

**VNiVERSiDAD DE SALAMANCA**

**FACVLTAD DE FARMACiA**

**DEPARTAMENTO DE FiSiOLOGíA Y FARMACOLOGíA**

**LABORATORiO DE FARMACOGNOSiA Y FARMACOLOGíA**

**EFFECTO DEL TRATAMiENTO CRÓNICO CON VNA MEZCLA DE**

**ÁCiDOS GRASOS OMEGA-3/6/9 SOBRE LA REACTiViDAD**

**VASCVLAR Y EL ESTRÉS OXiDATIVO EN RATAS**



**M<sup>a</sup> DEL CARMEN DE LA CALLE PEÑA**

**2008**

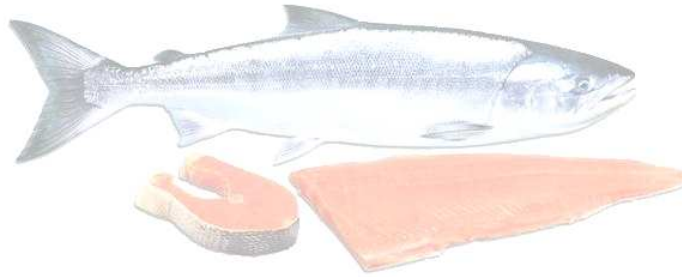


**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**

**LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y FARMACOLOGÍA**



**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON VNA  
MEZCLA DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3/6/9 SOBRE  
LA REACTIVIDAD VASCULAR Y EL ESTRÉS  
OXIDATIVO EN RATAS**



**M<sup>a</sup> DEL CARMEN DE LA CALLE PEÑA  
2008**

Memoria que presenta *M<sup>a</sup> del Carmen de la Calle Peña*  
para optar al Grado de Doctora en Farmacia

Salamanca, diciembre de 2008

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, positioned above the name of the author.

Fdo.: M<sup>a</sup> del Carmen de la Calle Peña



FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Fisiología y Farmacología  
Campus Miguel de Unamuno  
37007 Salamanca

Dña. Rosalía CARRÓN DE LA CALLE y Dña. M<sup>a</sup> José MONTERO GOMEZ  
Profesoras Titulares y Dña. M<sup>a</sup> Ángeles SEVILLA TORAL Profesora Contratada  
Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de  
Salamanca

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Efecto del tratamiento crónico con una mezcla de ácidos grasos omega 3/6/9 sobre la reactividad vascular y el estrés oxidativo en ratas”**, que para optar al grado de Doctora en Farmacia presenta **M<sup>a</sup> DEL CARMEN DE LA CALLE PEÑA**, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología (Departamento de Fisiología y Farmacología) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca y considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a 17 de diciembre de dos mil ocho.

Fdo.: Rosalía Carrón

Fdo.: M<sup>a</sup> José Montero

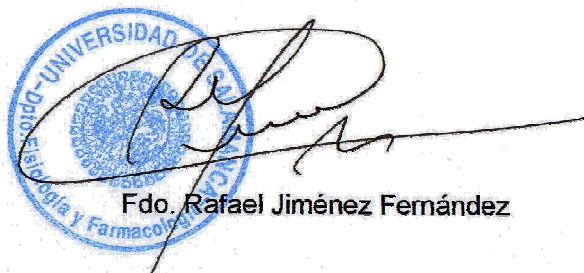
Fdo.: M<sup>a</sup> Ángeles Sevilla

D. RAFAEL JIMENEZ FERNÁNDEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Efecto del tratamiento crónico con una mezcla de ácidos grasos omega 3/6/9 sobre la reactividad vascular y el estrés oxidativo en ratas**”, que presenta Dña **Mª DEL CARMEN DE LA CALLE PEÑA**, para optar al grado de Doctora en Farmacia por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de las Dras. Dña. Rosalía Carrón de la Calle, Dña. Mª José Montero Gómez y Dña. Mª Ángeles Sevilla Toral, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca, a 17 de diciembre de dos mil ocho.



Fdo. Rafael Jiménez Fernández

Este trabajo ha sido financiado con las siguientes ayudas:

Contrato de I+D (Art. 83 L.O.U.).

“Estudios histológicos, metabólicos y funcionales en ratas tratadas con un complemento alimenticio cardiosaludable a base de ácidos grasos insaturados”.

Financiado por NOVA DIET, S.A.

PROYECTO SA24/04

“Efectos de una dieta rica en ácidos grasos omega 3-6-9 sobre la presión arterial, la hipertrofia cardiaca, la reactividad vascular y el estrés oxidativo”.

Financiado por la Junta de Castilla y León.

PROYECTO USAL2005-B1-01

“Efecto de la administración crónica de una mezcla de ácidos grasos omega-3-6-9 sobre los sistemas antioxidantes y las alteraciones en la función endotelial en ratas sometidas a un estado de estrés oxidativo por administración de *terc*-butilhidroperóxido”.

Financiado por la Universidad de Salamanca.

Beca del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y Fondo Social Europeo.

La realización de este trabajo nunca habría sido posible sin la colaboración de muchas personas, por ello quiero expresarles mi más sincero agradecimiento a todas ellas y muy especialmente:

A la Dra. Rosalía Carrón de la Calle por su inestimable apoyo, exquisita dirección y permanente disposición siempre que lo he necesitado. Así como a las profesoras Dra. M<sup>a</sup> José Montero Gómez y Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Sevilla Toral por su asesoramiento científico y su estímulo para seguir creciendo intelectualmente. Ellas tres mejor que nadie conocen el esfuerzo que supone realizar, no sólo esta memoria, sino toda la labor previa de incorporación y dirección de un nuevo miembro en el grupo de trabajo.

A mi compañera de fatigas Miriam que además de compañera es amiga, por su colaboración continua en el laboratorio y por su apoyo personal en los momentos más tensos. Sin ella todo habría sido mucho más duro y aburrido.

A José gran compañero de este equipo por su colaboración discreta pero invaluable.

A Modar que gracias a su forma de ser, sus conversaciones están siempre llenas de sorpresas.

Al Dr. Luis San Román, a la Dra. Asunción Morán, a la Dra. Maria Luisa Martín, a la Dra. Ana Vega Ortiz De Urbina y a Javier, gracias por hacerme sentir parte integrante del Departamento de Farmacología.

A las nuevas incorporaciones Beatriz y Wassim espero que su paso por el laboratorio sea tan grato como el mío.

A mi madre que gracias a su esfuerzo y tenacidad hoy soy quien soy, gracias por enseñarme cómo afrontar las dificultades con todo el ímpetu y la serenidad.

A Javier porque siempre estás a mi lado y me das el aliento para seguir sin desfallecer. Eres mi apoyo imprescindible, gracias.

A M<sup>a</sup> Ángeles Pérez de la Cruz, del departamento de Anatomía e Histología de la Facultad de Medicina de la USAL por su desinteresada colaboración en la interpretación de los cortes histológicos de hígado que se muestran en esta memoria.

A la empresa Nova Diet S.A. por la financiación de este trabajo y a la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León por la beca FPI que me ha permitido realizar esta tesis.

A todos ellos mi más sincero agradecimiento.



Quien no sabe  
apreciar los valores de la  
vida es porque no los  
merece

*Leonardo da Vinci*



## *ABREVIATURAS*

<b>AA:</b> ácido araquidónico	<b>GSSG:</b> glutatión oxidado
<b>ACh:</b> acetilcolina	<b>GST:</b> glutatión-S-transferasa
<b>AGE:</b> ácidos grasos esenciales	<b>HDL:</b> lipoproteína de alta densidad
<b>AGL:</b> ácido $\gamma$ -linoleico	<b>HDLc:</b> colesterol HDL
<b>AGMI:</b> ácidos grasos monoinsaturados	<b>HTA:</b> hipertensión arterial
<b>AGPI:</b> ácidos grasos poliinsaturados	<b>IMC:</b> índice de masa corporal
<b>AL:</b> ácido linoleico	<b>LDH:</b> lactato deshidrogenasa
<b>ALA:</b> ácido $\alpha$ -linolénico	<b>LDL:</b> lipoproteína de baja densidad
<b>ALT:</b> alanino aminotransferasa	<b>LDLc:</b> colesterol LDL
<b>AO:</b> ácido oleico	<b>LDLox:</b> LDL oxidada
<b>AST:</b> aspartato aminotransferasa	<b>L-NAME:</b> L-nitro arginina metil éster
<b>CAT:</b> catalasa	<b>LOX:</b> lipoxigenasa
<b>COX:</b> ciclooxigenasa	<b>LT:</b> leucotrienos
<b>CT:</b> colesterol total	<b>MDA:</b> malonildialdehído
<b>DHA:</b> ácido docosahexaenoico	<b>NADPH:</b> nicotinamida adenin-dinucleótido fosfato reducido
<b>ECV:</b> enfermedades cardiovasculares	<b>NO:</b> óxido nítrico
<b>EEM:</b> error estándar de la media	<b>NTP:</b> nitroprusiato sódico
<b>EPA:</b> ácido eicosapentaenoico	<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:</b> anión superóxido
<b>ERO:</b> especies reactivas de oxígeno	<b>OH<sup>-</sup>:</b> anión hidroxilo
<b>FE:</b> fenilefrina	<b>ONOO<sup>-</sup>:</b> peroxinitritos
<b>FRCV:</b> factores de riesgo cardiovascular	<b>PAS:</b> presión arterial sistólica
<b>G-Px:</b> glutatión peroxidasa	<b>PG:</b> prostaglandinas
<b>GR:</b> glutatión reductasa	<b>PGI<sub>2</sub>:</b> prostaciclina
<b>GSH:</b> glutatión reducido	<b>PPAR:</b> receptor $\alpha$ -activado por proliferadores de peroxisomas

**SHR:** ratas genéticamente hipertensas

**SOD:** superóxido dismutasa

**t-BHP:** *tert*-butilhidroperóxido

**TG:** triglicéridos

**TXA<sub>2</sub>:** tromboxano A<sub>2</sub>

**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad

**XO:** xantina oxidasa



*ÍNDICE*





**INTRODUCCIÓN**

1.- LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	3
2.- DISLIPIDEMIAS	7
3.- HIPERTENSIÓN ARTERIAL	14
4.- ATROSCLEROSIS	19
5.- INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	28
5.1.- Ácidos grasos insaturados	31

**OBJETIVOS**

43

**METODOLOGÍA**

1.- Diseño experimental	47
<i>ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS</i>	47
2.- Estudios <i>in vivo</i>	53
2.1- Control de presión arterial y frecuencia cardiaca	53
3.- Estudios <i>in vitro</i>	55
3.1.- Estudios de funcionalidad - Arteria aorta	55
3.2.- Estudios de funcionalidad - Lecho vascular mesentérico	59
3.3.- Estudios de funcionalidad - Riñón profundido	61
3.4.- Sustancias utilizadas	62
3.5.- Expresión de los resultados	62
4.- Estudios morfométricos	63
4.1.- Hipertrofia cardiaca y renal	63
4.2.- Morfometría de aorta y arterias intrarrenales	63
4.3.- Hígado	64



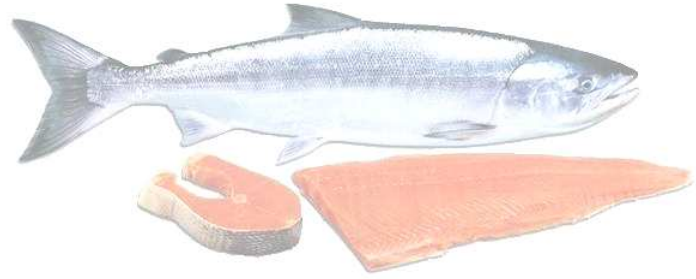
5.- Determinación del perfil lipídico en plasma	66
6.- Determinación de lípidos en hígado	70
7.- Indicadores de estrés oxidativo	71
7.1.- Peroxidación lipídica	71
7.2.- Cuantificación de glutatión	72
7.3.- Detección del anión superóxido en aorta	74
7.4.- Actividad de las enzimas antioxidantes en hígado	75
<i>ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS WISTAR CON DAÑO HEPÁTICO AGUDO</i>	81
1.- Actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático agudo	83
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS</i>	85
<b><i>RESULTADOS</i></b>	
ESTUDIOS PRELIMINARES	89
ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS SHR HIPERCOLESTEROLÉMICAS	93
1.- Estudios <i>in vivo</i>	93
1.1.- Control de presión arterial y frecuencia cardiaca	93
1.2.- Control del peso corporal y de la ingesta alimentaria	95
2.- Estudios <i>in vitro</i>	97
2.1.- Estudios de funcionalidad - Arteria aorta	97
2.2.- Estudios de funcionalidad - Lecho vascular mesentérico	102
2.3.- Estudios de funcionalidad - Riñón perfundido	105
3.- Estudios morfométricos	108
3.1.- Hipertrofia cardiaca y renal	108
3.2.- Morfometría de arterias aorta y renales	109
3.3.- Morfometría e histología en hígado	113

---

4.- Determinación del perfil lipídico	116
5.- Indicadores de estrés oxidativo	120
5.1.- Peroxidación lipídica	120
5.2.- Cuantificación de glutatión	121
5.3.- Detección del anión superóxido en aorta	124
5.4.- Actividad de las enzimas antioxidantes en hígado	125
ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS WISTAR HIPERCOLESTEROLÉMICAS	128
1.- Estudios <i>in vivo</i>	128
1.1.- Control de presión arterial y frecuencia cardiaca	128
1.2.- Control del peso corporal y de la ingesta alimentaria	129
2.- Estudios <i>in vitro</i>	130
2.1.- Estudios de funcionalidad - Arteria aorta	130
2.2.- Estudios de funcionalidad - Lecho vascular mesentérico	134
2.3.- Estudios de funcionalidad - Riñón profundido	137
3.- Estudios morfométricos	140
3.1.- Hipertrofia cardiaca y renal	140
4.- Determinación del perfil lipídico	141
5.- Indicadores de estrés oxidativo	144
5.1.- Peroxidación lipídica	144
5.2.- Detección del anión superóxido en aorta	145
ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS WISTAR CON DAÑO HEPÁTICO AGUDO	146
1.- Histología en hígado	147
2.- Actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático agudo	148

3.- Indicadores de estrés oxidativo	150
3.1.- Detección del anión superóxido en aorta	150
3.2.- Peroxidación lipídica	152
3.3.- Cuantificación de glutatión	153
3.4.- Actividad de las enzimas antioxidantes en hígado	155
<i>DISCUSIÓN</i>	159
<i>CONCLUSIONES</i>	183
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	187





*INTRODUCCIÓN*



## 1.- LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte en todo el mundo<sup>1</sup>. Aunque en las últimas décadas han mostrado una ligera tendencia decreciente en los países desarrollados, en nuestro país el 33% de la mortalidad total corresponde a enfermedades cardiovasculares según el último informe sobre defunciones publicado en 2006 por el instituto nacional de estadística<sup>2</sup>. Entre las ECV siguen destacando la enfermedad cerebrovascular en las mujeres y la cardiopatía isquémica en los hombres<sup>3,4</sup>.

Las ECV de mayor relevancia son el infarto agudo de miocardio, el ictus cerebral y el cuadro de claudicación intermitente. Todas ellas tienen un origen multifactorial, estando claramente establecido desde el estudio Framingham la importancia de diversos factores de riesgo cardiovascular (FRCV) modificables, entre los que podemos destacar la hipertensión arterial (HTA), la hipercolesterolemia, el tabaquismo y la diabetes mellitus y otros como la hipertrigliceridemia, la obesidad y el sedentarismo, que también tienen un papel relevante<sup>5,6,7</sup>.

No obstante, el impacto de dichos FRCV sobre la aparición de eventos cardiovasculares mayores es muy diferente de unos países a otros con niveles similares de desarrollo. Así sucede, por ejemplo, en el denominado entorno del Mediterráneo, donde las tasas de cardiopatía isquémica son muy inferiores a las de países del norte de Europa con un perfil similar o incluso mejor de FRCV clásicos<sup>8,9</sup>. Nuestro país está considerado entre los de baja tasa de enfermedad coronaria a pesar de la elevada prevalencia de los FRCV<sup>10</sup>.

También hay que tener en cuenta que tanto las ECV como los FRCV, al ser las principales causas de morbi-mortalidad en toda Europa, tienen una gran repercusión en los costes de la asistencia sanitaria llegando en 2003 a los 7.000 millones de € en España y son una fuente muy importante de bajas laborales y de discapacidad<sup>11,12,13</sup>. Además, debido al envejecimiento de la población, el número

de muertes por coronariopatía aumentará a lo largo de las próximas décadas, lo que incrementará aún más estos costes.

En atención primaria la HTA y las hiperlipidemias son los FRCV más frecuentes. Estos suelen tener un deficiente control pues, debido a su escasa sintomatología, permanecen silentes durante largos periodos de tiempo. Por ello el adecuado control tanto de los niveles de presión arterial como de los niveles de lípidos plasmáticos son fundamentales en la prevención de las distintas ECV.

Además de aumentar la prevalencia de estas patologías en la población española, también lo está haciendo la diabetes que ha pasado de un 5,6% a un 6,1% en 5 años según las encuestas nacionales de salud en España de los años 2001<sup>14</sup> y 2006<sup>15</sup>. Pero las cifras oficiales están infravaloradas debido a que, al igual que la HTA y las hiperlipidemias, cifras de glucosa por encima de 126 mg/dL consideradas como hiperglucemia no dan lugar a síntomas durante mucho tiempo, por lo que se estima que realmente otro 2,5% de la población desconoce que la padece<sup>16</sup>.

Una parte importante de los FRCV se debe a factores ambientales, esto sugiere un importante potencial de mejora en la prevención de los mismos<sup>17,18</sup>. La prevalencia de los principales FRCV en nuestro país, como ya hemos mencionado, es elevada. Según la última encuesta nacional de salud en España<sup>15</sup> el 30% de los españoles mayores de 16 años es fumador habitual y, a pesar de que en los últimos años se ha registrado un ligero descenso, las muertes atribuibles al hábito tabáquico en 2001 fueron de aproximadamente 52.000<sup>19</sup> y se convierte en la primera causa de enfermedad, discapacidad y muerte prematura evitable.

La dieta juega un papel fundamental en la modulación de estos factores y está demostrado que los países de dieta mediterránea presentan una menor morbilidad y mortalidad por ECV<sup>20</sup>. La dieta mediterránea se ha caracterizado por un alto consumo de fruta, verdura, pescado y aceite de oliva, lo que la hace muy rica en vitaminas, antioxidantes y ácidos grasos mono y poliinsaturados. Las recomendaciones dietéticas que se hacen desde las autoridades sanitarias y las sociedades científicas promueven un mayor consumo de pescado graso para reducir el riesgo de ECV<sup>21</sup>. La dieta de los españoles en las últimas décadas ha experimentado cambios asociados al desarrollo económico e industrial y aunque



todavía se ajusta, en general, al patrón de dieta mediterránea recomendable comienza a separarse en algunos aspectos hacia el modelo anglosajón con mayor aporte de grasas saturadas (principalmente de la carne y los derivados lácteos) y con deficiente ingesta de hidratos de carbono<sup>13,22</sup>.

Al igual que otros países desarrollados, España está experimentando un incremento significativo en la población considerada obesa (índice de masa corporal, IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>), tanto en adultos (15%) como en niños (9%), confirmándose en 2006 la tendencia de los últimos años a incrementar su prevalencia. Las causas fundamentales de este incremento son debidas a los cambios en los hábitos alimentarios asociados al descenso generalizado en la actividad física, debido al incremento del uso del coche y de actividades sedentarias en el hogar como videojuegos o internet. La encuesta nacional de salud 2006 refleja que el 37% de los varones y el 44% de las mujeres no realizan ningún tipo de ejercicio físico durante su tiempo libre<sup>15</sup>. Esta situación ha mostrado una tendencia a empeorar en los últimos años, tanto en hombres como en mujeres, y esto es de extraordinaria importancia porque la actividad física regular es probablemente, junto con la abstinencia del tabaco, la medida más beneficiosa para la promoción de la salud, siendo útiles para controlar otros FRCV como las hiperlipidemias, la HTA y la diabetes.

En la guía para el Tratamiento del Adulto dentro del Programa Nacional de Educación en Colesterol de los Estados Unidos (NCEP-ATP III)<sup>23</sup> y la guía sobre la prevención de las ECV en la práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología y otras Sociedades<sup>24</sup> de los países europeos, se utilizan tablas para valorar el riesgo coronario total diseñadas a partir del estudio Framingham y del riesgo cardiovascular total (eventos fatales y no fatales) del estudio SCORE<sup>25</sup> (Systematic Coronary Risk Evaluation). Mediante esta valoración se determina que a mayor número de FRCV mayor riesgo de padecer un incidente cardiovascular en el plazo de 10 años. Estas tablas orientan sobre el momento en el que se debe iniciar el tratamiento farmacológico.

En el entorno en el que nos encontramos las tablas Framingham sobreestiman el riesgo de padecer un evento cardiovascular en el plazo de 10 años en la población Europea, por ello a partir de la guía del 2003 de la Sociedad

Europea de Cardiología<sup>26</sup> se usan las tablas SCORE basadas en datos de estudios de cohortes de 12 países europeos que incluyen 205.178 sujetos examinados entre 1970 y 1988. Además, existen tablas recalibradas para Alemania, Bélgica, Grecia, Holanda, Polonia, Suecia y España que permiten a los clínicos un mejor manejo de los tratamientos para la HTA, las hiperlipidemias y la diabetes de la población a la que atienden.

Muchas de las ECV tienen en común la arteriosclerosis ya que es una enfermedad multifactorial en cuya aparición influyen diversos FRCV (HTA, hiperlipidemias, etc.), que interactúan entre sí de forma sinérgica y tienden a asociarse en algunos individuos. El desarrollo de las ECV está por tanto íntimamente relacionado con los estilos de vida y los factores de riesgo asociados y se debe tener en cuenta que la coexistencia de varios FRCV potencia el riesgo de sufrir algún tipo de evento cardio o cerebrovascular. De manera que el control de estos FRCV y la modificación en los hábitos de vida pueden retrasar o incluso en ocasiones evitar la aparición de estas enfermedades.

## 2.- DISLIPIDEMIAS

Es un hecho bien establecido que niveles altos de colesterol plasmático se relacionan con un aumento en la incidencia de la morbi-mortalidad cardiovascular, por lo que la reducción en estos niveles disminuye el riesgo de accidentes cardiovasculares, principalmente aquellos relacionados con la aterosclerosis.

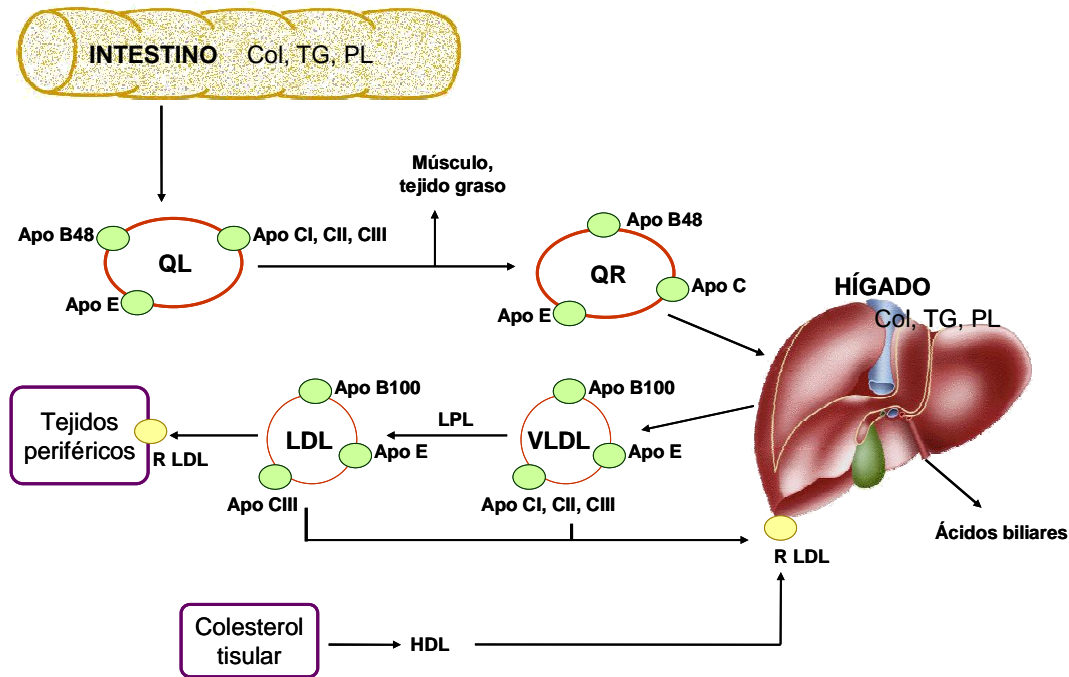
El colesterol es uno de los principales componentes de las membranas celulares e interviene como sustrato en la síntesis de hormonas esteroideas y de ácidos biliares. Su presencia es vital en el organismo, pero cuando se produce un desequilibrio entre las necesidades y los niveles de colesterol pueden aparecer las dislipidemias. Estas alteraciones pueden ser de origen dietético o genético, pudiendo existir alteraciones en la síntesis de colesterol o en las lipoproteínas que lo transportan.

Existen dos vías por las que se incorpora el colesterol al organismo. Una es la dieta de donde se absorbe a nivel intestinal, la bilis facilita su incorporación al sistema linfático y de éste al sistema circulatorio. La otra vía es la síntesis *de novo* de colesterol en el interior de las células.

**Dieta:** cuando el colesterol y los triglicéridos (TG) se incorporan al sistema linfático lo hacen formando parte de los quilomicrones (lipoproteínas del sistema de transporte de estos nutrientes). En su camino hasta el hígado se van perdiendo los TG y modificando las proteínas, pasando a llamarse quilomicrones remanentes. Una vez procesados por el hígado salen hacia los tejidos en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). También en ese caso, el contenido de colesterol y TG, de estas VLDL se va modificando a lo largo de su paso por el organismo llegando a la forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por otra parte las lipoproteínas de alta densidad (HDL) sirven de contratransporte del colesterol desde los tejidos hasta el hígado<sup>27</sup>. Todo este sistema de transporte se muestra en la figura 1.

Tanto los quilomicrones, las VLDL, las LDL como las HDL son lipoproteínas, estructuras formadas por una fracción lipídica (colesterol, TG y fosfolípidos) y por una fracción proteica (apolipoproteínas). Esta última estabiliza el conjunto para

poder ser transportado en un medio acuoso como la sangre y le permite interactuar con ciertos receptores en los tejidos para la liberación de los TG o el colesterol.



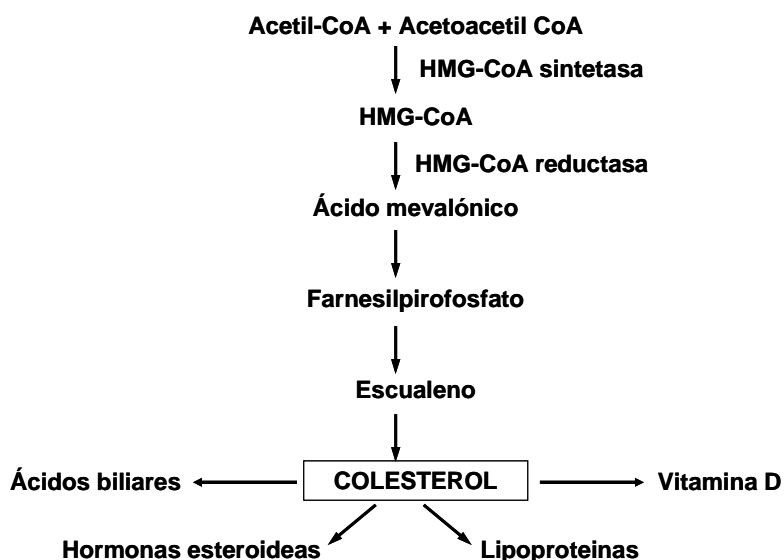
**Figura 1** - Ciclo del colesterol. QL: quilomicrones; QR: quilomicrones remanentes; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; Col: colesterol; TG: triglicéridos; PL: fosfolípidos; LPL: lipoproteín lipasa; R LDL: receptor de las LDL.

Las lipoproteínas se clasifican en función de su densidad que varía según la proporción de proteínas y el tipo de lípidos que formen parte de su composición (Tabla 1), siendo los quilomicrones los de mayor tamaño y menor densidad y las HDL las más pequeñas y más densas. El mayor contenido en TG lo tienen los quilomicrones que transportan el 90% de los TG de la dieta, mientras que el mayor contenido en colesterol se encuentra en las LDL.

	Fosfolípidos	TG	Colesterol	Proteínas	Apoproteínas
<b>QL</b>	4	87	7	2	AI, AIV, B48, CI, CII, CIII, E
<b>VLDL</b>	16	57	17	10	B100, CI, CII, CIII, E
<b>LDL</b>	23	5	47	25	B100, CIII, E
<b>HDL</b>	25-33	3-5	17-22	40-55	AI, AII, CII

**Tabla 1** - Composición porcentual de lipoproteínas presentes en el organismo. QL: quilomicrones; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos.

**Síntesis de novo de colesterol:** aproximadamente el 80% del colesterol endógeno se sintetiza en el hígado mediante la síntesis *de novo* a partir de acetil-coenzima A. La velocidad de esta síntesis la determina la enzima hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA-reductasa) formando ácido mevalónico a partir de hidroximetilglutaril-CoA, como se muestra en el esquema siguiente.



## Clasificación de las dislipidemias

Las dislipidemias son el conjunto de enfermedades que cursan con alteraciones en el metabolismo lipídico, las más relevantes en relación al riesgo cardiovascular son las hiperlipidemias.

