therapy reverses large artery remodeling and improves arterial compliance in senescent spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2010; 55(5):1260-6.

195. Husken BC, van der Wal AC, Teeling P, et al. Heterogeneity in morphological characteristics of coronary arteries and aortae in various models of hypertension. *Blood Press*. 1997; 6(4):242-9.

196. Takai S, Kirimura K, Jin D, et al. Significance of angiotensin II receptor blocker lipophilicities and their protective effect against vascular remodeling. *Hypertens Res*. 2005; 28(7):593-600.

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

198. Meinitzer A, Kielstein JT, Pilz S, et al. Symmetrical and Asymmetrical Dimethylarginine as Predictors for Mortality in Patients Referred for Coronary Angiography: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Clinical Chemistry*. 2011; 57(1):112-21.

199. Ahmad KA, Yuan Yuan D, Nawaz W, et al. Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension. *Free Radic Res.* 2017; 51(4):428-38.

200. Sáez GT, Tormos C, Giner V, et al. Factors related to the impact of antihypertensive treatment in antioxidant activities and oxidative stress by-products in human hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2004; 17(9):809-16.

201. Zepeda RJ, Castillo R, Rodrigo R, et al. Effect of Carvedilol and Nebivolol on Oxidative Stress-related Parameters and Endothelial Function in Patients with Essential Hypertension. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012; 111(5):309-16.

202. Mollnau H, Schulz E, Daiber A, et al. Nebivolol Prevents Vascular NOS III Uncoupling in Experimental Hyperlipidemia and Inhibits NADPH Oxidase Activity in Inflammatory Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(4):615-21.

# ***8. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS***

## ÍNDICE DE FIGURAS:

- **Fig.1.-** Corte transversal que muestra las capas de una arteria.
- **Fig.2.-** Funciones del óxido nítrico según lugar de síntesis.
- **Fig.3.-** Síntesis de NO.
- **Fig.4.-** Esquema que muestra el origen y función de la arginina-dimetil-asimétrica o ADMA.
- **Fig.5.-** Representación de la estructura terciaria del receptor  $\beta$ -adrenérgico.
- **Fig.6.-** Estructura química del esmolol.
- **Fig.7.-** Representación esquemática del principio de reacción de Griess.
- **Fig.8.-** Frecuencia cardíaca de los grupos SHR y SHR-E medida en cuatro momentos: basal, a las 48 horas, a los 7 días y al mes.
- **Fig.9.-** Presión arterial sistólica de los grupos SHR y SHR-E medida en cuatro momentos: basal, a las 48 horas, a los 7 días y al mes.
- **Fig.10.-** Valores del diámetro interno de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.11.-** Valores del diámetro externo de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.12.-** Valores del grosor de la pared de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.13.-** Valores de la relación entre el grosor de la pared y la luz de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por

microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.

- **Fig.14.-** Valores de la sección de corte de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.15.-** Valores del grosor de la capa media de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.16.-** Imágenes de microscopía confocal representativas del detalle de un corte transversal del anillo de la arteria coronaria descendente anterior de los grupos SHR, SHR-E 48h, SHR-E 7d y SHR-E 1m.
- **Fig.17.-** Valores del número de células de la capa media de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.18.-** Imágenes de microscopía confocal representativas de las proyecciones de núcleos de células musculares lisas de la capa media, en corte longitudinal de la arteria coronaria descendente anterior de los grupos SHR, SHR-E 48h, SHR-E 7d y SHR-E 1m.
- **Fig.19.-** Valores de la densidad celular de la capa media de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.

- **Fig.20.-** Valores del grosor de la capa adventicia de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.21.-** Valores del número de células de la capa adventicia de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.22.-** Imágenes de microscopía confocal representativas de las proyecciones de núcleos de células de la capa adventicia, en corte longitudinal de la arteria coronaria descendente anterior de los grupos SHR, SHR-E 48h, SHR-E 7d y SHR-E 1m.
- **Fig.23.-** Valores de la densidad celular de la capa adventicia de la arteria coronaria descendente anterior de SHR y SHR-E, medidos por microscopía confocal y analizados en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.24.- A.** Respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente (inducida por concentraciones crecientes de Ach), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR 48h y SHR-E 48h. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de Ach en SHR 48h y SHR-E 48h.
- **Fig.25.- A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-independiente (inducida por concentraciones crecientes de NPS), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR 48h y SHR-E 48h. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de NPS en SHR 48h y SHR-E 48h.
- **Fig.26.- A:** Respuesta vasoconstrictora inducida por 5-hidroxitriptamina (5-HT) en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR 48h y SHR-

E 48h. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de 5-HT en SHR 48h y SHR-E 48h.

- **Fig.27.- A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente (inducida por concentraciones crecientes de Ach), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR 7d y SHR-E 7d. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de Ach en SHR 7d y SHR-E 7d.
- **Fig.28.- A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-independiente (inducida por concentraciones crecientes de NPS), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR 7d y SHR-E 7d. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de NPS en SHR 7d y SHR-E 7d.
- **Fig.29.- A:** Respuesta vasoconstrictora inducida por 5-hidroxitriptamina (5-HT) en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR 7d y SHR-E 7d. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de 5-HT en SHR 7d y SHR-E 7d.
- **Fig.30.- A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente (inducida por concentraciones crecientes de Ach), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR 1m y SHR-E 1m. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de Ach en SHR 1m y SHR-E 1m.
- **Fig.31.- A:** Respuesta vasodilatadora endotelio-independiente (inducida por concentraciones crecientes de NPS), en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR 1m y SHR-E 1m. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de NPS en SHR 1m y SHR-E 1m.
- **Fig.32.- A:** Respuesta vasoconstrictora inducida por 5-hidroxitriptamina (5-HT) en arteria coronaria descendente anterior de ratas SHR 1m y SHR-

E 1m. **B:** Área bajo la curva (AUC) concentración-respuesta de 5-HT en SHR 1m y SHR-E 1m.

- **Fig.33.-** Niveles de glutatión reducido (GSH) analizados en el plasma de SHR y SHR-E en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.34.-** Niveles de nitratos plasmáticos analizados en el plasma de SHR y SHR-E en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.35.-** Niveles de malondialdehído + 4-hidroxinonenal (MDA+HNE) analizado en el plasma de las SHR y SHR-E en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.
- **Fig.36.-** Niveles de carbonilos analizados en el plasma de las SHR y SHR-E en los tres momentos del estudio: 48 horas, 7 días y 1 mes.

## ÍNDICE DE TABLAS:

- **Tabla 1.-** Efectos mediados a través de la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.
- **Tabla 2.-** Clasificación de los fármacos  $\beta$ -bloqueantes atendiendo a su selectividad por los distintos subtipos de receptores adrenérgicos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\alpha$ .
- **Tabla 3.-** Grupos experimentales y número de animales incluidos en cada grupo para el estudio hemodinámico, de la función y de la estructura del vaso.
- **Tabla 4.-** Grupos experimentales y número de animales incluidos en cada grupo para el estudio del estrés oxidativo.