La primera clasificación de las hiperlipidemias y la más extendida en la comunidad científica es la descrita por Fredrickson en 1967<sup>28</sup>, basándose en las alteraciones en el perfil lipídico (concentraciones de colesterol y TG). Esta clasificación fue modificada posteriormente por la OMS incluyendo el grupo IIb en ella (Tabla 2).

	I	Ila	IIb	III	IV	V
<b>TG</b>	↑↑↑	Normal	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑↑
<b>Col</b>	↑	↑↑	↑↑	↑	Normal o ↑	↑
<b>VLDLc</b>	Normal o ↑	Normal	↑	↑ <sup>a</sup>	↑↑	↑↑
<b>LDLc</b>	↓↓	↑↑	↑	↑ <sup>a</sup>	Normal o ↓	↓
<b>HDLc</b>	↓↓	Normal	Normal	Normal	Normal o ↓	↓

**Tabla 2** - Clasificación de Fredrickson<sup>28</sup>, modificada por la OMS, para las hiperlipidemias.

<sup>a</sup> VLDLc y LDLc anormales.

Otra manera de clasificar las dislipidemias es en función de la alteración genética que la produzca. Se clasifican en monogénicas si ésta afecta a un solo gen y poligénicas si afecta a varios genes (Tabla 3). La hipercolesterolemia familiar se produce debido a la mutación en el gen que codifica el receptor para las LDL, esto da lugar a una reducción del 50% en el número de receptores para estas lipoproteínas con el consiguiente aumento de LDL plasmático. En el caso de la hipertrigliceridemia familiar la ausencia de lipoproteinlipasa o de apoproteína CII funcionales produce el incremento en los niveles de TG plasmáticos. En la disbetalipoproteinemia familiar la ausencia de la apoproteína E impide el

aclaramiento de los quilomicrones remanentes e incrementa los niveles plasmáticos de colesterol y TG.

<b>Fenotipo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Col (mg/dL)</b>	<b>TG (mg/dL)</b>
<b>Hipercolesterolemia aislada</b>			
Hipercolesterolemia familiar	IIa	275-500	
Defecto de apo-B100 familiar	IIa	275-500	
Hipercolesterolemia poligénica	IIa	250-350	
<b>Hipertrigliceridemia aislada</b>			
Hipertrigliceridemia familiar	IV		250-750
Deficiencia familiar de LPL	I, V		>750
Deficiencia familiar de apo-CII	I, V		>750
<b>Hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia</b>			
Hiperlipidemia combinada	IIb	250-500	250-750
Disbetalipoproteinemia	III	250-500	250-500
Hiperlipoproteinemia Lp(a)	Lp(a)		

**Tabla 3** - Clasificación de las hiperlipidemias en función de su alteración genética. LPL: lipoproteínlipasa. Lp(a): lipoproteína a. Adaptada de Tamargo y Pérez-Vizcaíno<sup>29</sup>.

Las concentraciones plasmáticas de los distintos lípidos dependen de los factores de riesgo de cada individuo y por ello, las consideradas como deseables para personas que no presenten otros factores de riesgo, deberían situarse por debajo de 200 mg/dL de colesterol total, de 150 mg/dL de TG, de 115 mg/dL de LDLc y por encima de 40 mg/dL de HDLc en hombres y de 46 mg/dL de HDLc en

mujeres, según la revisión realizada en 2007 por las Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología (ESH/ESC)<sup>30</sup> y del informe del NCEP-ATP III en 2002<sup>23</sup>. Estos niveles deben restringirse si los pacientes tienen más de 2 FRCV (antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, HTA, HDLc bajo y/o LDLc alto, tabaquismo, diabetes mellitus, obesidad y edad avanzada) e incluso reducirse por debajo de 100 mg/dL de LDLc en pacientes con enfermedad coronaria establecida o riesgo equivalente.

## **El colesterol como factor de riesgo cardiovascular**

El colesterol es un factor de riesgo fundamental en la aterosclerosis. Se ha visto que experimenta una auto-oxidación produciendo un aumento de epóxidos y alcoholes. En hipercolesterolemia, el colesterol se acumula en eritrocitos, plaquetas, leucocitos, polimorfonucleares y en células endoteliales. Este incremento produce un aumento en la producción de radicales libres que causan peroxidación en los lípidos de la membrana, modificaciones del ADN, carbonilaciones y pérdida de grupos sulfhidrilo en proteínas, todo ello lleva a la aparición de disfunción endotelial o HTA entre otras patologías<sup>31</sup>.

El principal transportador de colesterol en la sangre es la LDL y por ello juega un papel muy importante en la aterogénesis, cuyo riesgo aumenta progresivamente a la vez que lo hacen sus concentraciones plasmáticas. Valores de LDLc a partir de 180 mg/dL se consideran de riesgo para la formación de la placa de ateroma. Por el contrario, el colesterol en forma de HDL parece estar inversamente relacionado con la severidad de la aterosclerosis y el riesgo de ECV<sup>32</sup>. Valores inferiores a 40 mg/dL son considerados de riesgo, mientras que valores superiores a 60 mg/dL serían un factor protector frente al desarrollo de estas patologías<sup>33</sup>.

Además las LDL oxidadas (LDLox) pueden modificar el tono vascular tanto de forma directa, ejerciendo un efecto vasoconstrictor sobre las células musculares lisas, como indirectamente al inhibir la liberación de vasodilatadores endógenos como el óxido nítrico (NO). Además favorecen la síntesis de ADN y proteínas y la proliferación celular. Las LDL y su forma oxidada pueden activar el contratransporte de  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ , elevando el pH intracelular, así como promover la



expresión de los genes de respuesta inmediata *c-myc*, *c-fos* y *Erg-1*<sup>34</sup>. Por ello el LDLc, principalmente en su forma oxidada, está implicado tanto en la aterosclerosis como en el control de la presión arterial.

## **Tratamiento de las hiperlipidemias**

La primera medida a tomar antes del tratamiento farmacológico es la dieta y el ejercicio. La reducción del aporte exógeno de grasas, principalmente las saturadas y no superar la ingesta de los 300 mg de colesterol al día, junto con el aumento del consumo de fruta, verdura y grasas poliinsaturadas procedentes de pescado deben ser el primer paso para reducir los niveles de lípidos en sangre. Siempre descartando patologías que puedan estar alterando el perfil lipídico plasmático como diabetes, colestasis, nefropatías, hipotiroidismo, hepatopatías, alcoholismo o ciertos fármacos como diuréticos,  $\beta$ -bloqueantes y anticonceptivos orales entre otros.

Si con los hábitos dietéticos no se corrige el perfil lipídico tendremos que utilizar el tratamiento farmacológico más adecuado en función de la fracción lipídica alterada. Para ello disponemos de los siguientes grupos terapéuticos: estatinas, resinas de intercambio iónico, fibratos, ezetimiba y ácidos grasos poliinsaturados. Describiremos las propiedades de estos últimos más adelante.

### 3.- HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La HTA afecta a cerca del 20% de la población mundial y constituye uno de los motivos de consulta más comunes en las sociedades civilizadas. La importancia de la HTA se debe a que es uno de los FRCV principales para el desarrollo de las ECV. Según las directrices del comité de las ESH/ESC en 2007<sup>30</sup> que elabora una guía para la clasificación y tratamiento de la hipertensión, se considera hipertensión cuando las cifras tensionales son iguales o superiores a 140 mmHg de presión sistólica y 90 mmHg de presión diastólica como se muestra en la tabla 4. Según la última encuesta nacional de salud en España<sup>15</sup> un 21% de la población tiene cifras tensionales por encima de 140-90 mmHg llegando al 40% en edades medias y al 68% en mayores de 60 años<sup>35</sup>. Al igual que ocurre con las hiperlipidemias y la diabetes una parte de la población desconoce que la padece y, además, debemos de tener en cuenta que buena parte de los pacientes tratados no están convenientemente controlados, de ahí su importancia en la enfermedad cardiovascular.

Su incidencia y complicaciones cardiovasculares están aumentando debido al envejecimiento de la población, a la frecuente asociación con otros FRCV así como con la coexistencia de patologías como diabetes o hiperlipidemias que influyen de manera decisiva en la evolución y gravedad de la HTA.

	Normotensión o HTA controlada			Hipertensión		
	Óptima	Normal	n-Alta	Grado 1	Grado 2	Grado 3
<b>PAS, mmHg</b>	<120	120-129	130-139	140-159	160-179	≥180
<b>PAD, mmHg</b>	<80	80-84	85-89	90-99	100-109	≥110

**Tabla 4** - Clasificación de los niveles de presión arterial según ESH/ESC, 2007<sup>30</sup>. PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, n-Alta: normal alta.

El comité ESH/ESC en 2007 no consideró oportuno incluir el término “prehipertensión”, que engloba las presiones normal y n-alta (120-139/80-89 mmHg), que previamente había adoptado en su séptimo informe el Comité Nacional Conjunto en Prevención, Detection, Evaluacion y Tratamiento de la HTA<sup>36</sup> (JNC-7) y elaboró una tabla de estratificación de riesgo cardiovascular total en la que se relacionan los valores de presión arterial con otros FRCV para establecer criterios más rigurosos en relación con la aparición de ECV. Según ésta el umbral que se considera HTA (línea discontinua) varía en función del riesgo cardiovascular total y el término “adicional” indica que en todas las categorías el riesgo es superior al medio. Estos criterios de estratificación del riesgo han sido asumidos por las Sociedades Españolas de Cardiología e Hipertensión en la guía de práctica clínica para el tratamiento de la hipertensión 2007<sup>37</sup> (Tabla 5).

Esta tabla nos indica que la coexistencia de varios FRCV (tabaquismo, hiperlipidemias y diabetes mellitus) junto con lesiones en órganos diana (hipertrofia ventricular izquierda, angina o infarto de miocardio previo, insuficiencia cardiaca, accidente cerebrovascular, nefropatía, enfermedad arterial periférica y/o retinopatía) hacen que la HTA se establezca o sea más grave según las características de cada individuo.

Presión arterial (mmHg)					
	Normal PAS 120-129 o PAD 80-84	Normal Alta PAS 130-139 o PAD 85-89	Grado I HTA PAS 140-159 o PAD 90-99	Grado II HTA PAS 160-179 o PAD 100-109	Grado III HTA PAS ≥ 180 o PAD ≥ 110
Sin otros factores de riesgo	Riesgo medio	Riesgo medio	Riesgo adicional bajo	Riesgo adicional moderado	Riesgo adicional alto
1-2 factores de riesgo	Riesgo adicional bajo	Riesgo adicional bajo	Riesgo adicional moderado	Riesgo adicional moderado	Riesgo adicional muy alto
3 o más factores de riesgo, diabetes, síndrome metabólico o daño orgánico	Riesgo adicional moderado	Riesgo adicional alto	Riesgo adicional alto	Riesgo adicional alto	Riesgo adicional muy alto
Enfermedad cardiovascular o renal establecidas	Riesgo adicional muy alto	Riesgo adicional muy alto	Riesgo adicional muy alto	Riesgo adicional muy alto	Riesgo adicional muy alto

**Tabla 5** - Estratificación del riesgo cardiovascular. HTA: hipertensión arterial; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica. Tomada de Rev. Esp. Cardiol. 2007<sup>37</sup>.

La HTA puede clasificarse según la causa que la produce.

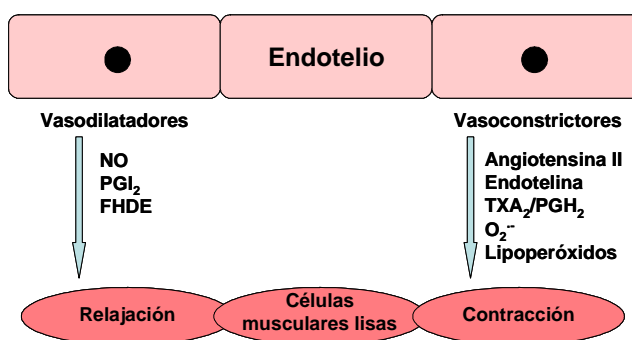
La **HTA primaria o esencial** es de etiología desconocida y representa el 90-95% de los casos. Los factores de riesgo modificables (tabaquismo, alcoholismo, exceso en el consumo de sal, sobrepeso, sedentarismo y estrés) y no modificables (edad, sexo, raza y predisposición hereditaria) están íntimamente relacionados con su desarrollo.

La **HTA secundaria** es de causa conocida y representa en torno al 5-10% restante de los casos. Entre las causas más frecuentes encontramos: las afecciones renales, disfunción hormonal, embarazo y trastornos neurológicos.

## Hipertensión y disfunción endotelial

El endotelio tiene un papel clave en la función vascular y en el mantenimiento de su homeostasis por la producción de numerosos mediadores. Además en su superficie se encuentran gran número de receptores, proteínas de unión, transportadores y mecanismos de señalización implicados en la regulación de

muchos procesos celulares como el crecimiento, la apoptosis y la migración<sup>38</sup>. Entre los mediadores liberados por las células endoteliales encontramos vasodilatadores como el NO, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE) o la prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), y vasoconstrictores como angiotensina II, endotelina,  $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , lipoperóxidos y otros eicosanoides<sup>39</sup> (Figura 2).



**Figura 2** - Componentes vasoactivos del endotelio para el mantenimiento de la homeostasis vascular.

Como consecuencia de la disfunción endotelial se produce una pérdida de la función de barrera selectiva, mayor tendencia a la agregación plaquetaria y a la trombosis, mayor adhesión de leucocitos, vasoconstricción<sup>40</sup> así como migración de las células musculares lisas hacia la capa íntima de los vasos en los que surgen procesos de fibrosis<sup>41</sup>. Esto es reflejo del desequilibrio entre mediadores vasoconstrictores y vasodilatadores que se asocia con numerosos FRCV.

La disfunción endotelial puede producirse por numerosas causas entre las que destacan las alteraciones en la expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la reducción en la biodisponibilidad de NO, el incremento en la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y peroxinitritos ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ) dando lugar a un mayor estado oxidativo<sup>42,43</sup>.

La disfunción endotelial es probablemente el primer paso hacia la HTA y la aterosclerosis las cuales si no se controlan pueden dar lugar a numerosos eventos cardiovasculares como el infarto agudo de miocardio, el accidente cerebrovascular, la isquemia, la trombosis y la muerte súbita por arritmias ventriculares. Además está íntimamente relacionada con otras patologías como las hiperlipidemias y la

diabetes y asociada al tabaquismo, la obesidad, la edad o el estilo de vida sedentario, como ya hemos mencionado anteriormente.

Esta disfunción mejora al tratar la causa subyacente que la está provocando. El tratamiento de la HTA, las hiperlipidemias y la diabetes así como la supresión del hábito tabáquico o la incorporación del ejercicio aeróbico regular hacen que mejore la función endotelial.

## **Tratamiento de la hipertensión**

El objetivo terapéutico para todos los pacientes con HTA es bajar las cifras tensionales por debajo de 140-90 mmHg y por debajo de 130-80 mmHg en pacientes diabéticos o con insuficiencia renal crónica.

Como se ha mencionado anteriormente, actuando sobre algunos factores de riesgo como son la obesidad o el sedentarismo, en algunos pacientes podremos reducir o retrasar la aparición de HTA, al menos en los estadios iniciales. Para ello deberán, mediante una dieta equilibrada y un aumento del ejercicio aeróbico, reducir el peso, restringir el consumo de sodio y moderar el consumo de alcohol. Una dieta equilibrada rica en fruta, verduras y pescado graso proporciona los nutrientes antioxidantes y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que ayudan a mejorar la disfunción endotelial regulando la presión arterial y retrasando la aparición de HTA.

Si los hábitos saludables no son suficientes para controlar las cifras de presión arterial se pasará al tratamiento farmacológico. El arsenal terapéutico que existe actualmente para tratar la HTA es amplio y variado. Este tipo de fármacos se pueden clasificar según su lugar o mecanismo de acción en diuréticos,  $\alpha$  y  $\beta$  bloqueantes, antagonistas de canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas del receptor de angiotensina II, inhibidores de renina y vasodilatadores.

La elección del fármaco más adecuado se hará en función de las características del paciente (perfil del riesgo cardiovascular, edad, presencia de lesiones en órganos diana, etc.), del coste y la experiencia previa con el mismo.

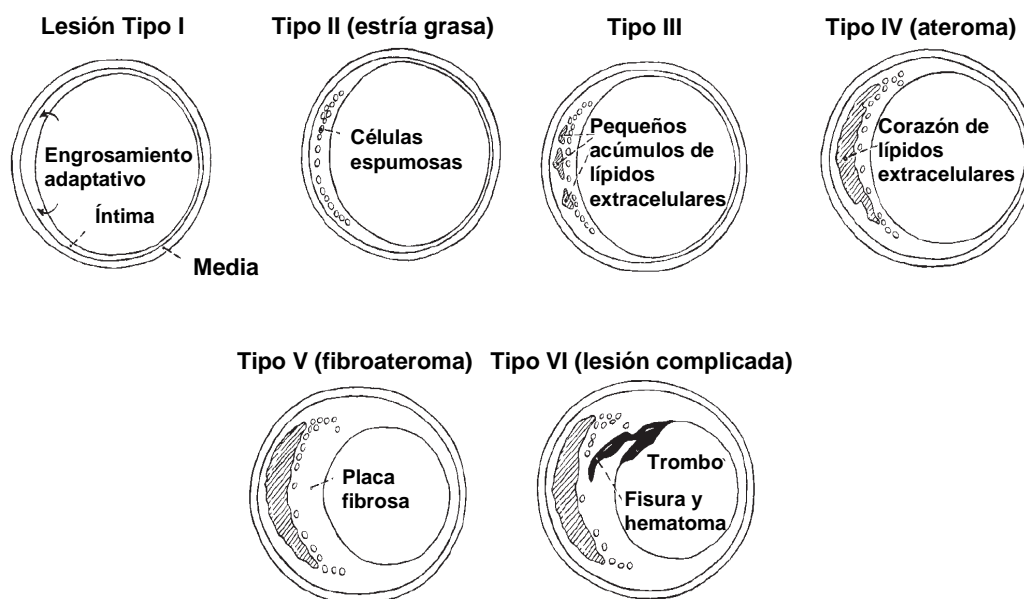
## **4.- ATEROSCLEROSIS**

La arteriosclerosis es el conjunto de alteraciones que afectan al sistema vascular y que se caracterizan por un proceso generalizado que se presenta con un aumento difuso del grosor de las capas íntima y media de las arterias, con pérdida de elasticidad. La aterosclerosis es una forma de arteriosclerosis definida por una lesión típica en los vasos, la placa de ateroma que contiene lípidos, células inflamatorias, tejido conectivo, etc<sup>44</sup>. Generalmente afecta a arterias de medio y gran tamaño y es responsable de la mayor parte de los casos de morbi-mortalidad cardiovascular por la obstrucción total o parcial de los vasos. Otras formas de arteriosclerosis son las que afectan, en pacientes diabéticos o hipertensos, a pequeños vasos distales (arteriolosclerosis), o las formas periféricas calcificadas como la “enfermedad de Mönckeberg”.

La formación de la placa de ateroma es multifactorial. Su desarrollo es muy lento y temprano, tanto es así que las primeras lesiones ateroscleróticas (estría grasa) se producen en la primera década de la vida. Se caracteriza por una reactividad vascular alterada y una disminución de la síntesis de NO, sin cambios morfológicos. Se produce debido a la aparición de cambios hemodinámicos como turbulencias en el flujo sanguíneo y modificaciones mecánicas por incremento de presión o fenómenos de cizalla en los vasos, así como por cambios en el metabolismo oxidativo (alteraciones en la glucólisis aeróbica). Esto condiciona la aparición de procesos adaptativos en la íntima, modificando el grosor y el revestimiento endotelial dando lugar a un endotelio disfuncional<sup>45,46</sup>.

En la formación de la placa de ateroma intervienen las células endoteliales, el sistema monocito-macrófago, las células musculares lisas de los vasos, las plaquetas, los linfocitos T y un exceso en LDLox. El primer acontecimiento por el que se inicia la lesión en la pared endotelial es la interacción entre las LDLox y los macrófagos<sup>47</sup>. La LDL nativa no presenta apenas problemas en el sistema vascular pero cuando estas LDL se oxidan por sustancias como las especies reactivas de oxígeno (ERO), hacen que los monocitos tengan gran afinidad para captarlos, desplazándose bajo la íntima y convirtiéndose en macrófagos. Estos macrófagos se cargan de LDLox hasta el punto de transformarse en células espumosas<sup>48</sup>. Los

depósitos lipídicos inicialmente son escasos pero ya visibles como una zona con relieve de color amarillento que se llama estría grasa o lesión II de la clasificación de Stary<sup>49</sup> (Figura 3). Esta forma puede evolucionar a una ateromatosis o revertir espontáneamente.



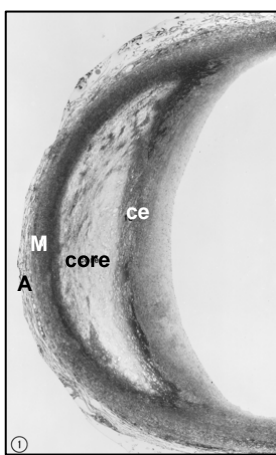
**Figura 3** - Diferentes estadios de la evolución ateromatosa coronaria. Adaptada de Stary H.C. y cols.<sup>49</sup>

Una vez que los macrófagos se sobrecargan de colesterol, superando la capacidad de la célula para esterificarlo, el colesterol que no se esterifica queda en forma libre dentro de la célula, es tóxico para ésta y muere, liberando al medio extracelular todo el colesterol esterificado y libre que contenía, así como radicales libres y diversas enzimas proteolíticas y lisosomales<sup>50</sup>. Esto provoca una reacción inflamatoria local en la que participan una serie de procesos que van desde la expresión de proteínas quimiotácticas y moléculas de adhesión a la producción de factores de crecimiento y a la agregación plaquetaria. La disfunción endotelial que se produce altera la capacidad antitrombótica y fibrinolítica, e incluso la respuesta



vasomotora, produciendo un desequilibrio en la síntesis y liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras<sup>51</sup>.

Tras esta primera reacción inflamatoria local se pasa a una lesión endotelial tipo IV o ateroma, con un proceso inflamatorio crónico caracterizado por depósitos de colesterol extracelular en el centro, al que se llama *corazón* o *core* lipídico y rodeado de macrófagos, linfocitos T y células musculares lisas como se ve en la siguiente microfotografía<sup>52</sup>.



**Figura 4** - Microfotografía de una placa de ateroma tipo IV típica en arteria coronaria descendente anterior. *Core* o *corazón* lipídico con depósitos extracelulares de colesterol. En la región entre el core y la superficie endotelial aparecen macrófagos y células espumosas (**ce**) sin mostrar un incremento marcado en las células o las fibras de colágeno. **A**: adventicia, **M**: media.

En la fase final de la aterosclerosis se producen fenómenos de fibrosis dando lugar a una lesión tipo V, también llamada placa fibrosa o fibroateroma, con abundante colágeno que se muestra como un relieve en la superficie intravascular, llegando a la obstrucción de la luz de la arteria<sup>53</sup>. Su riqueza celular y lipídica le da una consistencia blanda que le permite deformarse con los movimientos de vaivén de las eyecciones sistólicas y con los cambios de diámetro de las variaciones sistólico-diastólicas. Esos movimientos las hacen muy sensibles a fisuras o roturas del endotelio agravando la lesión ateromatosa y apareciendo síntomas de isquemia<sup>54</sup>. En la evolución posterior aparece la cicatrización bien por calcificación o por fibrosis desapareciendo el núcleo lipídico y estabilizando la lesión.

La gravedad de la isquemia está relacionada directamente con el lugar en el que se produzca y el tiempo que tarde en revertir. Cuando la obstrucción afecta a las arterias cerebrales pueden aparecer desde ataques de isquemia cerebral

transitoria, hasta accidentes cerebrovasculares agudos con secuelas más o menos permanentes. Si la obstrucción se produce en las arterias coronarias pueden aparecer angina de pecho o infarto de miocardio. Y cuando afecta a las arterias renales se facilita el desarrollo de insuficiencia renal o la aparición de un tipo especial de hipertensión denominada renovascular. La obstrucción de las arterias de las extremidades inferiores puede dar lugar a un cuadro de claudicación intermitente que se caracteriza por la presencia de dolores musculares. Por último, la presencia de lesiones ateroscleróticas complicadas en la aorta favorece el desarrollo de aneurismas aórticos.

## Aterosclerosis y estrés oxidativo

Cada vez existen más evidencias de la relación entre ERO y patologías cardiovasculares tales como la disfunción endotelial o la aterosclerosis<sup>55</sup>. Una mayor producción a nivel vascular de ERO y particularmente sus interacciones con el NO representan un mecanismo fisiopatológico común en muchos de los FRCV<sup>56</sup>. También el desequilibrio en el estado oxidativo del organismo provoca la subida de la presión arterial tanto en HTA adquirida como genética<sup>57</sup>.

En el proceso normal del metabolismo celular, el oxígeno sufre una serie de reducciones univalentes, que llevan a la producción de  $O_2^{\cdot -}$ <sup>58</sup>. Este radical libre tiene en su estructura un electrón desapareado, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable y fugaz con gran capacidad de formar otros radicales libres por reacciones químicas en cadena<sup>59,60</sup>. También se consideran ERO el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y los radicales lipídicos ( $LO^{\cdot}$  y  $LOO^{\cdot}$ ).

En algunos modelos de hipertensión se ha observado un aumento en la producción de  $O_2^{\cdot -}$  a nivel vascular. Este aumento se cree que se produce por la mayor actividad de la nicotinamida adenina dinucleótido/nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADH/NADPH) oxidasa, ya que es la enzima principal en la formación de  $O_2^{\cdot -}$  en la pared vascular<sup>61,62</sup>.

Existen otras vías de menor importancia que la NADPH oxidasa por las que se generan los  $O_2^{\cdot -}$  como son la eNOS desacoplada y la xantina oxidasa (XO), además de la cadena respiratoria en las mitocondrias o enzimas que intervienen en

la reducción del oxígeno, como la ciclooxigenasa (COX), la lipoxigenasa (LOX), el citocromo p450 y otras hemoproteínas.

Numerosos agentes externos también favorecen o inducen la generación de ERO y el daño oxidativo. Así las radiaciones ionizantes, la polución y la contaminación ambiental, el tabaco, los pesticidas, ciertos metales como el hierro y el cobre, algunos fármacos e incluso la edad producen un incremento en la formación de ERO<sup>63,64,65,66</sup>.

Aparte de la acción vasoconstrictora inherente del  $O_2^{\cdot -}$ <sup>67</sup> en pequeñas cantidades es estimulante de la COX y así incrementa el efecto relajante que se produce en condiciones basales con la estimulación y la liberación de  $PGI_2$  por esta enzima<sup>68</sup>, pero a su vez provoca mayor producción de ERO. A mayores concentraciones inhibe de manera selectiva la formación de  $PGI_2$ , revirtiendo el signo del equilibrio hacia la vasoconstricción por formación de  $PGF_{2\alpha}$  y  $TXA_2$ .

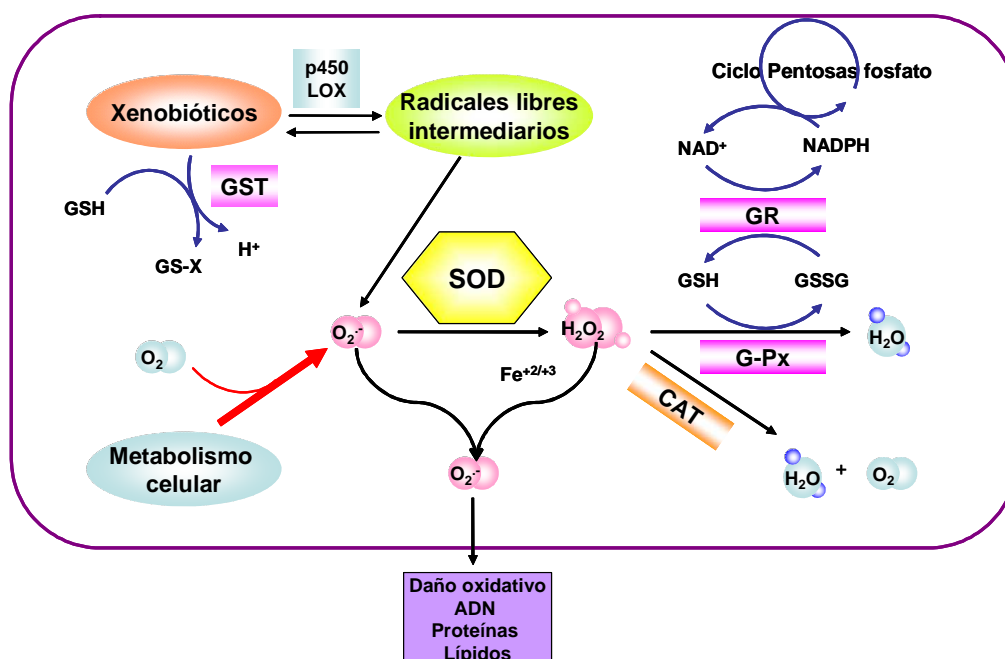
La desactivación del NO al interactuar con  $O_2^{\cdot -}$  formando  $ONOO^-$  es uno de los problemas más importantes que se generan a nivel vascular. Estos  $ONOO^-$  ya no tienen capacidad vasodilatadora y ejercen acciones contracturantes<sup>69</sup> produciendo una reducción del tono vasodilatador basal, desequilibrando el control de la presión arterial<sup>70</sup>, incrementando el estrés oxidativo y produciendo daño endotelial<sup>71</sup>. Con todo ello se favorece la aparición de la placa de ateroma.

La interacción de ERO con las LDL presentes a nivel vascular altera su estado oxidativo convirtiéndolas en LDLox que, como hemos mencionado, son el primer paso para la activación de los monocitos circulantes provocando las lesiones grasas que desembocarán, a lo largo de la vida del individuo, en aterosclerosis.

### **Defensas antioxidantes**

Para regular las concentraciones de ERO las células poseen un amplio y complejo sistema de eliminación de radicales libres<sup>72</sup>. Existen moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), el trans-retinol/ $\beta$ -caroteno (vitamina A) entre otras, que inhiben, bloquean o amortiguan los efectos producidos por los radicales libres y sistemas

enzimáticos que funcionan de forma acoplada y secuencial como son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (G-Px), la glutatión reductasa (GR) y la glutatión S-transferasa (GST). La figura 5 muestra la relación entre estos sistemas.

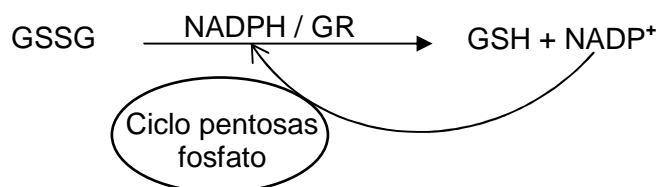


**Figura 5** – Sistemas enzimáticos implicados en la defensa antioxidante. LOX: lipoxigenasa; p450: citocromo p450; SOD: superóxido dismutasa; GST: glutatión S-transferasa; CAT: catalasa; G-Px: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; X: xenobióticos.

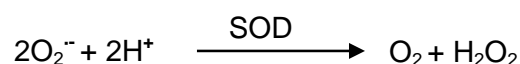
**Glutatión.** El glutatión reducido (GSH) es el principal antioxidante no enzimático del organismo y el hígado es el órgano que más influye en su síntesis, consumo, almacenamiento y transporte hacia el plasma y la bilis<sup>73</sup>.

En el proceso de eliminación de lipoperóxidos, muy inestables y dañinos para el organismo, se forma glutatión oxidado (GSSG) tras la unión de dos moléculas de GSH que ceden su  $H^+$  para estabilizarse y así ser eliminados posteriormente. Este

GSSG se recupera gracias a la GR, que mediante consumo de NADPH lo reduce a GSH siendo activo de nuevo, como se muestra en el esquema.

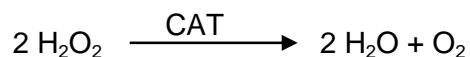


**Superóxido dismutasa.** La SOD es una de las enzimas más importantes del sistema de defensa antioxidante del organismo y forma la primera barrera frente a los radicales libres, encargándose de la dismutación del  $\text{O}_2^{\cdot -}$  a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, como se muestra en el esquema, eliminando así uno de los principales radicales libres<sup>74</sup>.



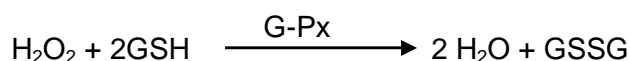
En el citosol, los lisosomas y el núcleo celular se encuentra en forma homodimérica y contiene  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  y en la mitocondria principalmente es un homotetrámero que contiene  $\text{Mn}^{2+}$ .

**Catalasa.** Esta enzima cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno<sup>75</sup>, como muestra el esquema. El peróxido de hidrógeno se forma como producto principalmente de la dismutación del  $\text{O}_2^{\cdot -}$  por la SOD. La eliminación del agua oxigenada del interior de la célula mejora la protección frente al daño oxidativo.



**Glutación peroxidasa.** La G-Px cataliza la detoxificación de hidroperóxidos de distintas procedencias, tanto del peróxido de hidrógeno como de los peróxidos

orgánicos (R-OOH), a sus correspondientes alcoholes estables y a agua, consumiendo GSH como se ve en el esquema. Así contribuye a la protección de las células frente al daño oxidativo.



Se han encontrado al menos 5 isoenzimas de G-Px en mamíferos. Todas ellas están presentes en numerosos tejidos aunque con distintos niveles de expresión. Cada una tiene diferentes afinidades según el tipo de peróxido que elimine, pero la diferencia más notable es que la isoforma G-Px5 es independiente de selenio y no reacciona con peróxido de hidrógeno<sup>76</sup>.

**Glutión reductasa.** La GR es la enzima que cataliza la recuperación de GSH por reducción del GSSG y consumo de NADPH. Este GSH es sustrato para la G-Px y la GST y actúa como antioxidante no enzimático, inhibiendo la formación de radicales libres y peróxidos orgánicos, por lo que la activación de esta enzima supone mayor protección frente al daño oxidativo al incrementar los niveles de GSH en el organismo<sup>77</sup>.

**Glutión S-transferasa.** Las GST son un grupo de enzimas muy importantes en la eliminación de numerosos xenobióticos. Estas enzimas protegen a las células de los tóxicos externos mediante la conjugación de grupos tiol procedentes del GSH, con xenobióticos electrofílicos, protegiendo así de los efectos mutagénicos, carcinogénicos y tóxicos de estos compuestos<sup>78</sup>.



En conclusión, la eliminación de las ERO mejora el estado oxidativo del organismo y con esto la disfunción endotelial presente en numerosas patologías como HTA, hiperlipidemias, diabetes y otros FRCV como el tabaquismo.

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial en cuya aparición influyen diversos FRCV que interactúan entre si de forma sinérgica y tienden a asociarse en algunos individuos. En los estadios iniciales de la formación de la placa de ateroma cobra una gran relevancia, para prevenir la evolución de la aterosclerosis, un estilo de vida saludable donde la dieta equilibrada, el ejercicio moderado y la eliminación del hábito tabáquico juegan el papel principal. Para ello las recomendaciones dietéticas del Comité para la Nutrición de la Asociación Americana del Corazón<sup>79</sup> (AHANC) y la guía europea para la prevención de la enfermedad cardiovascular en la práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología y otras Sociedades<sup>24</sup> son las que se realizan para la prevención de las ECV y que se comentarán en el apartado siguiente.

## **5.- INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR**

La influencia de la alimentación sobre los FRCV está claramente demostrada mediante numerosos estudios donde se comparan modelos dietéticos de distintos países<sup>80,81,82</sup>. De esta manera se establecen varios tipos de dieta entre los que destaca la dieta mediterránea como beneficiosa para el control de los FRCV. Esta dieta se caracteriza por el consumo de cereales, legumbres, frutas y verduras frescas, aceite de oliva y vino, que ofrece ventajas frente al modelo anglosajón donde existe un mayor consumo de grasa animal, lácteos y bebidas alcohólicas, fundamentalmente cerveza y licores.

Los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea se observan cuando comparamos las tasas de mortalidad por ECV de los países del entorno Mediterráneo con los del norte de Europa donde son mucho más elevadas. Con el fin de encontrar qué componentes de la dieta podrían ser los responsables del efecto protector se han llevado a cabo diferentes estudios cuyas conclusiones ponen de manifiesto que el riesgo cardiovascular se relaciona más con el tipo de grasa que con la cantidad y que la sustitución en la dieta de las grasas saturadas por grasas monoinsaturadas del aceite de oliva o poliinsaturadas del pescado graso podrían resultar beneficiosas en el control de las ECV<sup>20,81,83</sup>. Además, el alto consumo de fruta y verdura fresca hace que la ingesta de compuestos antioxidantes sea elevada contribuyendo a la menor incidencia de ECV en la región Mediterránea<sup>84,85,86</sup>.

Nuestro país pertenece al entorno mediterráneo y, como otros países de este entorno, mantiene hábitos alimenticios propios de la dieta mediterránea. Sin embargo, las modificaciones en los hábitos dietéticos de las últimas décadas de la población española comienzan a separarse de este modelo y a acercarse al modelo anglosajón, por lo que desde las autoridades sanitarias y las sociedades científicas tanto nacionales como internacionales se promueve la dieta mediterránea para reducir el riesgo de ECV.



Así, la **OMS**<sup>21</sup> en 2004 aprobó la Estrategia Mundial sobre Régimen Alimentario, Actividad Física y Salud en la que se promueve la alimentación sana, la actividad física regular y adecuada y evitar el consumo de tabaco, para reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles entre las que destacan las ECV, la diabetes y algunos tipos de cáncer.

Entre las recomendaciones con respecto a la dieta destacan el mantenimiento del equilibrio energético y el peso corporal normal (IMC=18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>) limitando la ingesta energética procedente de las grasas, sustituyendo las grasas saturadas por insaturadas y tratando de eliminar las grasas *trans*. Aumentar el consumo de frutas y hortalizas, así como de legumbres, cereales integrales y frutos secos. Limitar la ingesta de azúcares libres y de sal y consumir sal yodada.

Con respecto a la actividad física se recomienda la práctica de al menos 30 minutos de actividad regular de intensidad moderada con una frecuencia casi diaria.

La **Sociedad Europea de Cardiología y otras Sociedades** en su último informe<sup>24</sup> destaca el estilo de vida saludable como método para reducir la incidencia de algunos de los FRCV fundamentales en el desarrollo de las ECV. Para ello es fundamental la eliminación del hábito tabáquico junto con el control del peso (IMC<25 kg/m<sup>2</sup>), mediante una dieta saludable y equilibrada y la realización habitual de actividad física moderada (30 minutos al día). Entre las recomendaciones dietéticas se incentiva el consumo de frutas, verduras, cereales integrales, pan, pescados principalmente grasos y carnes magras. Se aconseja reducir el consumo de sal y sustituir el consumo de grasas saturadas por el de monoinsaturadas (AGMI) de origen vegetal (aceite de oliva) y poliinsaturadas (AGPI) de origen marino (pescado graso), sin que el total de grasas exceda del 30% de la energía diaria.

Desde la **Asociación Americana del Corazón**<sup>79</sup> también se recomienda el estilo de vida saludable como el mejor método para evitar los FRCV que darán lugar a lo largo de la vida al desarrollo de las ECV. Al igual que se menciona en los documentos de la OMS y de la Sociedad Europea de Cardiología y otras Sociedades, esta asociación también aconseja dejar de fumar, incentiva la actividad física moderada habitual y una mejora en los hábitos alimentarios de la

población. La dieta propuesta es similar a la hecha por los otros dos organismos internacionales mencionados pero da más detalles en algunos aspectos de la misma, recomendando la ingesta de pescado graso al menos 2 veces por semana, y reduciendo el consumo de grasas saturadas (<7%), grasas *trans* (<1%), colesterol (<300 mg/día), azúcares añadidos y sal y limitando el consumo bebidas alcohólicas.

El conjunto de recomendaciones dietéticas que proponen los organismos internacionales mencionados se muestran esquemáticamente a continuación.

**Reducir el consumo de:**

- Grasas totales (< 30%)
- Grasas saturadas (< 7%)
- Grasas *trans* (< 1%)
- Azúcares añadidos
- Colesterol (< 300 mg/día)
- Sal (limitado o nulo)
- Alcohol (moderado)

**Aumentar el consumo de:**

- Fruta y verdura fresca
- Alimentos ricos en fibra
- Legumbres
- Pescado graso (rico en AGPI, mínimo 2 veces/semana)
- Aceite de oliva (rico en AGMI)

En los estadios iniciales de las patologías cardiovasculares como la HTA, las hiperlipidemias, la aterosclerosis y la diabetes, es beneficioso mantener un estilo de vida saludable con dieta equilibrada, ejercicio físico moderado y la eliminación del hábito tabáquico, lo que hace que estas patologías tarden en establecerse o facilitan su control.

## 5.1.- Ácidos grasos insaturados

Durante la última década se han llevado a cabo numerosas investigaciones para conocer la importancia de los AGPI en la salud. Esto ha dado lugar a gran cantidad de información acerca de su influencia en la mejora de muchos de los factores de riesgo asociados con las ECV. Por ello las nuevas recomendaciones dietéticas van encaminadas a incrementar su ingesta.

A los AGPI se les atribuyen propiedades tales como la bajada de presión arterial, la mejora de los parámetros lipídicos o de la función endotelial, la prevención de la agregación plaquetaria o de la formación de la placa de ateroma e incluso propiedades antiarrítmicas<sup>87</sup>.

Las primeras investigaciones llevadas a cabo para determinar la influencia de los AGPI en la salud fueron realizadas por el grupo de Bang, en ellas mostraron que la población esquimal, que consumía grandes cantidades de proteínas y grasas, principalmente de pescado, tenían tasas inferiores de colesterol, LDLc y TG que la población general<sup>88,89,90</sup>.

A partir de entonces mucho se ha investigado sobre la relación de estos AGPI y las ECV y la gran importancia que tiene una correcta proporción entre los omega 3 ( $\omega$ -3) y los omega 6 ( $\omega$ -6), dos de los grupos de AGPI. En el último siglo los hábitos dietéticos de la población occidental se han modificado enormemente debido a la industrialización, esto ha producido que la proporción  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 pasara de 1,5:1 a 16:1 de media en la población norteamericana<sup>91</sup> y en el resto de países industrializados, dando lugar a dietas con alto contenido en  $\omega$ -6 y deficiente en  $\omega$ -3.

Puesto que ambos grupos comparten la misma ruta metabólica, el incremento en la dieta de uno de ellos puede tener consecuencias para la salud. Los metabolitos que surgen a partir de los  $\omega$ -6 son prostaglandinas altamente inflamatorias mientras que a partir de los  $\omega$ -3 las prostaglandinas producidas son mucho menos inflamatorias reduciendo el proceso inflamatorio y favoreciendo su resolución.

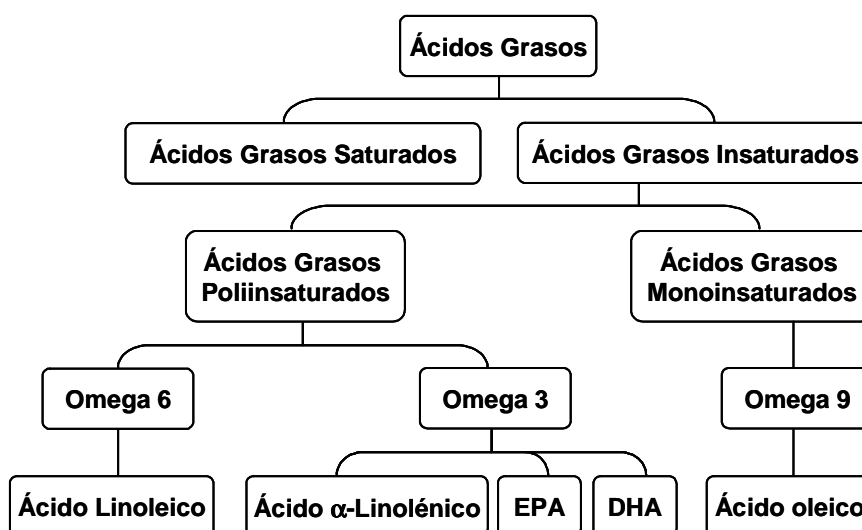
## Clasificación de las grasas

Las distintas características que tiene la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos que forman las grasas hacen que tengan diferentes propiedades físicas y químicas y que su comportamiento e importancia en el organismo sean también diferentes.

Las grasas se clasifican (Figura 6) en función del número de átomos de carbono y del grado de saturación de los ácidos grasos que las forman en:

**Saturadas:** sus ácidos grasos no tienen dobles enlaces. Son sólidos a temperatura ambiente y aparecen en la grasa animal (mantequilla, quesos, yema de huevo, carne) y de algunos vegetales como el coco o la palma.

**Insaturadas:** sus ácidos grasos contienen uno o más dobles enlaces denominándose respectivamente monoinsaturados y poliinsaturados. Son líquidas a temperatura ambiente y conocidos como aceites (de oliva, maíz, etc.).

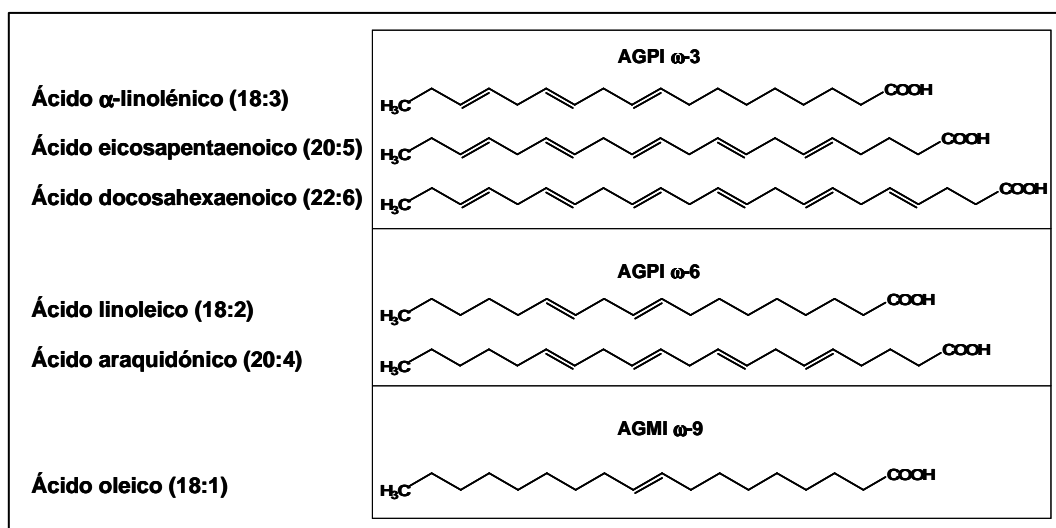


**Figura 6** - Clasificación de las grasas. EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico.

La nomenclatura hace referencia tanto a la longitud de la cadena hidrocarbonada como al número de dobles enlaces y la posición en la que se

encuentran teniendo como referencia el extremo metilo terminal. Así la notación “a:b” de las grasas insaturadas se usa para marcar el número de carbonos “a” y el de dobles enlaces “b”.

Entre las grasas insaturadas encontramos tres series diferentes: serie  $\omega$ -3 derivada del ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3), serie  $\omega$ -6 derivada del ácido *cis*-linoleico (AL, 18:2), y serie  $\omega$ -9 derivada del ácido oleico (AO, 18:1). Se denominan  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 y  $\omega$ -9 ya que sus dobles enlaces se encuentran en las posiciones 3<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 9<sup>a</sup> respectivamente contando desde el extremo metilo terminal. Las estructuras de los principales ácidos grasos insaturados se muestran en la figura 7.



**Figura 7-** Estructura de los principales ácidos grasos insaturados  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 y  $\omega$ -9.

Dentro de las grasas insaturadas merecen nuestra atención ALA y AL que se denominan ácidos grasos esenciales (AGE) porque no se sintetizan por nuestro organismo y son necesarios para el correcto funcionamiento celular. No sólo es necesaria su ingesta sino que la relación entre las series  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 debe ser de aproximadamente 1 ya que una proporción muy elevada de  $\omega$ -6 se asocia con numerosas patologías incluyendo ECV, inflamación, enfermedades autoinmunes e incluso cáncer como ya hemos comentado. Aunque no está aún bien establecido

cuál es la proporción más idónea para que se manifiesten efectos beneficiosos, algunos autores indican que proporciones de 4/1 ya están asociadas con un descenso en la mortalidad cardiovascular del 70%<sup>92,93</sup>.

Las principales fuentes de ácidos  $\omega$ -3 proceden del pescado y en especial del pescado graso (salmón, caballa, atún, ...). El contenido en  $\omega$ -3 varía en función de la especie de pescado<sup>94</sup>, su localización o la estación del año debido al consumo del fitoplancton, rico en  $\omega$ -3, que contribuye a la adaptación de los peces a las aguas frías. En la tabla 6 se muestran las cantidades medias de  $\omega$ -3 en algunos tipos de pescado.

En el caso de los  $\omega$ -6 las fuentes principales son los vegetales (lino, onagra, girasol, ...) y en el caso de los  $\omega$ -9 es el aceite de oliva, muy rico en ácido oleico.

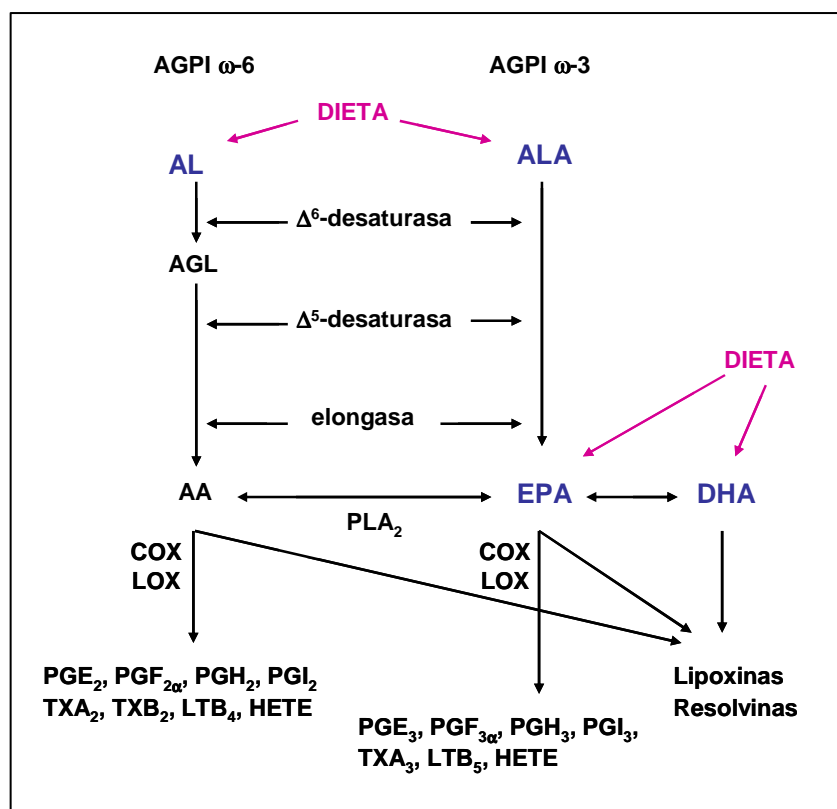
<b>PESCADO</b>	<b><math>\omega</math>-3 (g /100 g)</b>	<b>PESCADO</b>	<b><math>\omega</math>-3 (g /100 g)</b>
Anchoa	1,47	Lenguado	0,10
Arenque	2,66	Lucio	0,37
Atún	1,20	Mejillón	0,68
Bacalao	0,26	Ostras	0,37
Caballa	2,80	Pez espada	0,44
Calamar	0,45	Rodaballo	0,52
Carpa	0,70	Salmón	1,80
Caviar	3,74	Sardina	2,30
Langostinos	0,11	Trucha	1,30

**Tabla 6** - Contenido medio de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 en diferentes tipos de pescado.

## **Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados**

Los AGPI son importantes constituyentes de todas las membranas celulares donde se almacenan en forma de glicerofosfolípidos. Confieren a la membrana la fluidez necesaria para la interacción entre receptores y ligandos<sup>95</sup>. La fluidez de las membranas celulares se incrementa cuanto mayor es la longitud y el número de dobles enlaces de la cadena del ácido graso. Por ello tanto el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5), con 20 átomos de carbono y 5 dobles enlaces, como el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6), con 22 átomos de carbono y 6 dobles enlaces, son importantes para el adecuado funcionamiento de la membrana favoreciendo las interacciones entre sus receptores y los diferentes ligandos<sup>96</sup>.

Como ya hemos dicho, los AGE no son sintetizados por el organismo y por ello deben ser ingeridos en la dieta, mientras que los  $\omega$ -9 no son estrictamente esenciales ya que pueden ser sintetizados a partir de las series  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6. Todos ellos se metabolizan por el mismo conjunto de enzimas, dando lugar a sus metabolitos de cadena larga: ácido araquidónico (AA) sintetizado a partir de AL, EPA y DHA a partir de ALA, que por sí mismos son activos, además de ser precursores de eicosanoides. En la figura 8 se muestran las rutas metabólicas de estos AGPI hasta la producción de prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), tromboxanos (TX), resolvinas y lipoxinas<sup>97,98</sup>. Los eicosanoides producidos a partir de los ácidos grasos  $\omega$ -6 (PGI<sub>2</sub>, PG y TX de la serie 2 y LT de la serie 4) son más activos que los producidos a partir de los ácidos grasos  $\omega$ -3 (series 3 y 5).



**Figura 8** - Rutas metabólicas de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) ω-3 y ω-6. AA: ácido araquidónico; COX: ciclooxigenasa; DHA: ácido docosahexaenoico; EPA: ácido eicosapentaenoico; AGL: ácido γ-linolénico; HETE: ácido 5-hidroxi-6,8,11,14-eicosatetraenoico; AL: ácido linoleico; ALA: ácido α-linolénico; LOX: lipoxigenasa; LT: leucotrienos; PG: prostaglandinas; PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>; TX: tromboxanos. Adaptado de Caballero y cols.<sup>98</sup>

Los procesos inflamatorios se inician y perpetúan por la acción de PG y LT (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXA<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub>) que a su vez se sintetizan a partir de AA por una gran variedad de estímulos. Cuando existen grandes cantidades de EPA y DHA en el organismo el proceso inflamatorio no es tan intenso, debido a que estos ácidos grasos compiten con el AA para unirse con la COX<sup>99</sup> y entonces se forman PG y TX de la serie 3 y LT de la serie 5 (PGE<sub>3</sub>, PGF<sub>3α</sub>, TXA<sub>3</sub>, LTB<sub>5</sub>, LTC<sub>5</sub> y LTD<sub>5</sub>) que son menos inflamatorios. Además de PG y LT, a partir de EPA, DHA e incluso de AA pueden sintetizarse otras moléculas antiinflamatorias como lipoxinas y



resolvinas. Estas dos últimas inhiben la generación de citocinas, la adhesión y diapédesis leucocitaria y la formación del exudado, con lo que la resolución del proceso inflamatorio es más rápido y con menores implicaciones para el organismo.

Los AGPI por sí mismos juegan un papel fundamental en la fisiopatología de numerosas enfermedades muy prevalentes en todo el mundo como HTA, diabetes, enfermedad coronaria y aterosclerosis y en otras de menor prevalencia como síndrome metabólico, psoriasis, eczema y dermatitis atópica, siendo considerados un factor protector frente a la progresión de estas enfermedades<sup>100,101,102</sup>.

## **Ácidos grasos poliinsaturados y presión arterial**

Pacientes con HTA no controlada han mostrado elevados niveles de  $O_2^{\cdot-}$ , peróxido de hidrógeno, peróxidos lipídicos, endotelina, angiotensina II y factor transformador del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y, a la vez, descenso en la actividad del enzima SOD, en los niveles de NO endotelial, vitamina E y AGPI. En estas circunstancias el equilibrio entre factores relajantes y contracturantes se desplaza hacia la vasoconstricción.

Elevados niveles de  $O_2^{\cdot-}$ , además de aumentar el tono vascular actuando directamente sobre la musculatura lisa vascular, reducen la vida media de algunos factores relajantes como  $PGI_2$  y NO, aumentando así las resistencias vasculares periféricas y elevando la presión.

Los AGPI reducen los niveles de presión arterial de manera dosis dependiente y proporcional a los valores tensionales previos, interviniendo a varios niveles. Se ha descrito que aumentan la síntesis de NO<sup>103,104</sup> y  $PGI_3$  (vasodilatador y potente antiagregante plaquetario) e inhiben la actividad de la ECA<sup>105</sup> y la formación de  $TXA_2$ <sup>106</sup> (potente vasoconstrictor y agregante plaquetario), además previenen el exagerado crecimiento de las células musculares lisas al actuar sobre la síntesis de TGF- $\beta$ <sup>107,108</sup>.

Estudios realizados con ácidos grasos  $\omega$ -3 en pacientes con HTA mostraron una reducción dosis-dependiente en su presión arterial mientras que no hubo efecto en pacientes normotensos<sup>109</sup>. Un meta-análisis<sup>110</sup> que engloba 31 estudios y un total de 1.356 pacientes mostró que 5,6 g/día de aceite de pescado redujo la presión arterial en torno a 3,4/2,0 mmHg (PAS/PAD). Otros estudios similares con dosis de 3 y 3,7 g/día de aceite de pescado y/o de oliva también mostraron eficacia en la reducción de la presión arterial de 5,5/3,5 mmHg en el primer caso y sólo de 2,1/1,6 mmHg en el segundo caso<sup>111,112</sup>. Esto muestra que los  $\omega$ -3 reducen la presión arterial elevada pero con una gran variabilidad en los resultados obtenidos respecto a las dosis de aceite de pescado ensayadas.

## Ácidos grasos poliinsaturados e hiperlipidemias

Como ya hemos comentado anteriormente, las células necesitan colesterol para numerosas funciones y lo consiguen por 2 vías: captándolo de las LDL circulantes en la sangre y de la síntesis *de novo* de colesterol en el hígado.

Para que las LDL descarguen el colesterol que contienen en su interior a las células, éstas deben estar provistas de receptores a los que se unen las apolipoproteínas que se encuentran en la superficie de las LDL. Para que la célula exprese dichos receptores existe un sistema de regulación en su interior el cual, a su vez, está controlado por retroalimentación negativa por las concentraciones intracelulares de colesterol y AGE/AGPI. La proteína que regula este proceso se denomina “proteína de unión al elemento regulador de esteroides” (SREBP, del inglés “sterol regulatory element binding protein”). Existen dos isoformas de esa proteína, SREBP-1 y SREBP-2 que entran al núcleo y se unen al elemento regulador de esteroides en el promotor de genes que codifica el receptor LDL y la hidroximetilglutaril Co-A sintetasa, activando su transcripción. Este proceso se bloquea cuando la célula ha integrado o sintetizado el colesterol suficiente. Se ha observado que los AGPI inhiben fundamentalmente a SREBP-1, mientras el efecto inhibitorio de colesterol se produce sobre SREBP-2<sup>113</sup>. Con ello se consigue una reducción en los niveles de colesterol al interrumpir su integración en la célula y su síntesis *de novo*.

El control de la homeostasis lipídica por parte de los  $\omega$ -3 también se debe a que éstos se unen al receptor- $\alpha$  activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\alpha$ , del inglés “proliferator-activated receptor- $\alpha$ ”) y al PPAR $\gamma$  induciendo respuestas fisiológicas tales como la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y la adipogénesis<sup>114</sup>.

Una revisión de estudios en pacientes concluyó que la ingesta de aproximadamente 4 g/día de  $\omega$ -3 reducen en torno a un 25-30% los TG plasmáticos, un 5-10% el LDLc e incrementa entre 1-3% el HDLc<sup>115</sup>.

Un estudio controlado randomizado que compara dos grupos de pacientes con hipertrigliceridemia persistente, uno tratado con simvastatina (10-40 mg/día) y 4 g/día de una mezcla de EPA y DHA (Omacor<sup>®</sup>) y otro con la misma dosis de simvastatina y un placebo, concluye que sólo los pacientes que recibieron Omacor<sup>®</sup> manifestaron una reducción del 20-30% en los TG plasmáticos y del 30-40% en las VLDLc<sup>116</sup>.

## **Ácidos grasos poliinsaturados y aterosclerosis**

La aterosclerosis cursa con inflamación sistémica de grado bajo, disfunción endotelial y niveles de colesterol elevados<sup>117,118</sup>. Las células endoteliales expresan moléculas de adhesión selectivas como la E-selectina, la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1) y la molécula 1 de adhesión a la célula vascular (VCAM-1), todas ellas dirigen las células inflamatorias (monocitos, macrófagos, ...) a la pared vascular. Sus formas solubles son el reflejo de la cantidad de moléculas expresadas en la superficie endotelial. Pacientes con eventos cardiovasculares o futuras ECV han mostrado elevadas concentraciones de estos marcadores inflamatorios<sup>119,120</sup>.

Las células sanas sintetizan y liberan cantidades adecuadas de NO, PGI<sub>1</sub>, PGI<sub>2</sub> y PGI<sub>3</sub> para prevenir la agregación plaquetaria y disminuir la expresión de moléculas de adhesión y la producción de citocinas proinflamatorias, como las interleucinas (IL) 1, 2 y 6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) evitando así la formación de la placa de ateroma.

Cuando a nivel vascular existe un aumento de radicales libres, éstos inactivan NO, PGI<sub>2</sub> y oxidan LDL iniciando el proceso aterosclerótico<sup>47</sup>. Además la producción de IL-1, IL-2, IL-6 y TNF- $\alpha$  está peor controlada y se induce un aumento de la producción de radicales libres por parte de monocitos, macrófagos y leucocitos<sup>121</sup>. Se ha demostrado que EPA/DHA aumentan la síntesis de NO endotelial y PGI<sub>2</sub> que son potentes antiagregantes plaquetarios y vasodilatadores<sup>122</sup>, suprimen la expresión de moléculas de adhesión<sup>123,124</sup> en la célula endotelial funcionando así como moléculas antiinflamatorias, inhiben la producción y secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ <sup>125</sup> actuando como reguladores directos de citocinas pro-inflamatorias y también inhiben la formación de radicales libres previniendo el estrés oxidativo<sup>126</sup>.



*OBJETIVOS*



Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados puede tener efecto protector frente a las enfermedades cardiovasculares reduciendo las tasas de mortalidad coronaria y la muerte súbita cardíaca.

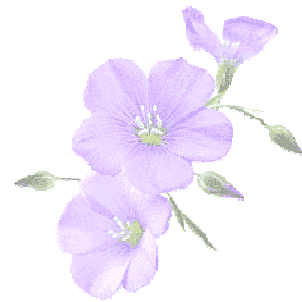
Dietas enriquecidas en aceites de pescado con alto contenido en ácidos grasos  $\omega$ -3, DHA y EPA, han demostrado múltiples efectos protectores a nivel cardiovascular entre los que destacan la reducción de los lípidos plasmáticos y de la HTA, tanto en modelos animales como en humanos. Otros efectos destacados son las propiedades antiinflamatorias, antiaterogénicas, antitrombóticas y antiarrítmicas. La alta prevalencia de todas estas patologías en la población general hace que una pequeña reducción en su incidencia de lugar a un considerable impacto en la salud de toda la población.

Por todo ello, nuestro objetivo general en este trabajo ha sido evaluar los efectos que la incorporación de Ometrix<sup>®</sup>, un preparado con alto contenido en ácidos grasos omega 3/6/9, a la dieta produce sobre la presión arterial, el perfil lipídico plasmático, la reactividad vascular y su morfometría, la histología hepática y el estrés oxidativo en ratas en situaciones experimentales diferentes:

1. Ratas espontáneamente hipertensas (SHR) que reciben simultáneamente una dieta hipercolesterolémica y Ometrix<sup>®</sup>, para comprobar si el preparado es capaz de evitar la elevación de los niveles de presión arterial y otras alteraciones asociadas a ella.
2. Ratas SHR con hipercolesterolemia establecida que reciben Ometrix<sup>®</sup>, para estudiar si el preparado es capaz de revertir los efectos de la hipertensión asociada a hipercolesterolemia.
3. Ratas normotensas que reciben simultáneamente una dieta hipercolesterolémica y Ometrix<sup>®</sup>, para estudiar si el preparado es capaz de evitar las alteraciones asociadas a la hipercolesterolemia.
4. Ratas normotensas con un estado de estrés oxidativo, para comprobar el posible efecto protector de Ometrix<sup>®</sup> sobre la excesiva producción de radicales libres.







*METODOLOGÍA*



En todos los estudios se han seguido las recomendaciones generales, tanto de la legislación Europea (a) como de la Española, (b) relativas a la protección de los animales de laboratorio utilizados para experimentación y otros fines científicos recogidas en las siguientes disposiciones legales:

- a) Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo 2003/65/CE de 22 de julio<sup>127</sup>.
- b) Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre<sup>128</sup>.

Se han utilizado ratas machos de 12 semanas de vida procedentes de la empresa Janvier Francia y del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (Nº de registro: P.A.E. SA-001). Se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $21\pm 2$  °C), humedad relativa (40-70%) y fotoperiodo (12 horas luz/12 horas oscuridad).

## 1.- Diseño experimental

Hemos realizado dos tipos de estudio:

1. Diseñado para valorar los efectos de Ometrix® sobre las alteraciones cardiovasculares provocadas por la hipercolesterolemia aislada o asociada a un estado hipertensivo.
2. Diseñado para valorar los efectos protectores de Ometrix® sobre el daño hepático agudo provocado por producción excesiva de radicales libres.

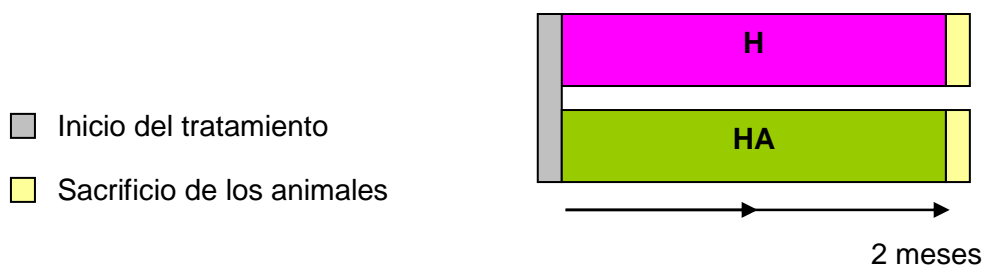
## ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS

Para llevar a cabo el **primer tipo de estudio** hemos utilizado ratas hipertensas y normotensas, a las que se les induce una hipercolesterolemia por la incorporación en la dieta de colesterol (1%) y ácido cólico (0,25%) (dieta 1). Los grupos de animales tratados además incluyen en su dieta una mezcla comercial de ácidos grasos mono y poliinsaturados (Ometrix®) al 10% (dieta 2). La composición de las dietas 1 y 2 utilizadas se detalla más adelante.

Los animales se distribuyen en diferentes grupos para valorar el efecto de Ometrix® en condiciones experimentales distintas:

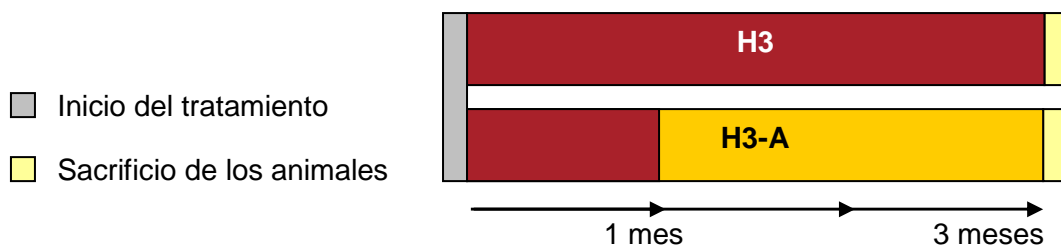
**GRUPO 1.** Para estudiar si Ometrix® es capaz de **prevenir** los efectos que produce la dieta hipercolesterolémica en ratas SHR tratadas durante dos meses los animales se distribuyen en dos lotes:

- **Lote H:** ratas SHR que se alimentan con dieta 1 (■)
- **Lote HA:** ratas SHR que se alimentan con dieta 2 (■)



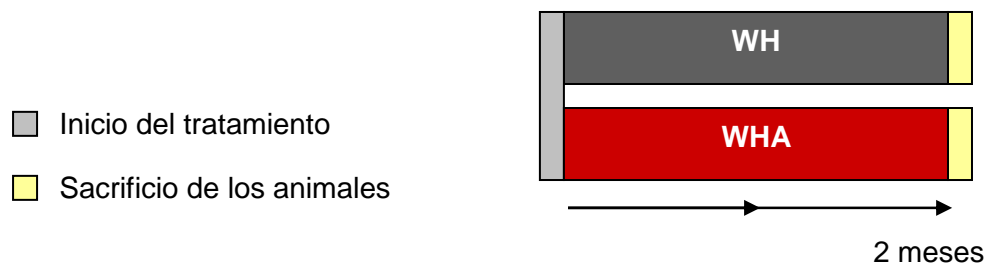
**GRUPO 2.** Para comprobar si Ometrix® **revierte** los efectos provocados cuando la hipercolesterolemia está establecida se lleva a cabo este estudio con ratas SHR alimentadas durante 1 mes con la dieta hipercolesterolémica y a continuación se dividen en 2 grupos:

- **Lote H3:** ratas SHR que se alimentan con dieta 1, durante 2 meses más (■)
- **Lote H3-A:** ratas SHR que se alimentan con dieta 2, los 2 meses siguientes (■)



**GRUPO 3.** Para comprobar el efecto de Ometrix® en ratas hipercolesterolémicas normotensas, hemos utilizado ratas Wistar tratadas durante 2 meses distribuidas en dos lotes:

- **Lote WH:** ratas Wistar que se alimentan con dieta 1 (■)
- **Lote WHA:** ratas Wistar que se alimentan con dieta 2 (■)



### Composición de las dietas

Las distintas dietas utilizadas en el estudio fueron elaboradas en nuestro laboratorio controlando las condiciones de luz y temperatura en la preparación, el secado y el mantenimiento de los piensos obtenidos. Se elaboran semanalmente y se mantienen a -20 °C para evitar procesos de degradación. Su composición se detalla a continuación:

	<b>Dieta 1</b>	<b>Dieta 2</b>
	<b>(g/kg)</b>	<b>(g/kg)</b>
Caseína	225	225
Almidón de patata	433,5	358,5
Sacarosa	273	248
α-Celulosa	31	31
Minerales	14	14
Vitaminas	10	10
DL-Metionina	1	1
Colesterol	10	10
Ácido cólico	2,5	2,5
Ometrix®	-	100

La composición detallada de la mezcla comercial de minerales, vitaminas y Ometrix® se muestra en las siguientes páginas.

<b>MINERALES</b>	<b>% en la mezcla</b>	<b>VITAMINAS</b>	<b>% en la mezcla</b>
Carbonato cálcico	35,7	Ácido nicotínico	0,3
Fosfato monopotásico	25,0	Pantotenato de D-calcio	0,16
Citrato potásico monohidratado	2,8	Piridoxina	0,07
Cloruro sódico	7,4	Tiamina	0,06
Sulfato potásico	4,7	Riboflavina	0,02
Óxido de magnesio	2,4	Ácido fólico	0,02
Citrato férrico	0,6	D-biotina	0,002
Carbonato de zinc	0,17	Vitamina B <sub>12</sub>	0,25
Carbonato magnésico	0,06	$\alpha$ -tocoferol	3
Carbonato de cobre	0,03	Palmitato de vitamina A	0,16
Yodato potásico	0,001	Vitamina D <sub>3</sub>	0,025
Selenato sódico	0,001	Filoquinona	0,008
Molibdato amónico	0,001	Azúcar	95,9
Metasilicato sódico	0,15		
Sulfato de potasio y cromo	0,03		
Cloruro de litio	0,002		
Ácido bórico	0,008		
Fluoruro sódico	0,006		
Carbonato de níquel	0,003		
Vanadato amónico	0,001		
Azúcar	20,9		

Caseína,  $\alpha$ -celulosa, DL-metionina y colesterol fueron suministrados por Sigma-Aldrich, el almidón de patata por Panreac, el ácido fólico por Fluka, los minerales y las vitaminas por ICN Biomedicals y Ometrix® por Nova diet S.A.

Para realizar el estudio se utilizó Ometrix<sup>®</sup>, que es un producto comercial elaborado a base de una mezcla de aceites de origen animal (salmón 41%) y vegetal (lino 32%, onagra 19%, oliva 1,4% y girasol 1,4%) rica en ácidos grasos omega de las series 3, 6 y 9 que incorpora un 0,45% de vitamina E para evitar los procesos de oxidación.

La composición de los distintos ácidos grasos determinada por un análisis cromatográfico es la siguiente:

	%		%
Mirístico (14:0)	3,41	$\alpha$ -linolénico (18:3)	18,03
Pentadecaenoico (15:0)	0,23	$\gamma$ -linolénico (18:3)	2,82
Palmítico (16:0)	11,78	Estearidónico (18:4)	1,15
Palmitoleico (16:1)	3,64	Aráquico (20:0)	0,21
Margárico (17:0)	0,15	Gadoleico (20:1)	0,51
Margaroleico (17:1)	0,77	Araquidónico (20:4)	0,34
Esteárico (18:0)	3,34	Eicosapentaenoico (20:5)	6,77
Oleico (18:1)	16,04	Behénico (22:0)	0,12
Linoleico (18:2)	26,13	Docosahexaenoico (22:6)	4,38

El contenido en ácidos grasos de la serie  $\omega$ -3 (ácidos  $\alpha$ -linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico) es de un 29%, la misma que de ácidos grasos  $\omega$ -6 (ácidos linoleico, araquidónico y  $\gamma$ -linolénico) y 16% de ácido oleico de la serie  $\omega$ -9. De manera que la relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 es 1.



## 2.- Estudios *in vivo*

Los animales utilizados en este trabajo se distribuyeron en un máximo de 3 por jaula de manera homogénea teniendo en cuenta su peso. Durante el periodo de estudio se controla semanalmente el peso corporal y la presión arterial, esta última siguiendo la metodología reflejada en el apartado 2.1 de esta memoria. Para conocer el perfil lipídico de los animales se realizaron extracciones de sangre del seno orbital del ojo al inicio y a lo largo del estudio mediante la metodología descrita en el apartado 5.

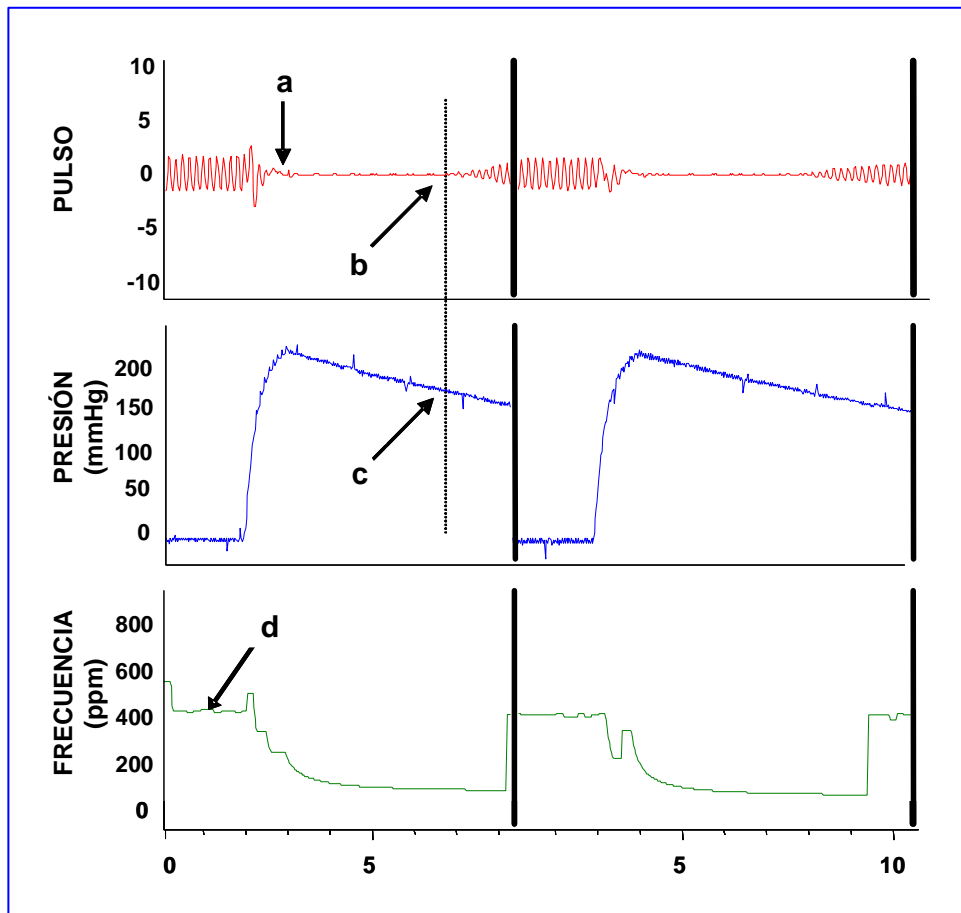
La comida y el agua fueron de acceso libre, diariamente se controló la ingesta y se retiró el sobrante de los piensos que contenían Ometrix<sup>®</sup>, para evitar la oxidación de los ácidos grasos.

### 2.1.- Control de presión arterial y frecuencia cardiaca

La presión arterial sistólica se mide en la arteria caudal, mediante un método incruento, con un equipo NIPREM 546 (Cibertec S.A., España). Este método tiene la ventaja de ser simple, reproducible, no traumático y permite trabajar con el animal despierto. Para obtener buenos resultados es conveniente habituar al animal a este tipo de manipulación antes de realizar las medidas definitivas.

El fundamento de la medida consiste en comprimir el tejido alrededor de la arteria de la cola, mediante un manguito neumático, hasta la oclusión completa de la arteria, un detector de infrarrojos colocado en la cola transforma la señal térmica en eléctrica que se monitoriza por medio de un sistema informático. Según se observa en la figura 9, la desaparición de la señal de pulso (**a**) permite afirmar que se ha producido la oclusión de la arteria. La disminución controlada de la presión en el manguito neumático se acompaña de la aparición de la onda de pulso en la cola (**b**). La presión neumática medida en ese punto es igual a la presión sistólica en la arteria (**c**). El registro de la onda pulsátil permite medir simultáneamente la frecuencia cardiaca a partir de este registro (**d**).

Los resultados de presión arterial se expresan en mmHg y los de frecuencia cardiaca en pulsaciones por minuto (ppm).



**Figura 9** - Registro original de presión arterial sistólica (mmHg) y frecuencia cardiaca (ppm).

Las determinaciones se realizan con los animales despiertos, situándolos en un cepo que deja la cola en libertad. Para captar mejor la señal, se procede a la dilatación de la arteria caudal aplicando calor en la cola durante un periodo aproximado de 5 minutos. A continuación se coloca el transductor y el manguito y se procede al registro de la presión arterial tomando como criterio válido la obtención de diez valores seguidos con una variación no superior a 10 mmHg.

Las determinaciones se realizan antes de iniciar los tratamientos y de forma periódica durante el tiempo que dura el estudio.

### 3.- Estudios *in vitro*

Al finalizar cada periodo de estudio, las ratas se anestesian con pentobarbital sódico a la dosis de 60 mg/kg por vía intraperitoneal y se procede a la colocación de una cánula (PE-50, Intramedic, EE.UU.) en la arteria carótida que nos permite perfundir el resto de los tejidos con solución nutritiva Krebs de la siguiente composición (mM): NaCl 118,7; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 1,2; glucosa 11,1 a pH 7,4 drenando la sangre y el líquido de perfusión de los tejidos mediante una incisión en la arteria femoral.

Posteriormente se preparan el mesenterio y el riñón izquierdo canulando respectivamente la arteria mesentérica y la renal. Se extraen el lecho vascular mesentérico, el riñón y la arteria aorta torácica para la realización de estudios de funcionalidad *in vitro*. También se extraen el corazón, el riñón derecho y el hígado que se pesan y se congelan a -80 °C para determinaciones posteriores.

#### 3.1.- Estudios de funcionalidad - Arteria aorta

Se utilizan baños para órgano aislado como el que se presenta en la figura 10. Poseen una doble pared de vidrio delimitando una cámara, que a su vez se encuentra conectada a un circuito cerrado por cuyo interior circula agua caliente mantenida a una temperatura constante de 37 °C, mediante una bomba (Tectron Bio, Selecta, España), que actúa al mismo tiempo como bomba, elemento calefactor y termostato. En el interior del baño se colocan 5 mL de Krebs que asegura la inmersión completa del tejido. Este contenido se evacúa a voluntad por una salida situada en la parte inferior e inmediatamente se rellena con solución nutritiva nueva. La oxigenación del tejido se realiza de manera controlada desde otro orificio en la parte inferior del baño por el cual se suministra mezcla carbógena (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, Air liquide, España).

El sistema de detección y registro consiste en transductores de fuerza isométricos, (modelo UF-1, Harvard Apparatus Inc., EE.UU.), conectados a un sistema computerizado PowerLab/800 para Windows (AD Instruments, Reino Unido).

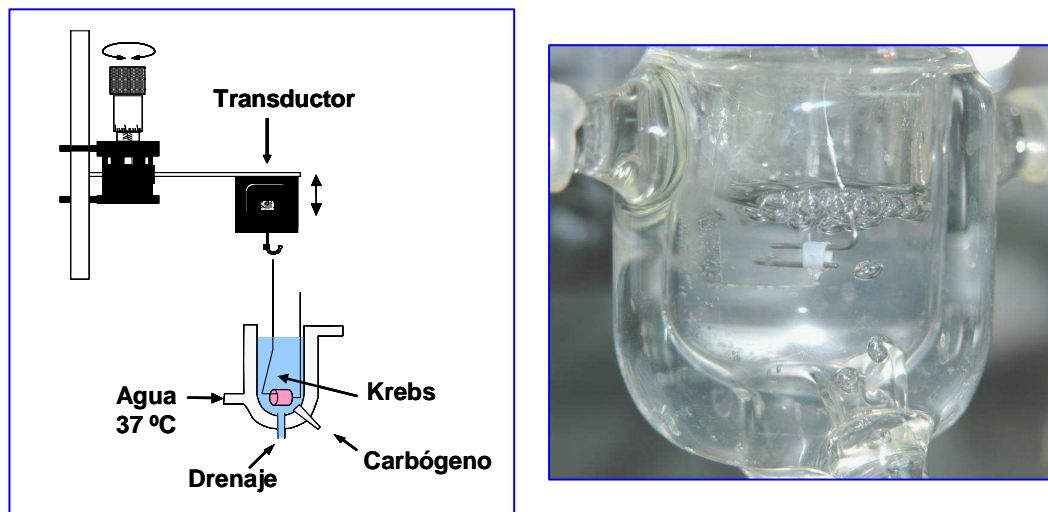
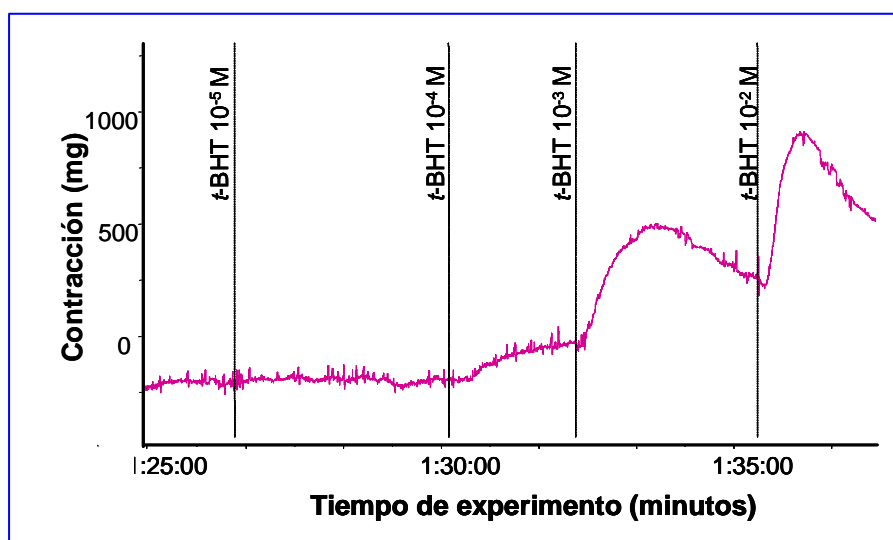


Figura 10 - Esquema y detalle de un baño de órganos para estudios *in vitro*.

Una vez extraída la arteria aorta se procede a la eliminación del tejido conectivo y grasa que la rodea, cortándola en segmentos de 3 mm mediante un sistema de cuchillas diseñado por nosotros. A través de la luz de cada segmento se introducen dos alambres finos de acero inoxidable, uno se fija al baño de órganos y el otro se conecta al transductor isométrico como se muestra en la figura 10. Los anillos se colocan en los baños de órganos, ajustando la tensión basal a 2 g. La preparación se deja estabilizar 60 minutos, renovando la solución nutritiva cada 30 minutos y reajustando la tensión a 2 g si fuera necesario. La funcionalidad del tejido se comprueba añadiendo al baño fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) y una vez alcanzada una meseta de contracción estable se añade acetilcolina (ACh,  $10^{-6}$  M) cuya respuesta relajante nos indica el estado funcional del endotelio<sup>129</sup>. A continuación se lavan repetidamente los anillos y tras 30 minutos (tiempo aproximado que tarda el anillo en recuperar la tensión basal) se renueva la solución, se reajusta la tensión si es necesario y se deja estabilizar la preparación durante 30 minutos más. En este momento se procede a la realización, en anillos diferentes, de los siguientes protocolos:

**a) Curvas concentración-respuesta al agente contracturante *t*-BHP**

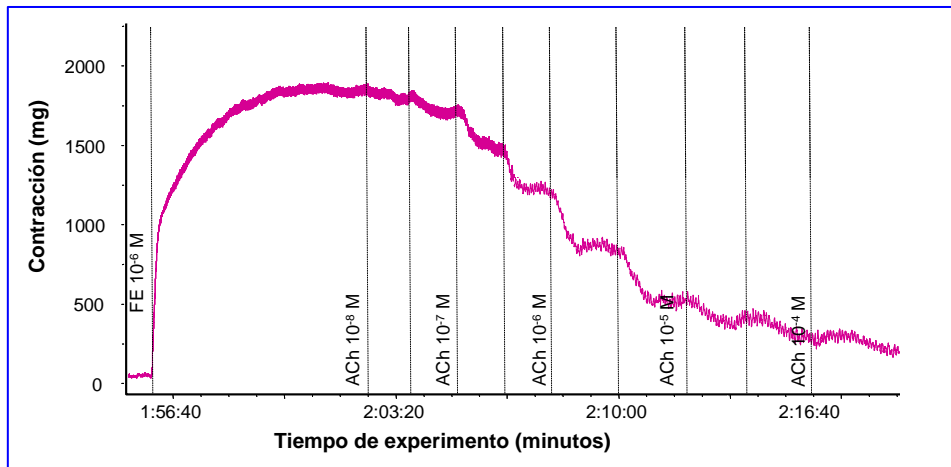
Se añaden al baño concentraciones crecientes de *terc*-butilhidroperóxido (*t*-BHP,  $10^{-5}$ - $10^{-2}$  M) para construir una curva concentración-respuesta acumulativa como la que se muestra en el siguiente registro original:



**Figura 11-** Registro original de una curva concentración-respuesta a *terc*-butilhidroperóxido (*t*-BHP,  $10^{-5}$ - $10^{-2}$  M) en aorta de rata.

**b) Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes**

Se realizan curvas acumulativas concentración-respuesta sobre la meseta de contracción estable obtenida con FE  $10^{-6}$  M con los siguientes agentes relajantes: ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), cuya acción relajante es dependiente del endotelio y nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M), cuya acción relajante no depende del estado del endotelio. En la figura 12 se muestra un registro original de una de estas curvas.



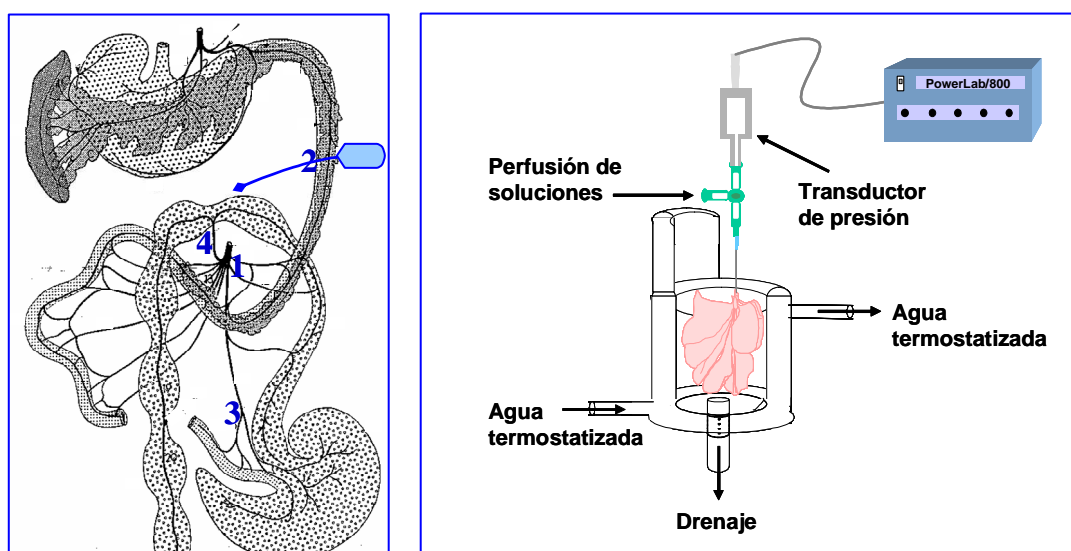
**Figura 12** - Registro original de una curva de relajación a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$  -  $10^{-4}$  M) en aorta de rata.

Tras la realización de las curvas los anillos se lavan repetidamente con Krebs hasta alcanzar la tensión basal y se mantienen en estabilización 1 hora. A continuación se repiten las curvas de ACh en anillos previamente incubados con **indometacina** (INDO,  $5 \times 10^{-6}$  M, 30 min) para determinar la participación de los mediadores producidos por la COX.

Para establecer la producción basal de NO, en algunos anillos se realiza una contracción con FE ( $10^{-6}$  M) y tras el lavado y posterior estabilización, se incuban estos anillos durante 30 minutos con **L-nitro arginina metil éster** (L-NAME,  $10^{-4}$  M) y posteriormente se repite la contracción con FE. La relación entre la contracción de FE antes y después de la incubación con L-NAME nos permite conocer la producción basal de NO que expresamos como biodisponibilidad de NO.

### 3.2.- Estudios de funcionalidad - Lecho vascular mesentérico

Una vez sacrificado el animal, el lecho vascular mesentérico se separa cuidadosamente del intestino y se aíslan y ligan las arterias pancreático-duodenal (2), ileocólica (3) y cólica media (4) y se canula la arteria mesentérica superior (1) con un catéter a través del cual se perfunde el lecho vascular mesentérico con suero heparinizado. Posteriormente se conecta, por una llave de tres vías, a un transductor de presión (Transpac® IV, modelo L969, Abbot Critical Care Systems, Irlanda) y a una bomba de perfusión (Masterflex L/S, Cole-Palmer, EE.UU.) como se muestra en la figura 13.



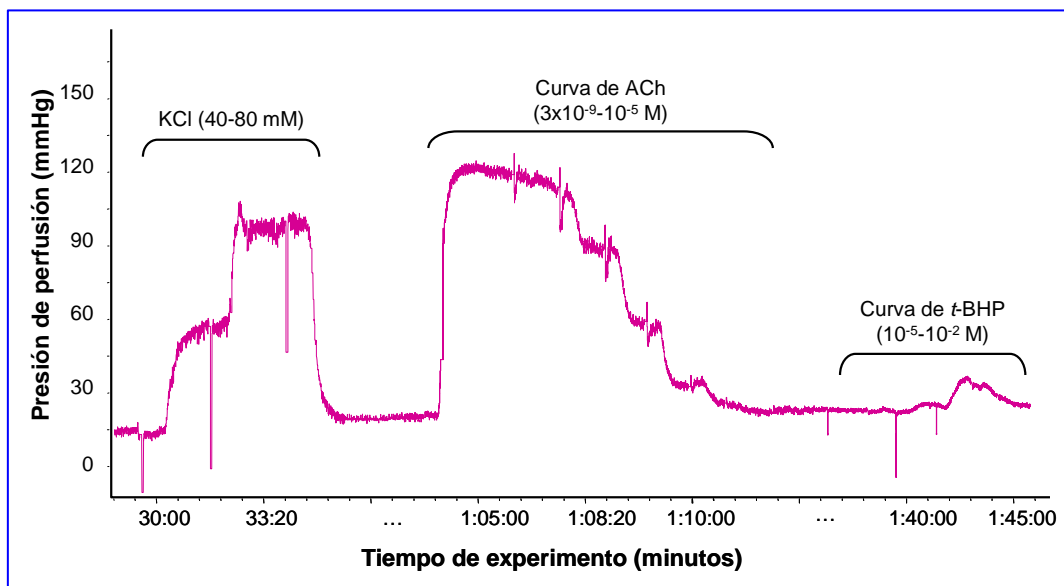
**Figura 13** - A la izquierda, esquema de la preparación del lecho vascular mesentérico. Arteria mesentérica superior (1), pancreático-duodenal (2), ileocólica (3) y cólica-media (4). A la derecha, baño de órganos, sistema de perfusión y transductor de presión para lecho vascular mesentérico.

La perfusión se realiza con solución Krebs gaseada con carbógeno a una temperatura de 37 °C y a un flujo constante de 3 mL/min. Los cambios de presión detectados por el transductor se registran con el sistema informático PowerLab/800 para Windows.

Después de 30 minutos de estabilización se mide la presión de perfusión basal y se comprueba la funcionalidad del tejido. Para ello se incorpora al líquido de perfusión KCl 40 mM, se espera hasta obtener una meseta de contracción estable y en este momento, se cambia la solución por otra que contiene KCl 80 mM. Una vez obtenida la nueva respuesta se cambia de nuevo el líquido de perfusión por solución Krebs para recuperar la presión basal.

Una vez recuperada la presión basal y transcurridos 30 minutos de estabilización se realizan curvas concentración-respuesta a ACh en preparaciones precontraídas con FE ( $10^{-5}$  M) en las que se van añadiendo concentraciones crecientes de ACh ( $3 \times 10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) al líquido de perfusión de forma acumulativa.

Para finalizar, y tras otros 30 minutos de estabilización perfundiendo Krebs, se realizan curvas concentración-respuesta con *t*-BHP ( $10^{-5}$ - $10^{-2}$  M) obteniendo un registro como el que se muestra a continuación:

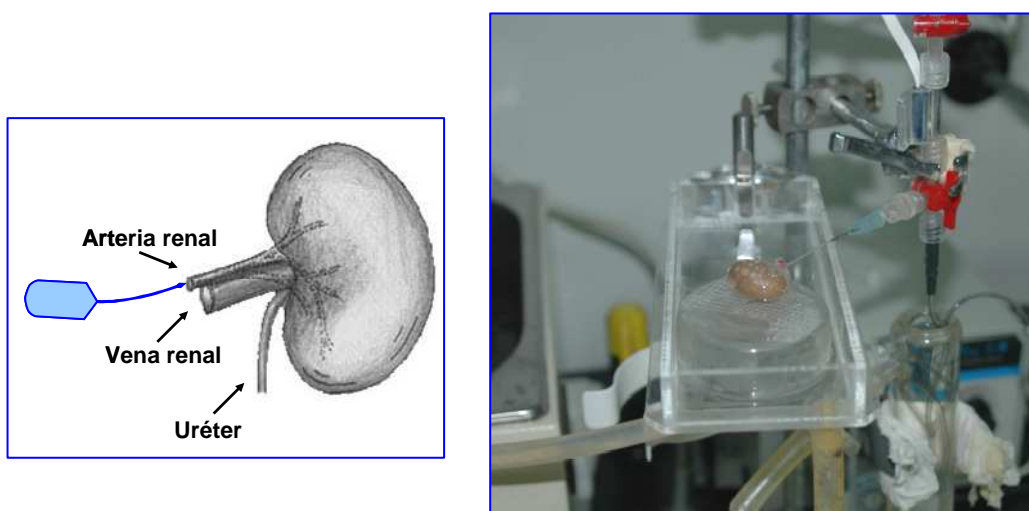


**Figura 14** - Registro original de las curvas concentración-respuesta con KCl, con acetilcolina (ACh) y con *terc*-butilhidroperóxido (*t*-BHP) en lecho vascular mesentérico en el orden en que se realizan durante el experimento.



### 3.3.- Estudios de funcionalidad - Riñón perfundido

Como se mencionó anteriormente, una vez sacrificado el animal, el riñón izquierdo se canula por la unión entre la arteria renal y la aorta abdominal y se extrae. El catéter introducido en la arteria renal permite la perfusión y el registro de cambios en la presión basal de perfusión mediante un sistema similar al utilizado para el lecho vascular mesentérico (Figura 15).



**Figura 15** - A la izquierda, esquema de la preparación y a la derecha, sistema de perfusión para el riñón.

Después de 20 minutos de estabilización se registra la presión de perfusión basal y se evalúa la respuesta contracturante a KCl (40 y 80 mM). Posteriormente se realizan curvas de relajación concentración-respuesta con ACh ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) siguiendo la metodología descrita para el lecho vascular mesentérico.

Tras un periodo de estabilización de 20 minutos, en algunas preparaciones se determina la respuesta contracturante de FE ( $10^{-6}$  M) en ausencia y después de la incubación con L-NAME ( $10^{-4}$  M, 30 min). La relación entre ambas respuestas nos indica la participación del NO en la respuesta contracturante que, como en el caso de las aortas, se expresa como biodisponibilidad de NO.

En otras preparaciones tras la estabilización se realizan curvas concentración-respuesta con *t*-BHP ( $10^{-5}$ - $10^{-2}$  M) iguales a las descritas para el lecho vascular mesentérico.

### **3.4.- Sustancias utilizadas**

En todas las preparaciones aisladas se utilizó solución nutritiva Krebs, preparada con componentes de calidad de análisis que se disuelven en agua calidad HPLC (Labconco-Water Pro, P.S., España).

Se preparan soluciones madre 0,1 M de los agonistas utilizados: cloruro de fenilefrina (Sigma), cloruro de acetilcolina (Sigma), nitroprusiato sódico dihidratado (Sigma), indometacina (Sigma) y L-nitro arginina metil éster (Sigma) que se congelan en alícuotas. La solución madre de superóxido dismutasa (Sigma) contenía 15.000 UI y también se congela en alícuotas. Las disoluciones utilizadas en los experimentos se preparan diariamente a partir de éstas. El KCl (4 M) (Panreac) se prepara semanalmente al igual que el *t*-BHP (0,1 M) (Sigma).

### **3.5.- Expresión de los resultados**

En aorta las respuestas de *t*-BHP se expresan como mg de contracción.

En lecho vascular mesentérico y renal la presión de perfusión basal se expresa en mmHg y la respuesta a KCl, FE y *t*-BHP como incremento respecto de la presión de perfusión basal (mmHg).

En todas las preparaciones la relajación provocada por ACh y NTP se expresa como % de relajación con respecto a la meseta de contracción estable obtenida con FE.

A partir de las curvas concentración-respuesta se obtiene el valor de efecto máximo ( $E_{max}$ ) y de  $pD_2$  (logaritmo cambiado de signo de la concentración del agonista que provoca el 50% del efecto máximo), mediante el ajuste a un modelo logístico no lineal utilizando el programa Graph-Pad Prism 4.0 (GRAPH-PAD software Inc., EE.UU.).

## **4.- Estudios morfométricos**

### **4.1.- Hipertrofia cardiaca y renal**

Como se indicó anteriormente, cuando se sacrifican los animales se extrae el corazón y el riñón derecho para establecer los índices de hipertrofia. Para ello el corazón se coloca inmediatamente en solución Krebs a 37 °C, aireada con carbógeno, a continuación se pasa a otra solución que contiene KCl 150 mM para detener el corazón en diástole. Se eliminan cuidadosamente los restos de tejido graso, se separan las aurículas, se diseccionan el ventrículo derecho y el izquierdo dejando el septum intraventricular como parte del ventrículo izquierdo<sup>130</sup>. Se elimina el exceso de líquido y se pesa. En el caso del riñón se eliminan los restos de tejido graso y el exceso de líquido y se pesa. La relación entre el peso del ventrículo izquierdo o del riñón y el peso corporal de cada animal nos da un índice que nos sirve para evaluar la hipertrofia cardiaca y renal respectivamente.

### **4.2.- Morfometría de aorta y arterias intrarrenales**

Las muestras se fijan en formol tamponado al 4%. Para las arterias de conductancia se fija un anillo de aorta y para las arterias de resistencia se fija la mitad del riñón derecho previamente seccionado longitudinalmente por su eje dorso-ventral. Posteriormente se prepara el tejido para su inclusión en parafina sintética utilizando un procesador automático de tejidos (Shandon-Elliot modelo Bench SCE 0400, Reino Unido) con un programa de cambio de alcoholes automático. Se realizan cortes seriados de estas muestras de 4-5 µm de grosor que se tiñen con hematoxilina-eosina para los cortes de aorta y rojo sirio para los de riñón, con el fin de aumentar el contraste y facilitar las medidas.

Una vez realizada la tinción, los cortes se observan al microscopio óptico (Olympus BX50), ajustando el objetivo para cada muestra de modo que obtengamos una visión completa de los anillos de aorta o de las arterias renales. Las imágenes se captan con la ayuda de una cámara de alta resolución (Olympus DP50) adaptada al sistema y posteriormente, utilizando el software Scion Image 4,2 para Windows (desarrollado por US National Institutes of Health y disponible en <http://rbs.info.nih.gov/nih-image/>) se miden los siguientes parámetros:

- $P_i$ , perímetro que delimita el lumen del vaso.
- $P_e$ , perímetro que delimita el margen exterior de la capa media.
- $A_i$ , área del lumen del vaso.
- $A_e$ , área delimitada por el margen exterior de la capa media.

Cada medida se realiza por duplicado por un mismo observador, dando como valor de medida la media entre ambos valores. A partir de estos valores se calculan los siguientes parámetros morfométricos:

- $R_i$ , radio del lumen del vaso. Se obtiene a partir de la fórmula  $P_i = 2\pi R_i$ .
- $R_e$ , radio externo del vaso ( $P_e = 2\pi R_e$ ).
- $L$ , lumen del vaso ( $L = \pi R_i^2$ )
- $W_m$ , grosor de la capa media que se obtiene por diferencia entre ambos radios ( $R_e - R_i$ ).
- $CSA_m$ , área seccional de la capa media que se obtiene por diferencia de áreas ( $A_e - A_i$ ).
- $W_m/L$ , relación entre el grosor de la capa media y el lumen del vaso.

Los resultados para el lumen y el grosor de la capa media se expresan en  $\mu\text{m}$  y para el área seccional de la capa media en  $\text{mm}^2$  en las aortas y en  $\mu\text{m}^2$  en las arterias intrarrenales.

### 4.3.- Hígado

El hígado también se extrae en el momento del sacrificio del animal, se eliminan los restos de tejido no hepático y el exceso de líquido y se pesa. De esta manera, teniendo en cuenta el peso del animal se establece una relación entre el peso del hígado y el peso corporal.

Para llevar a cabo los estudios histológicos se incluye una porción de hígado en parafina y se realizan cortes de 5  $\mu\text{m}$ , que se tiñen con hematoxilina-eosina siguiendo un protocolo similar al descrito para los vasos.

## 5.- Determinación del perfil lipídico en plasma

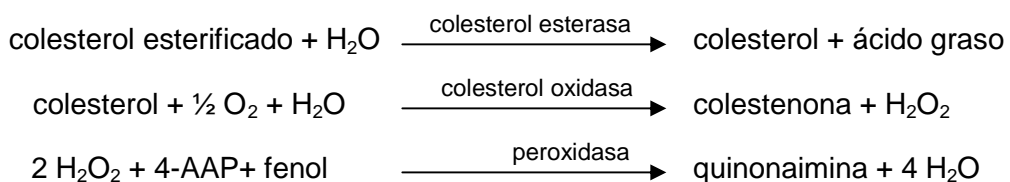
En los animales tratados durante 2 meses, tanto hipertensos (grupo 1) como normotensos (grupo 3), se determinan los niveles de lípidos plasmáticos antes de iniciar el tratamiento (semana 0) y al finalizar el mismo (semana 8).

En los animales hipertensos tratados durante 3 meses (grupo 2) las determinaciones se realizan antes de iniciar el periodo de estudio (semana 0), a las 4 semanas, para comprobar que todos los animales son hipercolesterolémicos y al finalizar el estudio (semana 12), inmediatamente antes del sacrificio.

En todos los casos la sangre se extrae del seno orbital del ojo, mediante un capilar heparinizado, se recoge sobre heparina (8 UI/mL de sangre) y se centrifuga a 2800 rpm durante 15 minutos. El plasma obtenido se congela a -80 °C hasta su análisis.

### Determinación de colesterol total

Se utiliza un preparado enzimático comercial (Cholesterol, BioSystems, España). Como se muestra en el esquema, el colesterol esterificado se transforma en colesterol libre por la acción de la colesterol esterasa. A continuación, el colesterol se oxida por la colesterol oxidasa formando colesteno y peróxido de hidrógeno, el cual, con fenol y 4-aminoantipirina (4-AAP), en presencia de peroxidasa, forma un compuesto coloreado (quinonaimina) que se cuantifica por espectrofotometría<sup>131</sup>.



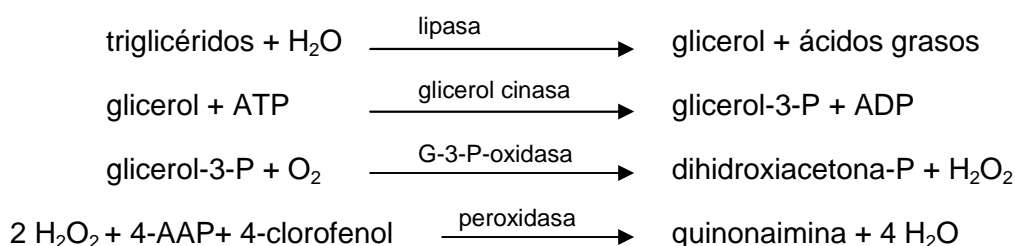
Una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de plasma se mezcla, en la cubeta del espectrofotómetro, con 1 mL del reactivo del kit y tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 500 nm. El mismo procedimiento

se realiza con el patrón de colesterol (200 mg/dL). La concentración en la muestra se expresa en mg/dL y se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Colesterol}_{\text{muestra}} = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{patrón}}} \times \text{Colesterol}_{\text{patrón}}$$

## Determinación de triglicéridos

Los TG presentes en las muestras se hidrolizan enzimáticamente mediante una lipasa formando glicerol y ácidos grasos. Este glicerol por medio de varias reacciones acopladas, descritas en el esquema que se muestra a continuación, da lugar al mismo compuesto coloreado que en el caso anterior cuantificándolo por espectrofotometría<sup>132</sup>. Esta determinación se realiza utilizando un kit comercial (Triglycerides, BioSystems, España).

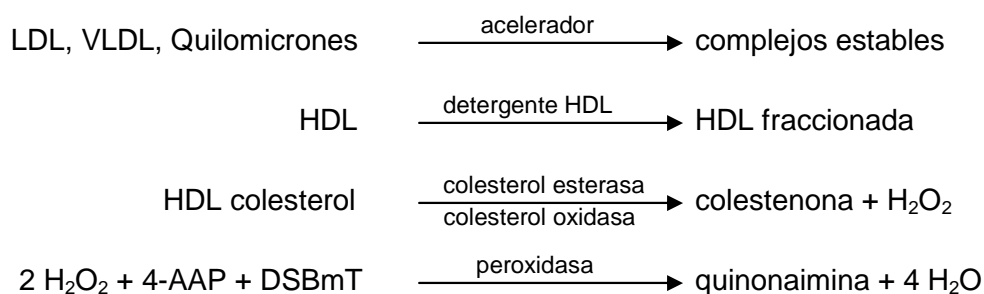


Una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de plasma se mezcla, en la cubeta del espectrofotómetro, con 1 mL del reactivo del kit y tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 500 nm. El mismo procedimiento se realiza con el patrón de TG (200 mg/dL). La concentración en la muestra se expresa en mg/dL y se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{TG}_{\text{muestra}} = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{patrón}}} \times \text{TG}_{\text{patrón}}$$

## Determinación de colesterol HDL

También para la determinación de HDLc se utilizó un preparado enzimático comercial (Cholesterol HDL, BioSystems, España), que permite la determinación del HDLc mediante un proceso en el que se solubilizan las HDL y se inhibe selectivamente las LDL, las VLDL y los quilomicrones de manera que la actividad enzimática posterior se lleva a cabo sólo sobre las HDL. El HDLc se cuantifica espectrofotométricamente mediante reacciones acopladas hasta la obtención de un cromógeno que absorbe a 600 nm<sup>133</sup> según se muestra a continuación:



En la primera reacción se forman los complejos estables de LDL, VLDL y quilomicrones. El peróxido de oxígeno generado en la muestra, se consume por la reacción con la peroxidasa y con N,N-bis(4-sulfobutil)-m-toluidina disodio (DSBmT) produciendo como resultado un producto incoloro.

En la segunda reacción el HDLc se solubiliza por medio del detergente específico que junto con la 4-AAP, el DBSmT y la peroxidasa generan el compuesto coloreado proporcional a la concentración de HDLc de la muestra.

Para la determinación se realizan 2 medidas, en la primera 7 µL de plasma se mezclan con 750 µL del reactivo A del kit, se incuba a 37 °C durante 5 minutos y se lee la absorbancia (A<sub>1</sub>) y la segunda medida (A<sub>2</sub>) se realiza tras añadir a la mezcla anterior 250 µL del reactivo B e incubar 5 minutos más.



La concentración de HDLc se expresa en mg/dL y se calcula a partir del incremento de absorbancia de la muestra y del patrón, teniendo en cuenta la concentración del patrón según la siguiente fórmula:

$$\text{HDLc}_{\text{muestra}} = \frac{(A_2 - A_1)_{\text{muestra}}}{(A_2 - A_1)_{\text{patrón}}} \times C_{\text{patrón}}$$

### **Determinación de colesterol LDL**

Se obtiene por un método indirecto mediante la relación existente entre el LDLc con el CT, el HDLc y los TG según la fórmula de Friedewald<sup>134</sup> y se expresa en mg/dL.

$$\text{LDLc} = \text{CT} - \text{HDLc} - \left( \frac{\text{TG}}{5} \right)$$

### **Determinación del índice aterogénico**

El índice aterogénico (IA) también se conoce como índice de riesgo cardiovascular, ya que nos orienta sobre la formación de las placas de ateroma en los vasos sanguíneos y con ello de la posibilidad de padecer accidentes vasculares como infarto o ictus entre otros. Existen varias formas para establecer este índice, nosotros hemos utilizado la relación entre la concentración de CT y la de HDLc.

$$\text{IA} = \frac{\text{CT}}{\text{HDLc}}$$

## **6.- Determinación de lípidos en hígado**

Además de la determinación plasmática de las distintas fracciones de lípidos también hemos determinado las concentraciones de CT y TG en hígado después de procesarlo como se indica a continuación:

Una porción del hígado, obtenido tras el sacrificio de los animales, se homogeneiza con suero fisiológico en proporción 1:5 (p:v) utilizando un homogeneizador (Pro 250, Pro Scientific Inc., EE.UU.). Siguiendo el método de Folch y cols.<sup>135</sup> el homogenado se somete a un proceso de extracción con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v:v) y el extracto se lleva a sequedad a temperatura ambiente en un concentrador de muestras a vacío (Thermo Savant, EE.UU.) equipado con una trampa de frío (RVT400) y una bomba de vacío (OFP400). Posteriormente el residuo se redisuelve con alcohol isopropílico y se realizan las determinaciones de CT y TG utilizando los reactivos comerciales y procedimientos descritos para el plasma. Los resultados se expresan en mg/g de hígado.

## 7.- Indicadores de estrés oxidativo

### 7.1.- Peroxidación lipídica

En el organismo, como consecuencia del metabolismo celular, se producen radicales libres que pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. La determinación de esta lipoperoxidación se puede llevar a cabo por la medida de los aldehídos reactivos, formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos, siendo el malonildialdehído (MDA) el más abundante obtenido en dicha degradación. El método del TBARS (especies reactivas del ácido tiobarbitúrico) es el más utilizado para medir la peroxidación lipídica, se basa en la capacidad del MDA para reaccionar a pH ácido y alta temperatura con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un producto coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente.

En **plasma** los niveles de MDA se determinaron siguiendo el método descrito por Ohkawa y cols.<sup>136</sup> con algunas modificaciones. Una alícuota de 250  $\mu\text{L}$  de plasma se mezcla a partes iguales con suero fisiológico y con 1 mL de una solución formada por: ácido tricloroacético (15%), TBA (0,37%) y ácido clorhídrico (0,25 N). Después de incubar 30 minutos a 90 °C, se centrifuga a 3000 rpm durante 25 minutos, se recoge el sobrenadante y se lee la absorbancia a 535 nm.

Para calcular la concentración plasmática de MDA se utiliza su coeficiente de extinción molar, que tiene un valor de  $1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Los resultados se expresan en  $\mu\text{M}$ .

En **hígado** los niveles de MDA se miden siguiendo la técnica descrita por Zingarelli y cols.<sup>137</sup>. Se utiliza el sobrenadante obtenido tras la homogeneización y centrifugación (10 minutos a 4000 rpm) de una porción de tejido diluida con KCl (1,15%) en proporción 1:6 (p:v). A 100  $\mu\text{L}$  de este sobrenadante se le añaden 200  $\mu\text{L}$  de sulfato de laurilo (8,1%), 1500  $\mu\text{L}$  de ácido acético (20%), 1500  $\mu\text{L}$  de TBA (0,8%) y 700  $\mu\text{L}$  de agua. Tras la incubación a 95 °C durante 1 hora se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos y se lee la absorbancia a 532 nm.

Para el cálculo de la concentración de MDA se realiza una curva patrón con 1,1,3,3-tetrametoxipropano (0,1-5  $\mu\text{M}$ ). Los resultados se expresan en nmol/g hígado.

## 7.2.- Cuantificación de glutatión

El GSH es el principal antioxidante no enzimático del organismo de manera que inhibe, bloquea o amortigua los efectos producidos por los radicales libres. El hígado es el órgano que más influye en su síntesis, consumo, almacenamiento y transporte hacia el plasma y la bilis.

Como ya hemos mencionado en el proceso de eliminación de lipoperóxidos se forma GSSG tras la unión de dos moléculas de GSH que ceden su H<sup>+</sup> para estabilizarlos y así poder ser eliminados posteriormente. El GSH se recupera gracias a la enzima GR con consumo de NADPH.

Tietze<sup>138</sup> desarrolló por primera vez un método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa de glutatión total (GS=GSH+GSSG). Para ello se utiliza un método enzimático en el que el reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico o DTNB) se reduce por el grupo tiol del GSH de la muestra dando lugar al compuesto coloreado ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB). Para que el GSSG presente en la muestra reaccione con el DTNB, previamente debe reducirse por el NADPH en presencia de GR como se muestra en el siguiente esquema:



Posteriormente Griffith<sup>139</sup> modificó este método para cuantificar sólo el GSSG. La muestra se trata, al menos una hora, con 2-vinil-piridina que retira de manera selectiva el GSH presente. Así la coloración obtenida únicamente se deberá a la reacción del GSSG, recuperado en forma de GSH, con el DTNB.

La concentración de GS o GSSG se determina mediante una recta de calibrado preparada con concentraciones conocidas de GSH. Todos los ensayos se realizan a temperatura controlada de 30 °C.

El estado oxidativo o estado redox del tejido se cuantifica relacionando la forma reducida y oxidada del glutatión según la ecuación:

$$\text{Estado redox} = \frac{\text{GS} - 2 \text{GSSG}}{\text{GSSG}}$$

La determinación en **sangre** se lleva a cabo en una muestra extraída justo antes del sacrificio de los animales y recogida sobre heparina, se agita vigorosamente en vortex para provocar el lisado inmediato de los eritrocitos y a continuación se congela a -80 °C hasta la determinación de GS. Otra muestra de sangre se coloca en un tubo eppendorf que contiene 2-vinil-piridina y de la misma manera se agita en vortex y se congela hasta la determinación de GSSG.

En el momento de la determinación se descongelan las muestras y se les añade HCl (0,01N) en proporción 1:8 (v:v) para determinar GS y 1:4 (v:v) para GSSG, se agitan y se centrifugan a 12000 rpm durante 10 minutos. Para la determinación de GS, 10 µL del sobrenadante se mezclan con 3 mL de una solución compuesta por tampón fosfato potásico (100 mM) y EDTA (17,5 mM) a pH 7,5 y para la de GSSG con 1,4 mL de la misma solución a pH 6,5.

Para llevar a cabo las determinaciones se mezclan volúmenes iguales de muestra, DTNB (10 mM), NADPH (1,1 mM) y GR (0,5 U) y se monitoriza la velocidad de formación del TNB, detectable a 412 nm, durante 4 minutos. Las concentraciones de GS y de GSSG en sangre se expresan en µM.

Las muestras de **hígado** se desproteinizan por homogeneización con ácido tricloroacético (5%) en proporción 1:20 (p:v). Posteriormente se centrifugan a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se somete a un proceso de eliminación de grasas por extracción con éter dietílico. Una vez eliminadas, 50 µL de la muestra se mezclan con 10 mL de HCl (0,01 N) para la determinación de GS o con 450 µL de una solución compuesta por tampón fosfato sódico (100 mM), EDTA (6 mM) y 2-vinil-piridina a pH 7,5 para la determinación de la fracción oxidada de glutatión.

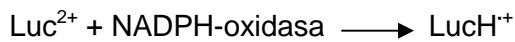
Para las determinaciones se toma una alícuota de 200 µL de muestra y se mezcla con 700 µL de NADPH (0,3 mM), 100 µL de DTNB (6 mM) y 10 µL de GR (0,5 U), en esta ocasión la monitorización se realiza durante 5 minutos. Los resultados se expresan en µmoles/g de hígado.

### 7.3.- Detección del anión superóxido en aorta

Numerosos estudios sugieren que la enzima NAD(P)H oxidasa puede ser la responsable de la producción excesiva de  $O_2^{\cdot -}$  <sup>140</sup> y que la activación de esta fuente de  $O_2^{\cdot -}$  en los vasos sanguíneos puede dar lugar a disfunción endotelial al reducir la biodisponibilidad de NO. Este mecanismo juega un papel importante en el origen de las ECV en diversas condiciones fisiopatológicas.

Con el fin de evaluar el posible efecto antioxidante de Ometrix<sup>®</sup> determinamos la producción de  $O_2^{\cdot -}$  en aorta. Este anión se cuantifica mediante quimioluminiscencia con lucigenina.

El mecanismo de reacción requiere la reducción inicial de un electrón de la lucigenina dicatiónica ( $Luc^{2+}$ ) dando lugar a un radical monocatiónico ( $LucH^+$ ). El radical formado reacciona con  $O_2^{\cdot -}$  dando lugar a dioxetano. La descomposición espontánea del dioxetano inestable da lugar a la formación de acridona electrónicamente excitada cuya vuelta al estado de equilibrio se ve acompañada por la emisión de luz como muestran las siguientes reacciones:



La determinación se lleva a cabo en anillos de arteria aorta extraída del animal en el momento del sacrificio. Los anillos se incuban durante 30 minutos a 37 °C en una solución tampón pH 7.4 de la siguiente composición (mM): NaCl, 119; HEPES, 20;  $MgSO_4$ , 1; KCl, 4,6;  $KH_2PO_4$ , 0,4;  $Na_2HPO_4$ , 0,15;  $NaHCO_3$ , 5;  $CaCl_2$ , 1,2; glucosa, 5,5, aireada con carbógeno y en presencia de dietilditiocarbamato (DDC, 0,5 M) para inhibir la SOD. A continuación los anillos se colocan en un tubo especial para luminómetro que contiene solución tampón con lucigenina (5  $\mu$ M) y se lee la quimioluminiscencia en un luminómetro (LB-9507 LUMAT, Berthold Technologies, Alemania). Una vez realizada esta lectura, se añade tirón (1 M), que es capaz de eliminar los  $O_2^{\cdot -}$ , para hacer una segunda lectura y tener por diferencia la señal específica del anión superóxido. En algunos anillos la producción de  $O_2^{\cdot -}$  se estimula mediante la incorporación de NADPH ( $10^{-4}$  M). Finalizado el procedimiento los anillos utilizados se secan y se pesan para expresar los resultados como

unidades relativas de luminiscencia por minuto y por miligramo de aorta (URL/min/mg).

#### **7.4.- Actividad de las enzimas antioxidantes en hígado**

El sistema antioxidante enzimático constituye la primera y más eficaz línea de defensa contra los radicales libres. Está integrado por tres enzimas principales, la SOD, la CAT y la G-Px, que funcionan en cadena para desactivar selectivamente las ERO. Otras enzimas como la GR y la GST colaboran de forma paralela en el proceso de detoxificación de ERO.

##### **Preparación de las muestras**

Tras perfundir el animal con suero heparinizado se extrae el hígado y una porción del lóbulo mayor se homogeneiza en proporción 1:4 (p:v) con una disolución de tampón fosfato potásico (100 mM) y EDTA (1 mM) a pH 7,5. Una parte de este homogenado lo utilizamos para determinar la actividad enzimática de CAT y GST. El resto se centrifuga a 12000 rpm y, en el sobrenadante, se determina la actividad de SOD, G-Px y GR. Ambas fracciones se congelan a -80 °C hasta su análisis.

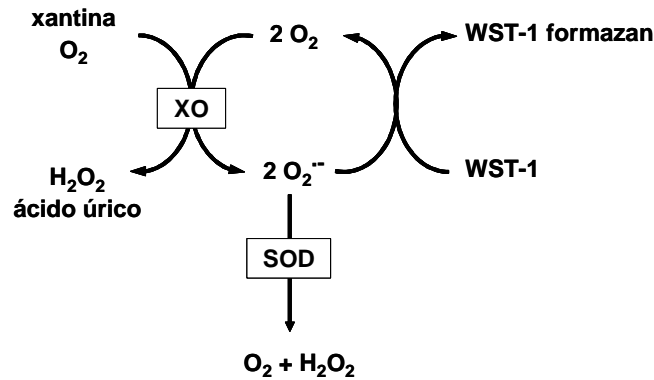
Además se determina la cantidad de proteínas de cada muestra por el método de Bradford<sup>141</sup>, utilizando un preparado comercial (Protein Assay, Bio-Rad, Alemania).

##### **Determinación de la actividad de superóxido dismutasa**

La SOD es una de las enzimas más importantes del sistema de defensa antioxidante del organismo, se encarga de la dismutación del anión  $O_2^{\cdot -}$  a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular<sup>74</sup>.

Para determinar la actividad de SOD se usa un kit comercial (SOD determination Kit, Fluka, España) que emplea XO para formar radicales  $O_2^{\cdot -}$ , que pueden desaparecer por acción de la SOD o reaccionar con la sal de tetrazolio

soluble (WST-1) dando lugar al compuesto coloreado WST-1 formazan según muestra el siguiente esquema<sup>142</sup>:



La determinación se realiza usando una placa multipocillos en la que se hacen 3 tipos de blancos para cada muestra, el blanco 1 cuantifica la actividad máxima de la enzima XO; con el blanco 2 se cuantifica la cantidad de O<sub>2</sub><sup>-•</sup> de la muestra y con el blanco 3 se cuantifica la actividad residual de los reactivos. En la tabla que se muestra a continuación, se reflejan los volúmenes de cada reactivo en cada caso. La placa se incuba durante 20 minutos a 37 °C y posteriormente se mide la absorbancia a 450 nm.

	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Muestra	20 µL		20 µL	
Agua bidestilada		20 µL		20 µL
Solución de trabajo	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Solución enzimática	20 µL	20 µL		
Tampón			20 µL	20 µL

La solución de trabajo contiene el cromógeno y la solución enzimática contiene XO.



Se determina la inhibición de la formación del compuesto coloreado (WST-1 formazán), la actividad de la SOD se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\left( \frac{(\text{Blanco 1} - \text{Blanco 3}) - (\text{Muestra} - \text{Blanco 2})}{(\text{Blanco 1} - \text{Blanco 3})} \right) \times 100$$

Los resultados se expresan como % de inhibición de la actividad de XO, en relación a los mg de proteína de la muestra.

### **Determinación de la actividad de catalasa**

Esta enzima cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno<sup>75</sup>. El peróxido de hidrógeno se forma principalmente como producto de la dismutación del anión  $\text{O}_2^-$  por la SOD. La eliminación del peróxido de hidrógeno del interior de la célula mejora la protección frente al daño oxidativo.

Se realiza el seguimiento espectrofotométrico a 240 nm de la desaparición de peróxido de hidrógeno durante 30 segundos utilizando un preparado comercial (Catalase assay, Sigma, España). Se mezcla una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  del homogenado con 195  $\mu\text{L}$  de la solución tampón incluida en el kit y con 200  $\mu\text{L}$  de una solución que contiene peróxido de hidrógeno (10 mM).

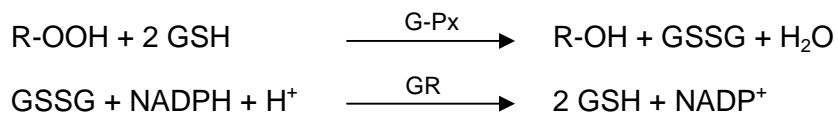
Una unidad enzimática de catalasa descompone 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrógeno por minuto, a pH 7,0 y 25 °C utilizando un sustrato de peróxido de hidrógeno (50 mM). Los resultados se expresan como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

### **Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa**

La G-Px cataliza la detoxificación de hidroperóxidos de distintas procedencias, tanto peróxido de hidrógeno como peróxidos orgánicos (R-OOH), a sus correspondientes alcoholes estables y a  $\text{H}_2\text{O}$  consumiendo glutatión reducido. Así contribuye a la protección de las células frente al daño oxidativo.

Como ya hemos comentado existen al menos 5 isoenzimas de G-Px en mamíferos que se expresan en distintos niveles según el tejido. Cada una tiene diferentes afinidades según el tipo de peróxido que elimine pero la diferencia más notable es que la isoforma G-Px5 es independiente de selenio y no reacciona con el peróxido de hidrógeno lo que permite su determinación aislada del resto de G-Px al utilizar hidroperóxido de cumeno como activador de la reacción.

La actividad de la G-Px no dependiente de selenio se determina mediante un método indirecto basado en el propuesto por Lawrence y cols.<sup>76</sup>. La reacción que cataliza esta enzima produce la oxidación de GSH formando GSSG, a esta reacción se acopla la de recuperación de GSH por la GR en la que se consume NADPH. Así el seguimiento de la desaparición de NADPH a 340 nm durante 4 minutos se relaciona con la actividad de la G-Px no dependiente de selenio. Las reacciones descritas se muestran en el esquema siguiente:



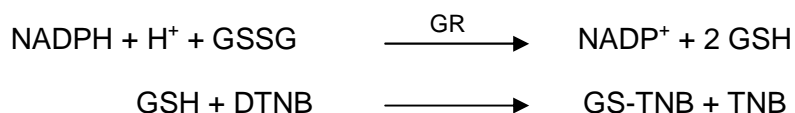
Una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  de muestra se mezcla en una cubeta con 100  $\mu\text{L}$  de hidroperóxido de cumeno (1,5 mM) y con 875  $\mu\text{L}$  de una solución compuesta por tampón fosfato sódico (50 mM), EDTA-Na (1 mM), azida sódica (1 mM), GR (1 U/mL), NADPH (0,2 mM) y GSH (1 mM) y se realiza el seguimiento de la desaparición del NADPH.

Una unidad de G-Px se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto a pH 8,0 y 25  $^{\circ}\text{C}$ . Los resultados se expresan como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína.

## Determinación de la actividad de glutatión reductasa

La GR es la enzima que cataliza la reducción de GSSG a GSH con consumo de NADPH. El GSH es sustrato para la G-Px y la GST y además actúa como antioxidante no enzimático.

En esta ocasión el kit Glutathione reductase assay (Sigma, España), nos permite medir espectrofotométricamente la actividad de la GR. Se mide el incremento de la absorbancia producida por la reducción del DTNB a TNB compuesto que se detecta a 412 nm<sup>77</sup>. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



En una cubeta se mezclan 50  $\mu\text{L}$  de muestra, 500  $\mu\text{L}$  de GSSG, 100  $\mu\text{L}$  de una solución tampón incluida en el kit, 250  $\mu\text{L}$  de DTNB (3 mM) y 50  $\mu\text{L}$  de NADPH (2 mM) y se realiza el seguimiento de la formación de TNB durante 3 minutos.

Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1  $\mu\text{mol}$  de DTNB a TNB en un minuto a pH 7,5 y 25  $^{\circ}\text{C}$ . Los resultados se expresan como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

## Determinación de la actividad de glutatión S-transferasa

Las glutatión S-transferasas son un grupo de enzimas vitales en la detoxificación de numerosos xenobióticos. Estas enzimas, mediante la conjugación de grupos tiol provenientes del glutatión con xenobióticos electrofílicos, protegen a las células frente a los efectos mutagénicos, carcinogénicos y tóxicos de los agentes externos<sup>78</sup>.

Al igual que para otras enzimas, utilizamos un kit comercial (Glutathione S-Transferase assay, Sigma, España). El método se basa en que esta enzima cataliza la formación del conjugado dinitrobenzoico-glutatión (GS-DNB) a partir del sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), utilizando como donador del grupo tiol el GSH. La aparición de este conjugado produce un incremento en la absorbancia a 340 nm que se registra, después de 1 minuto de estabilización, a lo largo de 5 minutos<sup>143</sup>.



A una alícuota de 4  $\mu\text{L}$  de muestra se le añaden, en una cubeta, 392  $\mu\text{L}$  de una solución tampón fosfato, 4  $\mu\text{L}$  de GSH (200 mM) y 4  $\mu\text{L}$  de CDNB (100 mM) y, tras el minuto de estabilización, se realiza el seguimiento espectrofotométrico de la formación del conjugado.

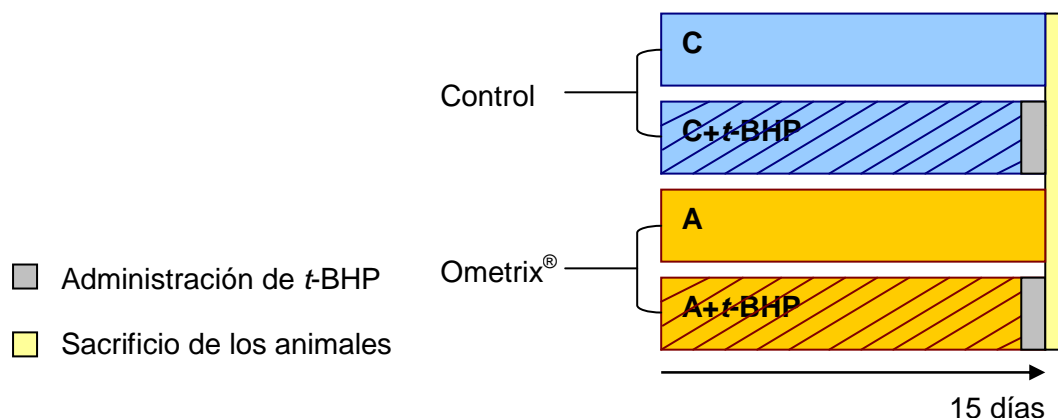
Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de GS-DNB por minuto a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Los resultados se expresan como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína.

## ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS WISTAR CON DAÑO HEPÁTICO AGUDO

Para llevar a cabo el **segundo estudio** y evaluar los posibles efectos antioxidantes de Ometrix®, se utilizó un modelo que usa *terc*-butilhidroperóxido (*t*-BHP) como compuesto que produce *in situ* gran cantidad de radicales libres y origina toxicidad aguda a nivel hepático<sup>144</sup>. El *t*-BHP se administra en una única dosis, 18 horas antes de sacrificar a los animales. Para el ensayo se utilizan ratas Wistar de 12 semanas, que se tratan durante 15 días con una dosis diaria de Ometrix® (5 g/kg) por vía oral mediante sonda gástrica. Un grupo de animales no tratados se utiliza como control. Al finalizar este periodo la mitad de los animales de cada grupo recibe la dosis de *t*-BHP (1,4 mmol/kg, vía i.p.).

Los animales se distribuyeron en cuatro lotes:

- **Lote C:** ratas Wistar alimentadas con dieta estándar.
- **Lote C+*t*-BHP:** ratas Wistar alimentadas con dieta estándar y que reciben una inyección de *t*-BHP antes del sacrificio.
- **Lote A:** ratas Wistar alimentadas con dieta estándar y Ometrix®.
- **Lote A+*t*-BHP:** ratas Wistar alimentadas con dieta estándar, Ometrix® y que reciben una inyección de *t*-BHP antes del sacrificio.



Todos los animales se distribuyeron en jaulas de manera homogénea teniendo en cuenta su peso. Cada jaula contenía como máximo 3 ratas que tenían libre acceso al pienso (Harlan dieta global 2014 para roedores) y al agua. Ometrix® se administró a los animales diariamente. El *t*-BHP se preparó en suero fisiológico justo antes de su administración.

El día del sacrificio se extrae una muestra de sangre sobre heparina una parte se utiliza para la determinación de GS y GSSG según la metodología utilizada en el apartado 7.2. y otra parte se centrifuga y en el plasma obtenido se determina la actividad de diversas enzimas marcadores del daño hepático.

Tras perfundir al animal con suero fisiológico heparinizado se extraen la arteria aorta, para medir la producción de  $O_2^{\cdot -}$  mediante la metodología ya descrita en el apartado 7.3. y el hígado, para determinar la actividad de las enzimas SOD, CAT, G-Px, GR y GST siguiendo la metodología del apartado 7.4. de esta memoria.

Para determinar si existen modificaciones a nivel estructural en el hígado una porción de éste se incluye en parafina y se realizan cortes histológicos de 5  $\mu$ m que se tiñen con hematoxilina-eosina siguiendo un protocolo similar al descrito en el apartado 4.2.

## 1.- Actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático agudo

La elevación de transaminasas y fosfatasa alcalina en plasma son consideradas indicadores fiables de la aparición de daño hepático. El daño en los hepatocitos produce alteraciones en el transporte y en la permeabilidad de la membrana produciendo, por una parte, descensos en los niveles de aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) en hígado y por otra, incrementos en su actividad a nivel plasmático<sup>145</sup>.

### Preparación de la muestra de plasma

Para la determinación de estas enzimas se utilizaron muestras de plasma fresco obtenido por centrifugación en frío a 2800 rpm durante 15 minutos, de sangre recién extraída y recogida sobre heparina (8 UI/mL de sangre).

### Determinación de la actividad ALT

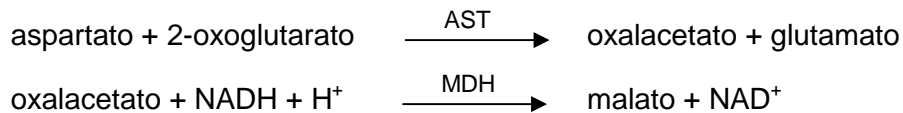
La ALT cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato, formando piruvato y glutamato. La actividad de la enzima se determina, empleando la reacción acoplada de la LDH, a partir de la velocidad de desaparición del NADH midiendo la absorbancia a 340 nm<sup>146</sup>.



Hemos utilizado el preparado enzimático comercial Alanine aminotransferase (BioSystems, España). Después de mezclar 1 mL de reactivo y 50  $\mu$ L de plasma se mide la absorbancia (340 nm) una vez cada minuto durante 4 minutos. Los resultados se expresan en unidades enzimáticas por litro (U/L).

## Determinación de la actividad AST

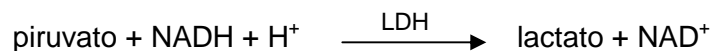
La AST cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato. La actividad de la enzima se determina, empleando la reacción acoplada de la malato deshidrogenasa (MDH), a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm<sup>147</sup>.



En esta ocasión hemos utilizado el kit Aspartate aminotransferase (BioSystems, España). Al igual que para la ALT, después de mezclar 1 mL de reactivo y 50 µL de plasma se mide la absorbancia (340 nm) una vez cada minuto durante 4 minutos. Los resultados se expresan en U/L.

## Determinación de la actividad LDH

La LDH cataliza la reducción del piruvato por NADH, obteniéndose lactato y NAD<sup>+</sup>. La actividad de la enzima se determina a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm<sup>148</sup>.



La determinación se lleva a cabo con el kit Lactate dehydrogenase (BioSystems, España). Se mezcla 1 mL de reactivo y 20 µL de plasma y se hace el seguimiento de la desaparición del NADH durante tres minutos y medio, tomando los valores de absorbancia (340 nm), a los 30 segundos del inicio de la reacción y posteriormente cada minuto hasta finalizar el tiempo. Los resultados se expresan en U/L.



## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Todos los resultados que se reflejan en esta memoria se expresan como media aritmética  $\pm$  el EEM de un mínimo de 5 experimentos. Para comparar los valores obtenidos entre los diferentes grupos se emplea el test de "t" de Student, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ , excepto en las comparaciones entre curvas (estudios de funcionalidad vascular) para las que se utilizó el test "F" sobre el ajuste de las curvas a un modelo logístico no lineal mediante el programa Graph-Pad Prism 4.0 considerándose significativas cuando  $p < 0,05$ .





*RESULTADOS*



## ESTUDIOS PRELIMINARES

Antes de iniciar el estudio con Ometrix<sup>®</sup> quisimos valorar la influencia de la dieta hipercolesterolémica durante 2 meses en algunos de los parámetros más representativos de nuestro estudio como son la PAS, el perfil lipídico plasmático y la respuesta relajante endotelio dependiente en aorta de ratas hipertensas y normotensas.

Para ello utilizamos 4 grupos de animales:

- **C:** control hipertenso
- **WC:** control normotenso
- **H:** ratas SHR que reciben durante 2 meses la dieta hipercolesterolémica cuya composición se detalla en la metodología.
- **WH:** ratas Wistar que reciben durante 2 meses la dieta hipercolesterolémica.

Para ver la influencia de la dieta hipercolesterolémica se compararon los grupos C respecto a H y WC respecto a WH, y para determinar la influencia de la raza se compararon los grupos C respecto a WC.

Los resultados de estos estudios se exponen de manera resumida a continuación:

La presión arterial se midió en la cola antes de iniciar el estudio y a las 2, 4, 6 y 8 semanas. Como se observa en la figura 16 la PAS de los animales SHR fue significativamente superior a la de los animales normotensos. La dieta hipercolesterolémica no modificó los valores de PAS ni en las ratas normotensas ni en las hipertensas respecto a los valores obtenidos en sus correspondientes controles.

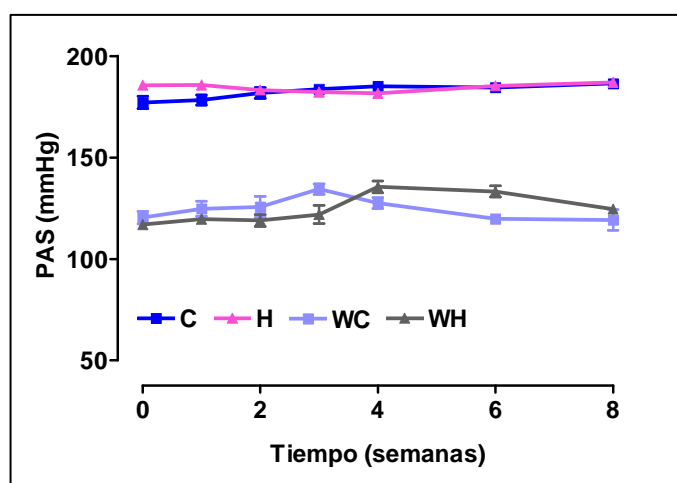
Se determinaron los niveles de lípidos plasmáticos antes (t=0) y al finalizar el estudio (t=8) en todos los animales y se calculó el índice aterogénico como índice de riesgo cardiovascular. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7. Podemos observar que antes de iniciar el tratamiento no hay diferencias

significativas en los valores de CT y LDLc entre los animales normotensos e hipertensos, pero sí en los niveles de HDLc y TG que son más bajos y más altos respectivamente en los animales normotensos. El hecho de que los niveles de HDLc en las ratas normotensas sean inferiores a las ratas SHR justifica que el valor del índice aterogénico de estos animales (calculado como la relación CT/HDLc) resulte significativamente superior.

Los valores de los lípidos plasmáticos no se modifican a lo largo del tiempo puesto que no se producen diferencias significativas entre las determinaciones a tiempo 0 y al final del estudio entre los animales de cada grupo. Por el contrario, la dieta hipercolesterolémica produce, en ambos grupos de animales, un incremento importante de los niveles de CT y LDLc, con reducción de los niveles de HDLc únicamente en el grupo de animales hipertensos. Todo esto implica un incremento de los valores del índice aterogénico.

Para comprobar si la dieta hipercolesterolémica tenía alguna influencia sobre la relajación de la arteria aorta realizamos experimentos con ACh y observamos que la relajación máxima en los dos grupos controles fue similar ( $61,7 \pm 4,3\%$  para el grupo C y  $58,1 \pm 9,6\%$  para el grupo WC) y que en ambos casos la dieta hipercolesterolémica redujo de manera significativa la capacidad de relajación de ACh con la misma intensidad en los dos grupos de animales ( $47,4 \pm 1,8\%$  en el grupo H y  $47,4 \pm 5,5\%$  en el grupo WH).

Esto nos confirma que la dieta hipercolesterolémica que reciben los animales ejerce los efectos que buscábamos sobre los lípidos plasmáticos, sin modificar los niveles de presión arterial. Por otro lado, observamos que la hipercolesterolemia modifica la capacidad de relajación de ACh en arterias de conductancia tanto en animales normotensos como hipertensos.



**Figura 16** - Evolución de la presión arterial sistólica (PAS) en ratas SHR controles (C) e hipercolesterolémicas (H) y Wistar controles (WC) e hipercolesterolémicas (WH).

		Tiempo (semana)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDLc (mg/dL)	LDLc (mg/dL)	IA
		0	86,8 ± 2,4	27,0 ± 1,7	42,4 ± 1,1	38,9 ± 2,3	2,1 ± 0,1
<b>SHR</b>	C	8	89,4 ± 3,8	27,5 ± 2,3	39,3 ± 1,7	44,6 ± 3,0	2,3 ± 0,1
	H	8	181,6 ± 24,6 *	35,4 ± 5,8	27,9 ± 2,1 *	152,0 ± 26,9 *	6,7 ± 1,0 *
		0	91,0 ± 8,4	56,5 ± 8,0 #	28,3 ± 6,7 #	49,8 ± 8,2	3,8 ± 0,4 #
<b>Wistar</b>	WC	8	75,6 ± 1,5	63,9 ± 3,8	30,6 ± 3,6	30,4 ± 4,2	2,4 ± 0,3
	WH	8	136,6 ± 13,5 *	66,4 ± 7,5	27,4 ± 7,6	99,0 ± 11,2 *	8,9 ± 1,9 *

**Tabla 7** - Perfil lipídico plasmático e índice aterogénico en ratas SHR controles (C) e hipercolesterolémicas (H) y Wistar controles (WC) e hipercolesterolémicas (WH). \*  $p < 0,05$  vs valores semana 0 de cada grupo y #  $p < 0,05$  vs SHR.



## **ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS SHR HIPERCOLESTEROLÉMICAS**

### **1.- Estudios *in vivo***

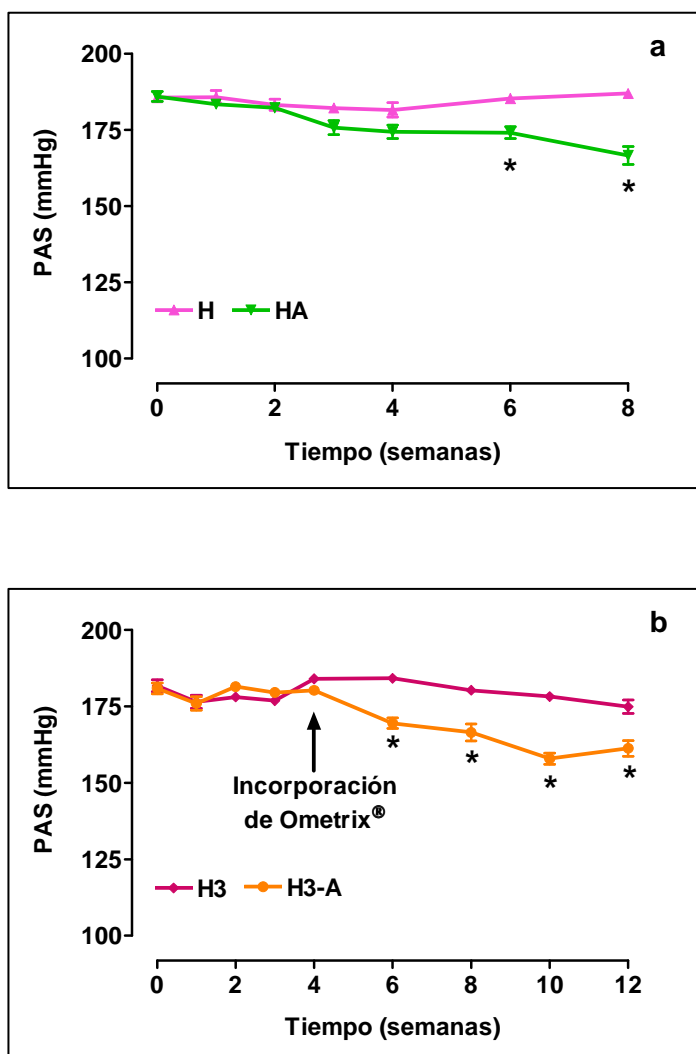
#### **1.1.- Control de presión arterial y frecuencia cardiaca**

Al inicio de los estudios todas las SHR utilizadas tenían valores de PAS por encima de los 180 mmHg, esto indica que la hipertensión estaba establecida y así podíamos valorar la eficacia antihipertensiva de Ometrix®.

La incorporación a la dieta de Ometrix® redujo ligera pero significativamente la PAS del grupo HA a partir de la sexta semana de tratamiento respecto a sus controles hipertensos. Los valores al final del estudio fueron de  $187\pm 1$  mmHg para el grupo H y de  $167\pm 3$  mmHg para el grupo HA (Figura 17a).

Como puede observarse en la figura 17b, la PAS no se modificó en las cuatro primeras semanas del estudio en que todos los animales reciben la misma dieta hipercolesterolémica. A partir de este momento en el grupo que recibe Ometrix® se observó una reducción significativa de la PAS similar a la observada en el estudio de 2 meses ( $175\pm 2$  mmHg grupo H3 y  $161\pm 3$  mmHg grupo H3-A).

La frecuencia cardiaca no se modificó en ninguno de los grupos a lo largo del estudio.



**Figura 17** - Evolución de la presión arterial sistólica (PAS) en ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a)** durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y **b)** durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H o H3.

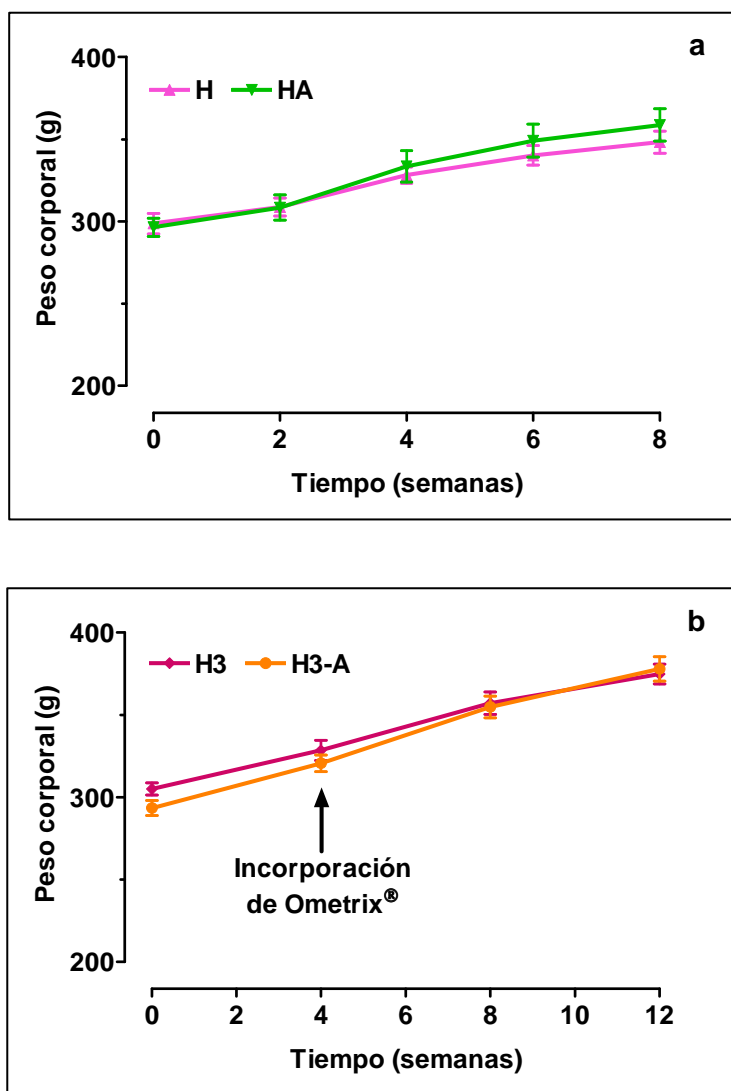
## **1.2.- Control del peso corporal y de la ingesta alimentaria**

No se observaron diferencias significativas en la evolución del peso corporal entre las SHR-hipercolesterolémicas controles y las tratadas con Ometrix<sup>®</sup>, tanto en los grupos del estudio de 2 meses como en los de 3 meses como se puede ver en la figura 18.

A este seguimiento semanal en la evolución del peso de los animales se suma el que se realiza diariamente con la ingesta de las distintas dietas y del consumo de agua. La ingesta de los animales que se mantuvieron con la dieta hipercolesterolémica durante 2 meses (H) fue de  $22\pm 1$  g/día, significativamente superior a la ingesta de las ratas que recibieron la dieta hipercolesterolémica enriquecida en Ometrix<sup>®</sup> que fue de  $16\pm 2$  g/día.

Los animales control que recibieron dieta hipercolesterolémica durante 3 meses (H3) consumieron una media de  $21\pm 2$  g/día de comida, similar a la de los que recibieron la dieta durante 2 meses. La ingesta en el grupo H3-A, que durante el primer mes fue alimentado con la dieta hipercolesterolémica fue de  $20\pm 2$  g/día de pienso en este periodo, sin embargo los dos meses siguientes en que se incorpora Ometrix<sup>®</sup> se reduce la ingesta hasta  $17\pm 1$  g/día, igualándose a la del grupo HA  $16\pm 2$  g/día.

No se observaron diferencias en el consumo de agua entre los diferentes grupos a lo largo del estudio.



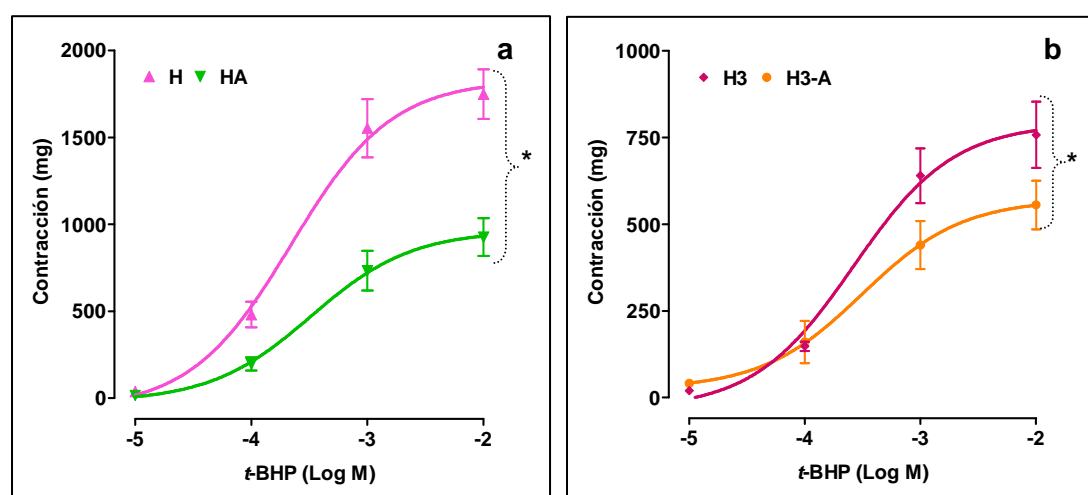
**Figura 18** - Evolución del peso corporal en ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a)** durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y **b)** durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A).

## 2.- Estudios *in vitro*

### 2.1.- Estudios de funcionalidad - Arteria aorta

#### *Curvas concentración-respuesta a terc-butilhidroperóxido*

Cuando se ensayaron concentraciones crecientes de *terc*-butilhidroperóxido (*t*-BHP) en anillos de arteria aorta se registraron valores de contracción mayores para los grupos SHR-hipercolesterolémicos control de ambos estudios (2 y 3 meses) respecto a los obtenidos en los animales tratados (1749±143 mg grupo H, 926±109 mg grupo HA, 758±95 mg grupo H3 y 555±70 mg grupo H3-A a la dosis  $10^{-2}$  M) como se puede ver en la figura 19.



**Figura 19** - Curvas concentración-respuesta a *terc*-butilhidroperóxido (*t*-BHP,  $10^{-5}$ - $10^{-2}$  M), en aorta de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a**) durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y **b**) durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H o H3.

## **Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes**

### **Relajación a acetilcolina**

En la figura 20 se muestran las curvas concentración-respuesta a ACh en aorta, en ellas podemos apreciar que la relajación a ACh es significativamente superior en los grupos de animales tratados con Ometrix® (HA y H3-A) con respecto a sus controles (H y H3). Esto indica que se mejora la relajación dependiente de endotelio provocada por ACh.

Si comparamos los valores de relajación máxima obtenida entre los grupos de tratamiento y los grupos control (Tabla 8) observamos que el incremento en el efecto relajante con el tratamiento en el estudio de 2 meses es de un 14% y en el de 3 meses es de un 26%. No se producen diferencias significativas en los valores de  $pD_2$  entre los grupos estudiados (Tabla 8).

Las curvas a ACh se repitieron después de incubar los anillos con indometacina durante 30 minutos. Las relajaciones producidas en presencia de indometacina fueron significativamente mayores en todos los grupos a las obtenidas en las curvas a ACh sin incubación previa (Figura 21). No hubo diferencias significativas entre las relajaciones obtenidas tras la incubación entre los grupos alcanzándose en todos los casos un efecto máximo próximo al 80% (Tabla 8).

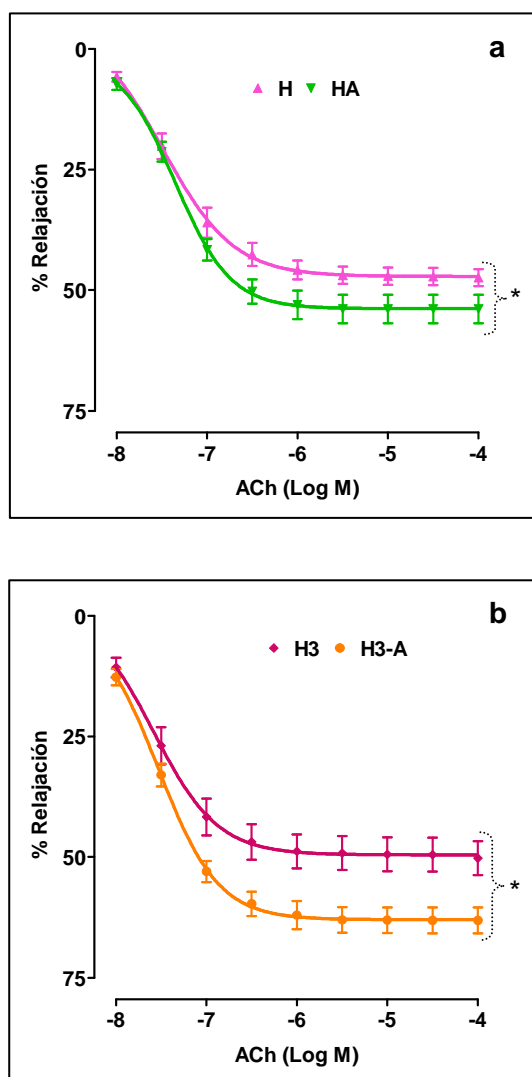
Para obtener la biodisponibilidad del NO, principal agente vasodilatador en el sistema vascular, se comparan las respuestas de FE antes y después de la incubación durante 30 minutos con L-NAME. Tras el análisis de los datos observamos que no hubo diferencias significativas en la biodisponibilidad de NO entre los grupos H y HA ( $172 \pm 10\%$  y  $170 \pm 17\%$  respectivamente) ni entre los grupos H3 y H3-A ( $196 \pm 16\%$  y  $223 \pm 13\%$  respectivamente).

### **Relajación a nitroprusiato sódico**

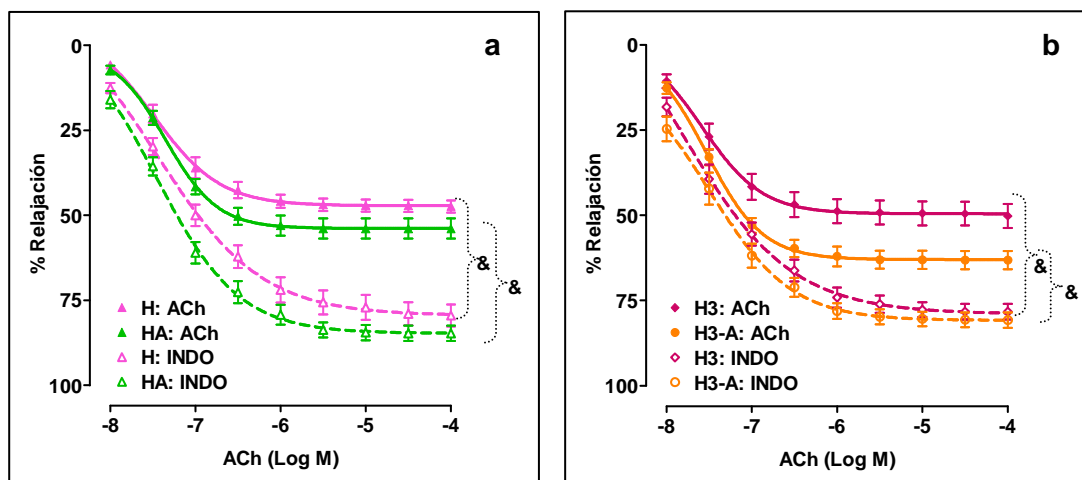
La valoración de la relajación endotelio independiente se consigue realizando curvas concentración-respuesta a NTP. En esta ocasión no hubo diferencias ni en el  $E_{max}$  ni en el  $pD_2$ , entre las ratas tratadas y las controles del estudio de 2 meses

(Tabla 9), siendo las curvas casi superponibles, como puede apreciarse en la Figura 22a.

Pequeñas diferencias en la respuesta máxima se observaron entre los animales controles (H3) y los tratados (H3-A) del estudio de 3 meses (Figura 22b y Tabla 9), siendo ligeramente superior en el grupo alimentado con Ometrix®.



**Figura 20** - Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M), en aorta de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a**) durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y **b**) durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H o H3.

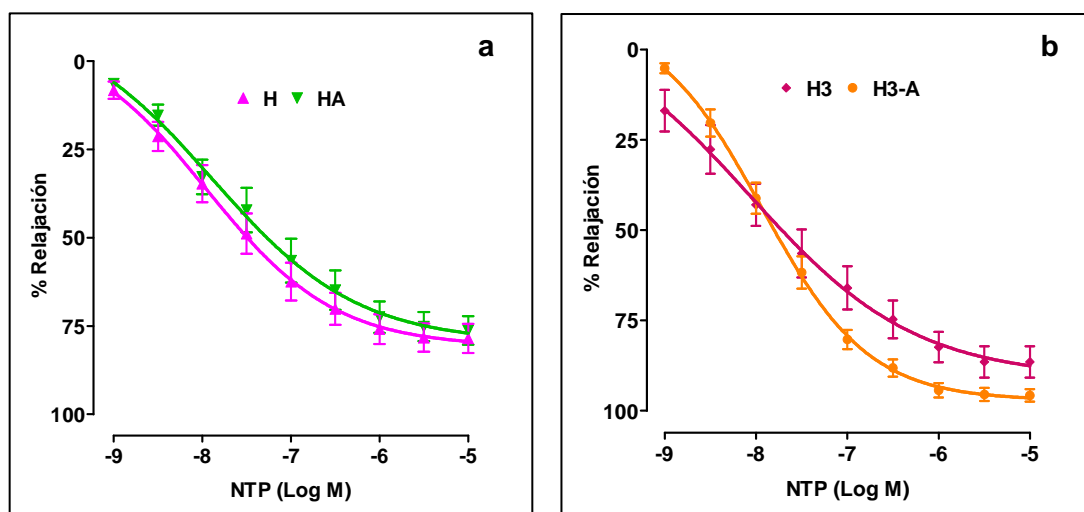


**Figura 21** - Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) en ausencia y en presencia de indometacina (INDO,  $5 \times 10^{-6}$  M) en aorta de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a)** durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y **b)** durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A). &  $p < 0,05$  vs curva ACh correspondiente.

	ACh		INDO + ACh	
	$E_{max}$ (%)	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$pD_2$
<b>H</b>	$47,4 \pm 1,8$	$7,5 \pm 0,2$	$79,5 \pm 3,3$ &	$7,5 \pm 0,4$
<b>HA</b>	$53,9 \pm 3,0$ *	$7,4 \pm 0,1$	$84,7 \pm 2,2$ &	$7,5 \pm 0,2$
<b>H3</b>	$50,2 \pm 3,5$	$7,6 \pm 0,4$	$78,3 \pm 2,3$ &	$7,9 \pm 0,7$
<b>H3-A</b>	$63,1 \pm 2,7$ #	$7,5 \pm 0,2$	$80,8 \pm 2,2$ &	$7,5 \pm 0,3$

**Tabla 8** - Valores de efecto máximo ( $E_{max}$ ) y de  $pD_2$  de las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) en ausencia y en presencia de indometacina (INDO,  $5 \times 10^{-6}$  M) en aorta de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H, #  $p < 0,05$  vs H3 y &  $p < 0,05$  vs ACh.





**Figura 22** - Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M), en aorta de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a)** durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y **b)** durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).

	NTP	
	$E_{max}$ (%)	$pD_2$
<b>H</b>	$78,5 \pm 4,1$	$8,0 \pm 0,3$
<b>HA</b>	$76,2 \pm 4,0$	$7,9 \pm 0,4$
<b>H3</b>	$86,5 \pm 4,3$	$8,1 \pm 0,7$
<b>H3-A</b>	$95,8 \pm 1,7$	$7,9 \pm 0,1$

**Tabla 9** - Valores de efecto máximo ( $E_{max}$ ) y de  $pD_2$  de las curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M), en aorta de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).

## **2.2.- Estudios de funcionalidad - Lecho vascular mesentérico**

### ***Respuesta a agentes contracturantes***

Como reflejan los datos de la tabla 10 la presión de perfusión basal fue similar en todos los grupos, tampoco se obtuvieron diferencias significativas en las respuestas obtenidas con KCl. La respuesta contracturante a FE en lecho vascular mesentérico de los animales control alimentados con dieta hipercolesterolémica durante 2 meses fue significativamente superior a la de los tratados con Ometrix®. Los animales del grupo H3-A no mostraron diferencias en la respuesta contracturante a este agente respecto a sus controles (Tabla 10).

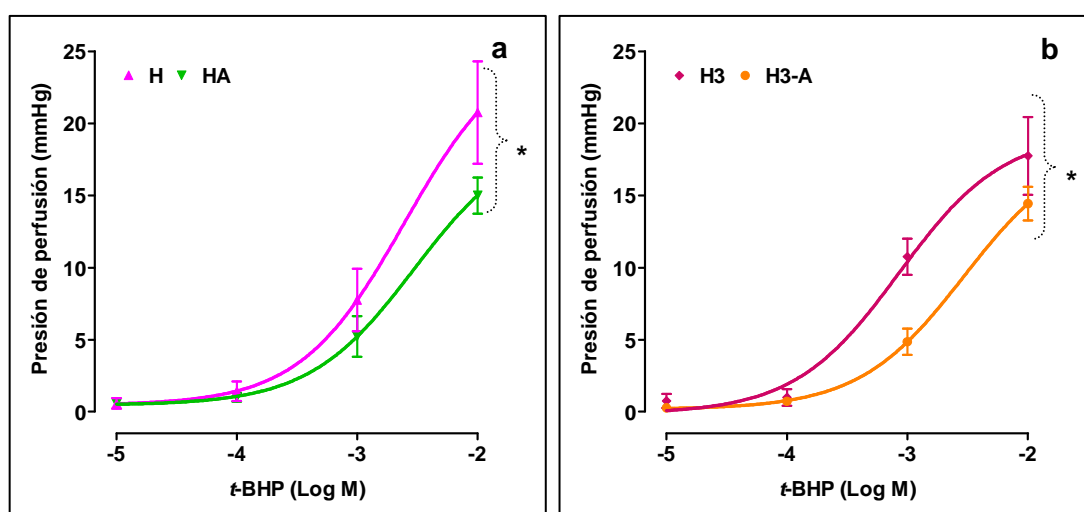
Las contracciones provocadas por *t*-BHP fueron significativamente menores en los animales que recibieron Ometrix® (HA y H3-A) con respecto a sus correspondientes grupos controles (H y H3). Este efecto se manifestó principalmente a las concentraciones más altas utilizadas,  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M (Figura 23).

### ***Curvas concentración-respuesta a acetilcolina***

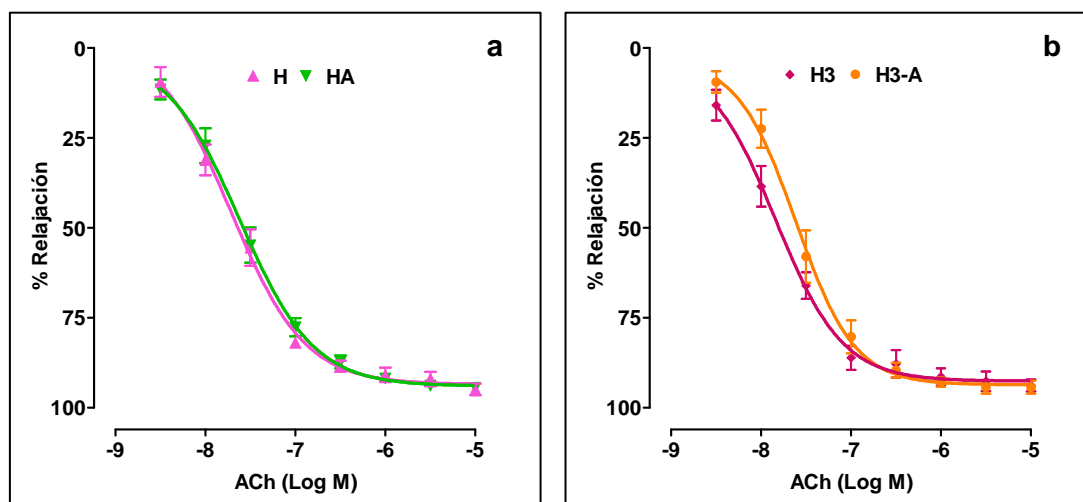
La relajación máxima a ACh en lecho vascular mesentérico fue próxima al 100% no observándose modificaciones después del tratamiento ni en el  $E_{max}$  ni en el  $pD_2$  en ninguno de los grupos (Figura 24 y Tabla 11).

	P. basal (mmHg)	KCl 80 mM (mmHg)	FE 10 <sup>-5</sup> M (mmHg)
H	14,2 ± 2,3	97,0 ± 11,2	128,4 ± 9,5
HA	15,8 ± 2,6	86,6 ± 7,5	88,9 ± 7,1 *
H3	10,5 ± 2,4	90,0 ± 9,1	62,7 ± 14,4
H3-A	12,1 ± 1,4	85,0 ± 8,8	65,6 ± 5,7

**Tabla 10** - Valores de presión de perfusión basal y respuesta contracturante a KCl y FE en lecho vascular mesentérico de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H.



**Figura 23** - Curvas concentración-respuesta a *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BHP, 10<sup>-5</sup>-10<sup>-2</sup> M), en lecho vascular mesentérico de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a**) durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y **b**) durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H o H3.



**Figura 24** - Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $3 \times 10^{-9}$ - $10^{-5}$  M), en lecho vascular mesentérico de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a)** durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y **b)** durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).

	$E_{max}$ (%)	$pD_2$
<b>H</b>	$94,9 \pm 1,6$	$7,7 \pm 0,1$
<b>HA</b>	$94,4 \pm 0,9$	$7,6 \pm 0,1$
<b>H3</b>	$93,8 \pm 1,7$	$7,8 \pm 0,1$
<b>H3-A</b>	$94,3 \pm 1,8$	$7,6 \pm 0,1$

**Tabla 11** - Valores de efecto máximo ( $E_{max}$ ) y de  $pD_2$  de las curvas concentración-respuesta de relajación a acetilcolina (ACh) en lecho vascular mesentérico de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).

## 2.3.- Estudios de funcionalidad - Riñón perfundido

### ***Respuesta a agentes contracturantes***

No se produjeron cambios en el registro de la presión de perfusión basal ni en el efecto contracturante a KCl y FE en los animales alimentados con Ometrix® respecto a sus controles tanto en el estudio de 2 meses como en el de 3 meses (Tabla 12).

La respuesta contracturante a *t*-BHP, fue significativamente mayor en los animales control que en los tratados en los 2 grupos de estudio (Figura 25) a las dosis de  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M

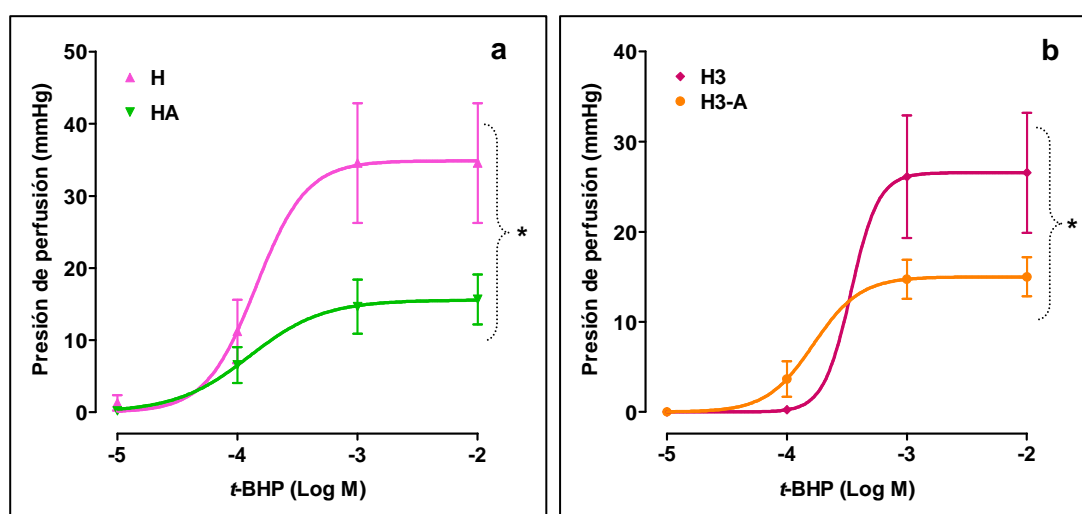
### ***Curvas concentración-respuesta a acetilcolina***

El tratamiento con Ometrix® no modificó la relajación máxima ni el valor de  $pD_2$  de las curvas concentración-respuesta a ACh ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) realizadas en riñón, respecto de las obtenidas en los grupos control tanto del estudio de 2 meses como del de 3 meses (Figura 26 y Tabla 13).

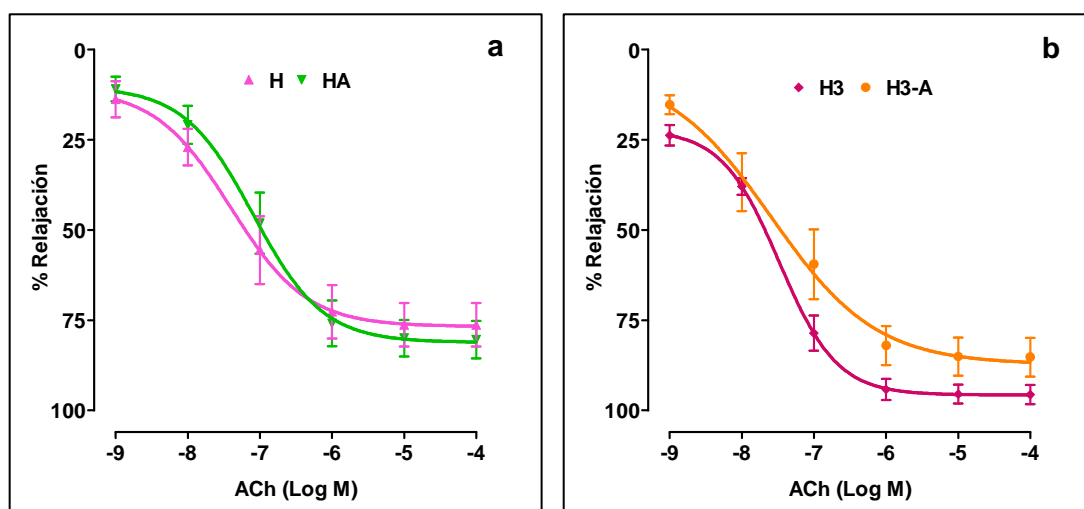
La biodisponibilidad de NO obtenida teniendo en cuenta la respuesta de FE antes y después de la incubación durante 30 minutos con L-NAME, fue significativamente superior en el grupo tratado respecto al control en el estudio de 2 meses ( $91\pm 9\%$  para H y  $113\pm 7\%$  para HA), mientras que en el estudio de 3 meses no se observaron estas diferencias ( $118\pm 15\%$  para H3 y  $106\pm 6\%$  para H3-A).

	P. basal (mmHg)	KCl 80 mM (mmHg)	FE 10 <sup>-6</sup> M (mmHg)
<b>H</b>	40,0 ± 5,8	183,2 ± 15,5	194,5 ± 14,9
<b>HA</b>	47,3 ± 3,5	162,5 ± 21,9	187,7 ± 18,2
<b>H3</b>	40,3 ± 6,4	187,7 ± 25,9	210,2 ± 16,1
<b>H3-A</b>	45,5 ± 2,5	175,2 ± 19,6	229,8 ± 9,0

**Tabla 12** - Valores de presión de perfusión basal y respuesta contracturante a KCl y FE en riñón perfundido de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).



**Figura 25** - Curvas concentración-respuesta a *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BHP, 10<sup>-5</sup>-10<sup>-2</sup> M), en riñón perfundido de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a)** durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y **b)** durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H o H3.



**Figura 26** - Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M), en riñón perfundido de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a)** durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y **b)** durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).

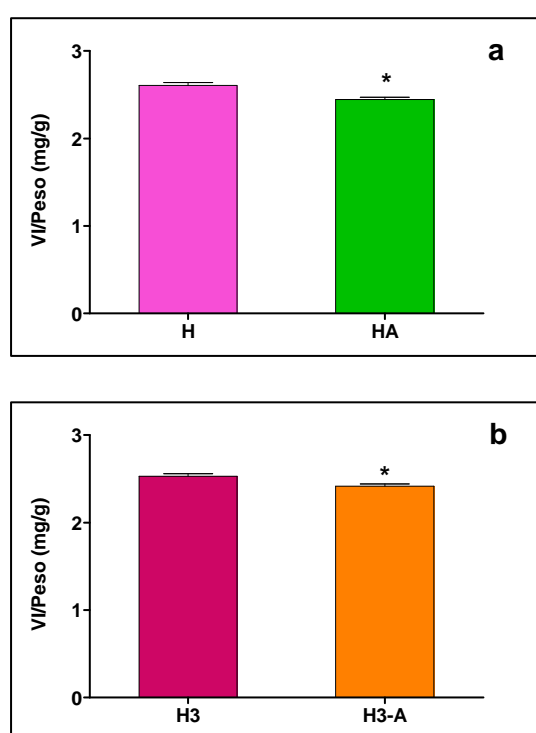
	$E_{max}$ (%)	$pD_2$
<b>H</b>	$76,3 \pm 6,0$	$7,4 \pm 0,3$
<b>HA</b>	$80,4 \pm 5,2$	$7,1 \pm 0,2$
<b>H3</b>	$95,6 \pm 2,7$	$7,5 \pm 0,1$
<b>H3-A</b>	$85,2 \pm 5,4$	$7,3 \pm 0,2$

**Tabla 13** - Valores de efecto máximo ( $E_{max}$ ) y de  $pD_2$  de las curvas concentración-respuesta de relajación a acetilcolina (ACh) en riñón perfundido de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).

### 3.- Estudios morfométricos

#### 3.1.- Hipertrofia cardiaca y renal

La incorporación de Ometrix® a la dieta, en ambos grupos experimentales, redujo significativamente el índice de hipertrofia cardiaca respecto al de sus correspondientes controles como puede observarse en la figura 27. No hubo diferencias en el índice de hipertrofia renal entre ninguno de los grupos.



**Figura 27** - Índice de hipertrofia cardiaca (VI/Peso) de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a)** durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y **b)** durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H o H3.



### 3.2.- Morfometría de arterias aorta e intrarrenales

#### Arteria aorta

Ometrix<sup>®</sup> redujo el área seccional de la capa media y el grosor de la pared de la arteria aorta respecto de los valores obtenidos de los controles SHR-hipercolesterolémicos, sin que se apreciaran diferencias en los otros parámetros morfológicos estudiados entre los grupos del estudio de 2 meses (Tabla 14).

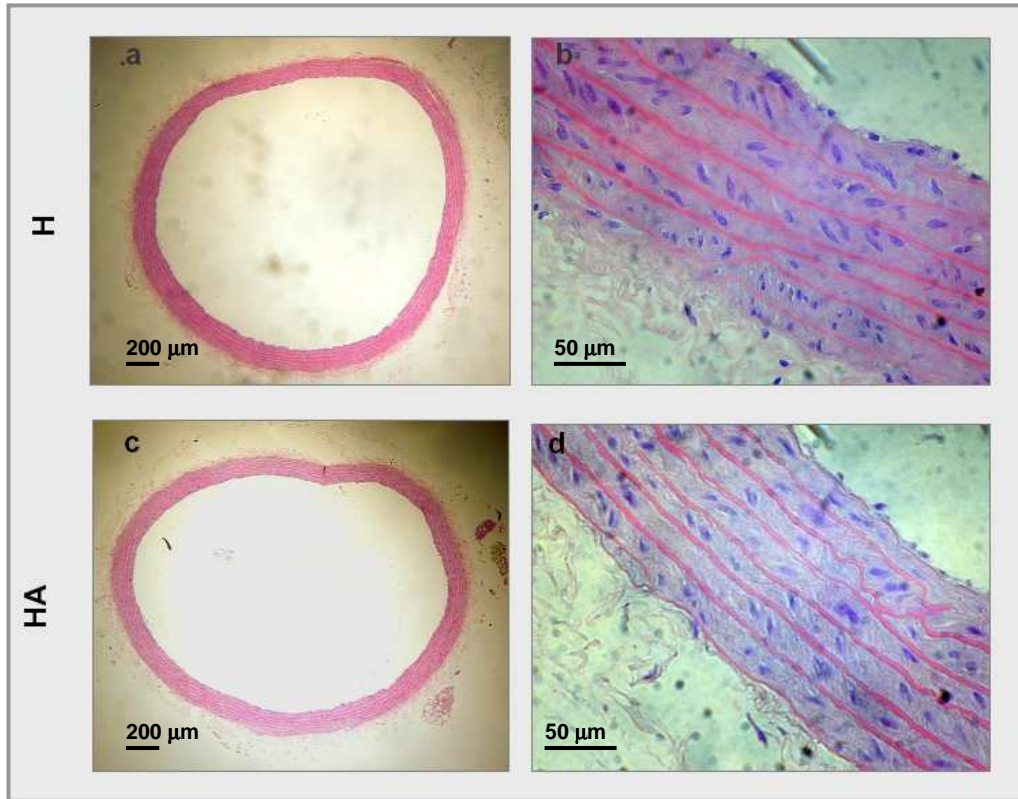
Cuando el tratamiento comienza después de un mes de dieta hipercolesterolémica se observó una ligera disminución en estos parámetros, si bien las diferencias no alcanzan significancia estadística (Tabla 14).

En la figura 28 se muestran fotomicrografías tipo de cortes histológicos de arteria aorta de los grupos H y HA.

	<b>CSA<sub>m</sub></b> <b>(mm<sup>2</sup>)</b>	<b>W<sub>m</sub></b> <b>(μm)</b>	<b>L</b> <b>(μm)</b>	<b>W<sub>m</sub>/L</b>
<b>H</b>	0,67 ± 0,03	123 ± 1	1645 ± 69	0,075 ± 0,003
<b>HA</b>	0,56 ± 0,04 *	112 ± 5 *	1501 ± 92	0,075 ± 0,003
<b>H3</b>	0,60 ± 0,05	122 ± 8	1433 ± 44	0,085 ± 0,006
<b>H3-A</b>	0,53 ± 0,01	113 ± 4	1391 ± 16	0,081 ± 0,003

**Tabla 14** - Parámetros morfométricos de arteria aorta de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H.

**CSA<sub>m</sub>**= área seccional de la capa media, **W<sub>m</sub>**= grosor de la capa media, **L**= lumen, **W<sub>m</sub>/L**= relación grosor/lumen.



**Figura 28** - Fotomicrografías ópticas de cortes histológicos de secciones transversales (**a**, **c**) y detalle de la pared (**b**, **d**) de arteria aorta teñida con hematoxilina-eosina de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) (**a**, **b**) y tratadas con Ometrix® (HA) (**c**, **d**).

### Arterias intrarrenales

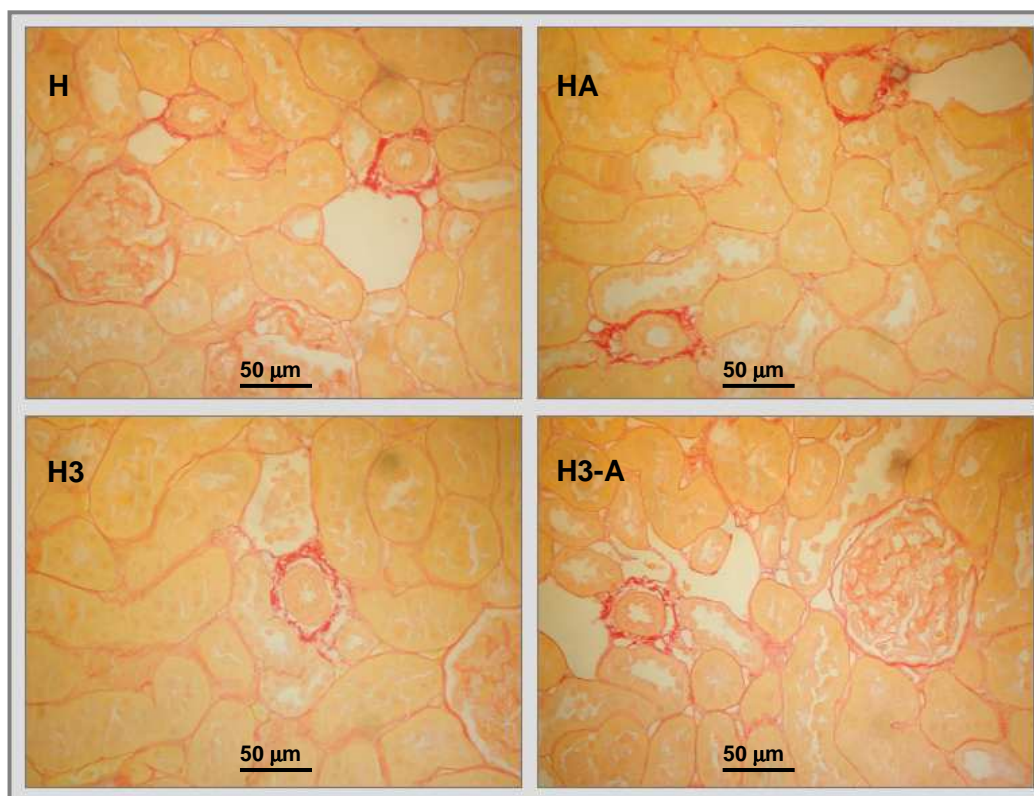
La evaluación de los cambios estructurales en arterias de resistencia se llevó a cabo en cortes de riñón, seleccionando arterias intrarrenales con un diámetro externo comprendido entre 30 y 60  $\mu\text{m}$ .

El análisis morfométrico de estas arterias mostró que el tratamiento incrementó el lumen sin modificar el área seccional de la capa media ni el grosor de la pared, por lo que la relación grosor/lumen se redujo. Estas reducciones sólo fueron estadísticamente significativas en el grupo de estudio de 2 meses y no llegaron a serlo cuando el tratamiento se realiza en ratas con hipercolesterolemia ya establecida, como podemos apreciar por los datos recogidos en la tabla 15 y en las fotomicrografías de la figura 29.

	<b>CSA</b> ( $\mu\text{m}^2$ )	<b>W<sub>m</sub></b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>L</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>W<sub>m</sub>/L</b>
<b>H</b>	1386 $\pm$ 55	14,0 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,5	0,80 $\pm$ 0,03
<b>HA</b>	1358 $\pm$ 114	12,4 $\pm$ 1,0	23,2 $\pm$ 1,3 *	0,58 $\pm$ 0,07*
<b>H3</b>	1280 $\pm$ 55	12,7 $\pm$ 0,3	18,5 $\pm$ 1,0	0,77 $\pm$ 0,02
<b>H3-A</b>	1289 $\pm$ 44	12,3 $\pm$ 0,5	20,4 $\pm$ 1,1	0,63 $\pm$ 0,06

**Tabla 15** - Parámetros morfométricos de arterias intrarrenales en ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H.

**CSA<sub>m</sub>**= área seccional de la capa media, **W<sub>m</sub>**= grosor de la capa media, **L**= lumen, **W<sub>m</sub>/L**= relación grosor/lumen.



**Figura 29** - Fotomicrografías ópticas de cortes histológicos de arterias intrarenales teñidas con rojo sirio de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).

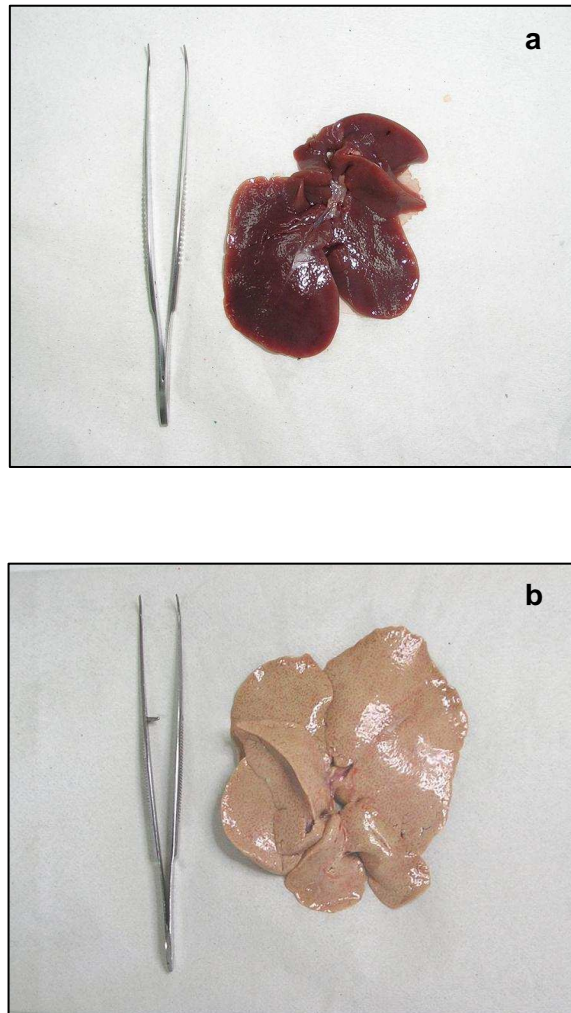
### 3.3.- Morfometría e histología en hígado

Como se comentó en el apartado 1.2. al finalizar los diferentes periodos de estudio no se observaron diferencias significativas entre los pesos corporales de los animales tratados y controles, sin embargo, como se puede observar en la tabla 16 el peso del hígado fue significativamente superior en los animales tratados respecto a sus controles hipercolesterolémicos, tanto en el estudio de 2 meses como en el de 3, por lo que la relación que se establece entre el peso corporal y el del hígado se incrementó en los animales tratados con Ometrix®.

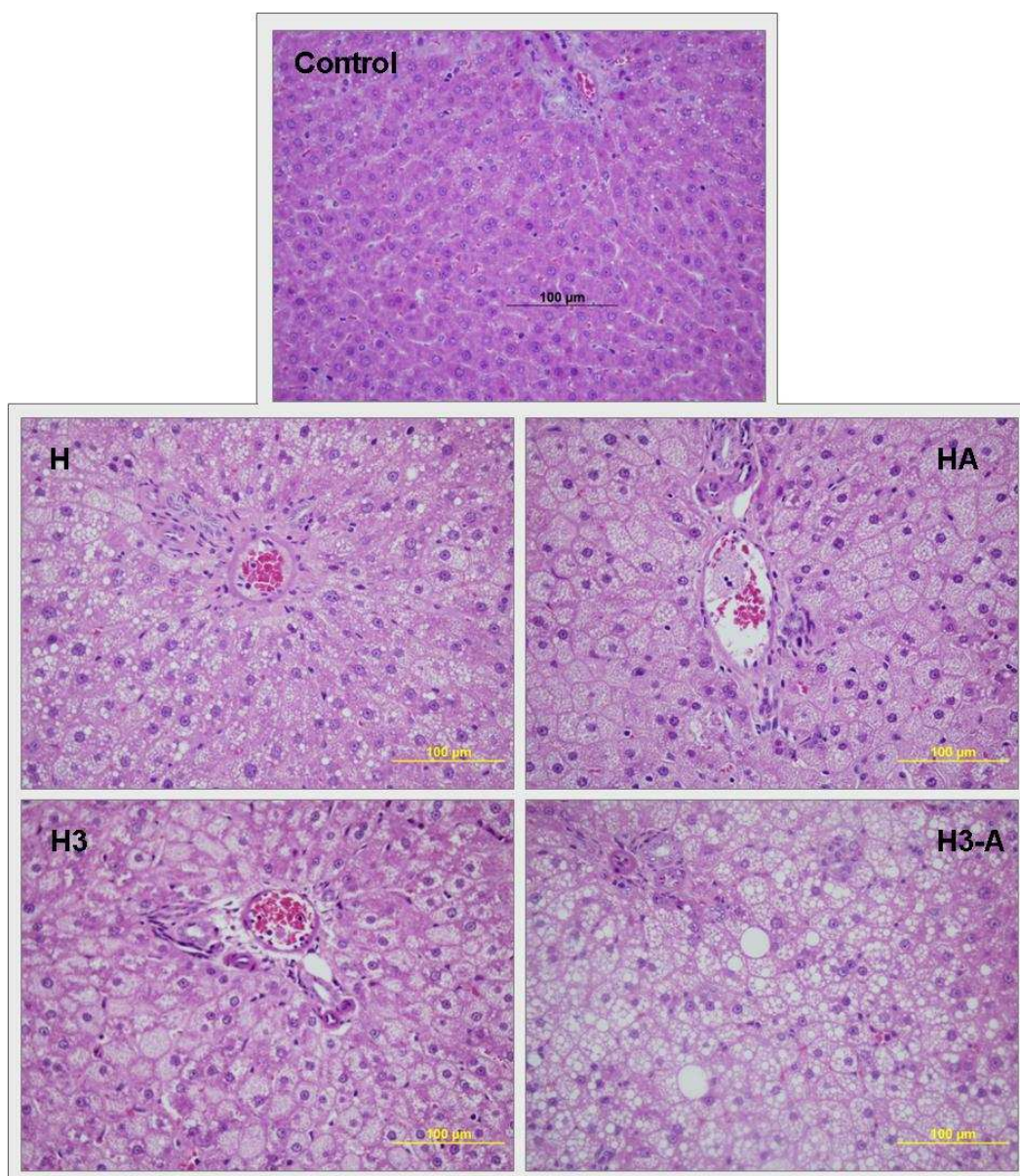
Por otra parte, en la fotografía de hígado entero que se muestra en la figura 30, se puede apreciar cómo se modifica el color del hígado debido a la presencia de elevados niveles de colesterol en la dieta de los grupos estudiados (H, HA, H3 y H3-A) respecto de los animales con dieta estándar. En la figura 31 también se puede apreciar cómo la dieta hipercolesterolémica provoca modificaciones en los hígados a nivel histológico dando lugar en ellos a una esteatosis generalizada que no mejora con la incorporación de Ometrix® en la dieta en ninguno de los 2 grupos experimentales.

	<b>Peso Corporal (g)</b>	<b>Peso Hígado (mg)</b>	<b>Híg/Peso (mg/g)</b>
<b>H</b>	348 ± 7	14343 ± 604	42,6 ± 1,1
<b>HA</b>	359 ± 10	18406 ± 732*	52,3 ± 1,0*
<b>H3</b>	375 ± 6	15999 ± 629	44,8 ± 1,3
<b>H3-A</b>	378 ± 7	19681 ± 454 <sup>#</sup>	53,6 ± 0,7 <sup>#</sup>

**Tabla 16** - Peso corporal, peso del hígado y relación entre ambos (Híg/Peso), en ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A). \* p<0,05 vs H, <sup>#</sup> p<0,05 vs H3.



**Figura 30** - Fotografía del hígado de una rata SHR (a) y una SHR-hipercolesterolémica (b).



**Figura 31** - Fotomicrografías ópticas de cortes histológicos de hígado teñido con hematoxilina-eosina de ratas SHR-control y SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A).

## 4.- Determinación del perfil lipídico

### 4.1.- En plasma

Como reflejan los datos de la tabla 17 al finalizar el estudio los animales control alimentados durante 2 meses con la dieta hipercolesterolémica (grupo H) presentan unos niveles de colesterol total dos veces superiores a los basales a tiempo 0 y unos niveles de LDLc casi 4 veces superiores a los iniciales. Además, en estos animales se reducen de manera muy importante los niveles plasmáticos de HDLc, lo que determina que el índice aterogénico ( $IA=CT/HDLc$ ) sea muy superior al de los mismos animales antes de incorporarles la dieta hipercolesterolémica ( $6,7\pm 1,0$  y  $2,1\pm 0,1$  al final y al inicio del estudio respectivamente) (Figura 32a).

La incorporación de Ometrix® en la dieta impide todos estos cambios, normaliza los niveles de LDLc e IA y mantiene los niveles de CT por debajo incluso de los valores obtenidos a  $t=0$ . Los niveles de TG, que no se modifican de forma significativa con la hipercolesterolemia, se reducen con Ometrix®. En estos animales la concentración de HDLc también se reduce significativamente pero de manera menos intensa a como ocurre en el grupo H.

En los animales estudiados durante 3 meses la dieta hipercolesterolémica provoca cambios similares a los del grupo anterior, efectos que se manifiestan ya a las 4 semanas y que se intensifican al final del estudio.

También en este caso la incorporación de Ometrix® consigue normalizar los niveles de lípidos. Los de CT y TG alcanzaron los valores basales y los de HDLc, que aumentaron, y LDLc que disminuyeron, todavía mostraron diferencias significativas con sus correspondientes valores a tiempo 0 (Tabla 18).

Estos cambios provocaron un incremento significativo del IA a las 4 semanas en ambos grupos, efecto que se agudizó a las 12 semanas en el grupo H3 y se revirtió en el grupo H3-A (Figura 32b).

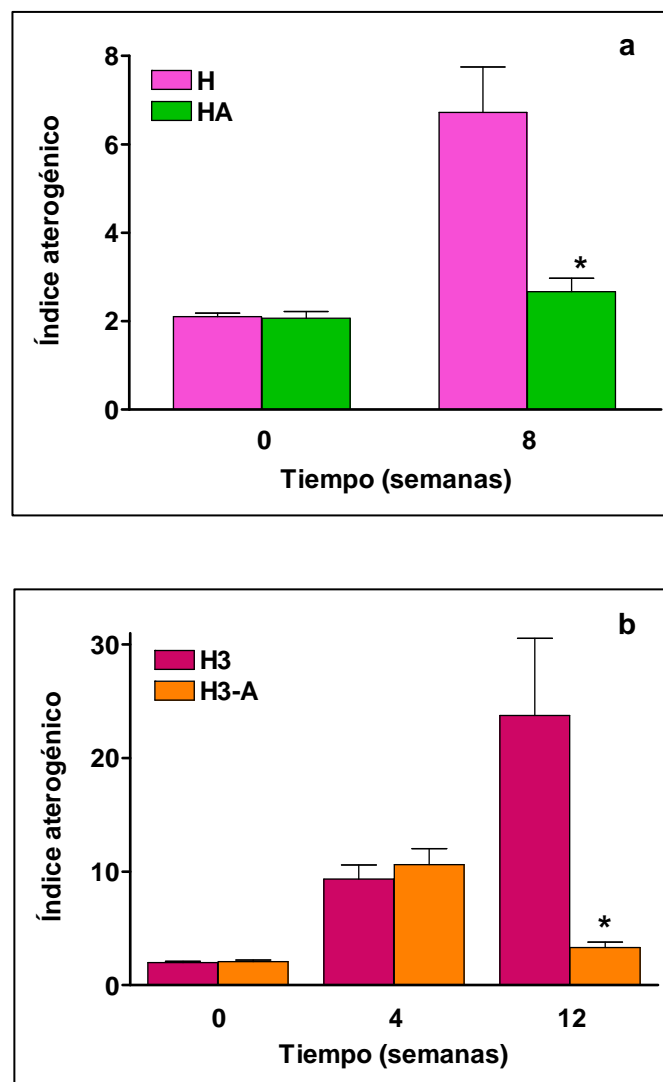


	Tiempo (semana)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDLc (mg/dL)	LDLc (mg/dL)
	0	86,8 ± 2,3	27,0 ± 1,7	42,4 ± 1,1	38,9 ± 2,2
<b>H</b>	8	181,6 ± 24,6 <sup>a</sup>	35,4 ± 5,8	27,9 ± 2,1 <sup>a</sup>	152,0 ± 26,9 <sup>a</sup>
<b>HA</b>	8	68,5 ± 3,6 <sup>*,a</sup>	22,5 ± 2,9 <sup>*</sup>	30,9 ± 2,7 <sup>a</sup>	35,5 ± 3,2 <sup>*</sup>

**Tabla 17** - Niveles plasmáticos de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol unido a HDL (HDLc) y colesterol unido a LDL (LDLc) de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA). \*  $p < 0,05$  vs H y <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs semana 0.

	Tiempo (semana)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDLc (mg/dL)	LDLc (mg/dL)
	0	86,8 ± 2,3	27,0 ± 1,7	42,4 ± 1,1	38,9 ± 2,2
	4	262,6 ± 19,1 <sup>a</sup>	30,2 ± 1,8	26,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	223,9 ± 19,5 <sup>a</sup>
<b>H3</b>	12	307,1 ± 32,5 <sup>a</sup>	20,5 ± 1,9 <sup>a,b</sup>	21,5 ± 2,8 <sup>a,b</sup>	275,4 ± 38,1 <sup>a</sup>
<b>H3-A</b>	12	100,9 ± 8,1 <sup>*,b</sup>	27,2 ± 0,9 <sup>*</sup>	34,3 ± 2,5 <sup>*,a</sup>	59,3 ± 9,2 <sup>*,a,b</sup>

**Tabla 18** - Niveles plasmáticos de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol unido a HDL (HDLc) y colesterol unido a LDL (LDLc) de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H3, <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs semana 0 y <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs semana 4.



**Figura 32** - Efectos de la incorporación de Ometrix<sup>®</sup> en la dieta sobre el índice aterogénico de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a)** durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y **b)** durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H o H3.

#### 4.2.- En hígado

Los niveles de CT en hígado de los grupos tratados (HA y H3-A) fueron similares en los dos periodos de estudio y significativamente superiores a los que mostraron sus respectivos grupos control (H y H3) (Tabla 19).

En hígado no se encontraron diferencias significativas en los niveles de TG entre las controles SHR-hipercolesterolémicas y las ratas tratadas con la mezcla de aceites en ninguno de los periodos de estudio (Tabla 19).

	CT (mg/g híg)	TG (mg/g híg)
<b>H</b>	83,7 ± 13,9	126,6 ± 17,3
<b>HA</b>	115,2 ± 10,4 *	140,3 ± 14,8
<b>H3</b>	81,8 ± 9,1	75,6 ± 17,4
<b>H3-A</b>	106,1 ± 10,3 #	91,4 ± 14,0

**Tabla 19** - Niveles hepáticos de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) en hígado de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A).  
\*  $p < 0,05$  vs H y #  $p < 0,05$  vs H3.

## 5.- Indicadores de estrés oxidativo

### 5.1.- Peroxidación lipídica

Como se puede ver en la tabla 20 los grupos tratados con Ometrix® mostraron niveles ligeramente inferiores de MDA plasmático que los controles, en los dos periodos de estudio, sin llegar a alcanzar diferencias significativas. Por el contrario, los niveles de MDA en hígado de los animales tratados se incrementaron de forma significativa (Tabla 20).

	Plasma	Hígado
	MDA ( $\mu\text{M}$ )	MDA (nmol/g híg)
<b>H</b>	8,6 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 0,9
<b>HA</b>	7,4 $\pm$ 0,4	17,1 $\pm$ 1,5 *
<b>H3</b>	8,7 $\pm$ 0,6	13,2 $\pm$ 0,7
<b>H3-A</b>	7,5 $\pm$ 0,3	15,6 $\pm$ 0,8 #

**Tabla 20** - Niveles de malonildialdehído (MDA) en plasma y en hígado de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix® los 2 últimos meses (H3-A).  
\*  $p < 0,05$  vs H y #  $p < 0,05$  vs H3.

## 5.2.- Cuantificación de glutatión

### En sangre

Como se muestra en la tabla 21 el tratamiento redujo la concentración de GS únicamente en el estudio de 2 meses. Mientras que en los grupos H y HA no se pudo medir el GSSG, entre los grupos H3 y H3-A no se observaron diferencias significativas ni en el GSSG ni en el estado redox.

	<b>GS (<math>\mu</math>M)</b>	<b>GSSG (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Estado redox</b>
<b>H</b>	1350 $\pm$ 90	—	—
<b>HA</b>	1150 $\pm$ 50 *	—	—
<b>H3</b>	870 $\pm$ 30	49,3 $\pm$ 7,3	17,7 $\pm$ 2,8
<b>H3-A</b>	920 $\pm$ 50	66,8 $\pm$ 10,0	15,1 $\pm$ 4,5

**Tabla 21** - Niveles de glutatión total (GS), oxidado (GSSG) y estado redox en sangre de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).  
\*  $p < 0,05$  vs H.

## En hígado

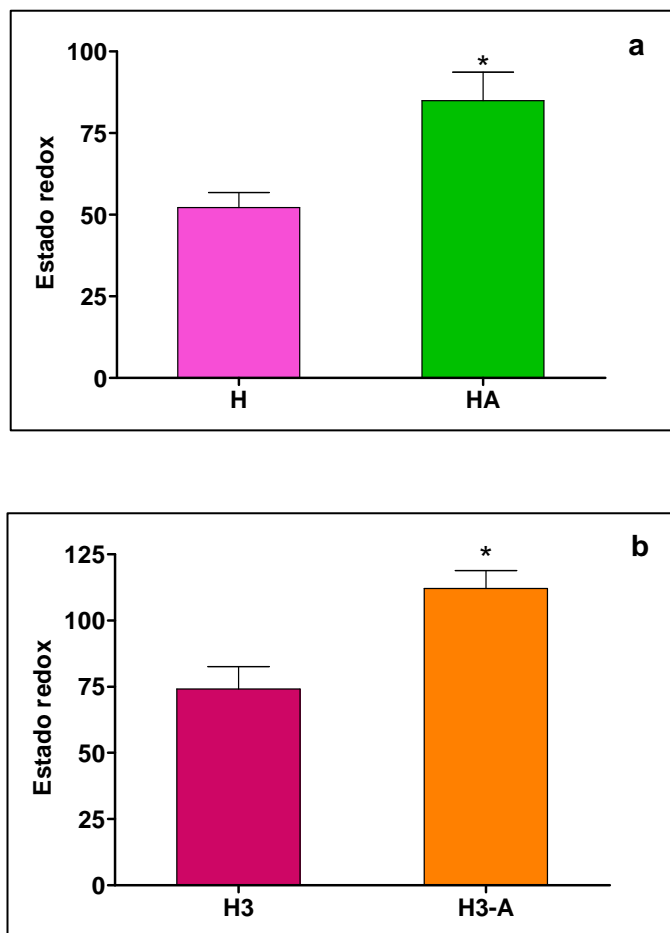
Como se muestra en la tabla 22 el tratamiento con Ometrix<sup>®</sup> incrementó ligeramente los niveles de GS en hígado respecto a sus controles en los dos periodos de estudio, aunque solamente en el estudio de 2 meses se llegaron a ver diferencias estadísticamente significativas.

La reducción de los niveles de GSSG en los animales tratados fue significativa respecto a sus controles a los 2 meses y estuvo próxima a la significancia ( $p=0,052$ ) en el estudio de 3 meses (Tabla 22).

Cuando relacionamos ambos parámetros y calculamos el estado redox del tejido observamos que con el tratamiento éste se incrementó significativamente en ambos periodos de estudio (Figura 33).

	<b>GS</b> ( $\mu\text{mol/g híg}$ )	<b>GSSG</b> ( $\mu\text{mol/g híg}$ )
<b>H</b>	5,4 $\pm$ 0,2	0,106 $\pm$ 0,012
<b>HA</b>	6,3 $\pm$ 0,4 *	0,072 $\pm$ 0,004 *
<b>H3</b>	6,4 $\pm$ 0,6	0,088 $\pm$ 0,012
<b>H3-A</b>	7,1 $\pm$ 0,4	0,064 $\pm$ 0,004

**Tabla 22** - Niveles de glutatión total (GS) y oxidado (GSSG) en hígado de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).  
\*  $p < 0,05$  vs H.



**Figura 33** - Valores de estado redox en hígado de ratas SHR-hipercolesterolémicas: **a)** durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (HA) y **b)** durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H o H3.

### 5.3.- Detección del anión superóxido en aorta

Esta prueba únicamente se realizó en los grupos H3 y H3-A estudiados durante 3 meses. No se encontraron diferencias significativas ni en la producción basal de  $O_2^-$ , ni cuando los anillos se incubaron con NADPH como se puede observar en la tabla 23.

	<b>BASAL</b> <b>(URL /min/mg)</b>	<b>ESTIMULADO</b> <b>(URL /min/mg)</b>
<b>H3</b>	80 ± 7	2690 ± 499
<b>H3-A</b>	121 ± 19	2354 ± 360

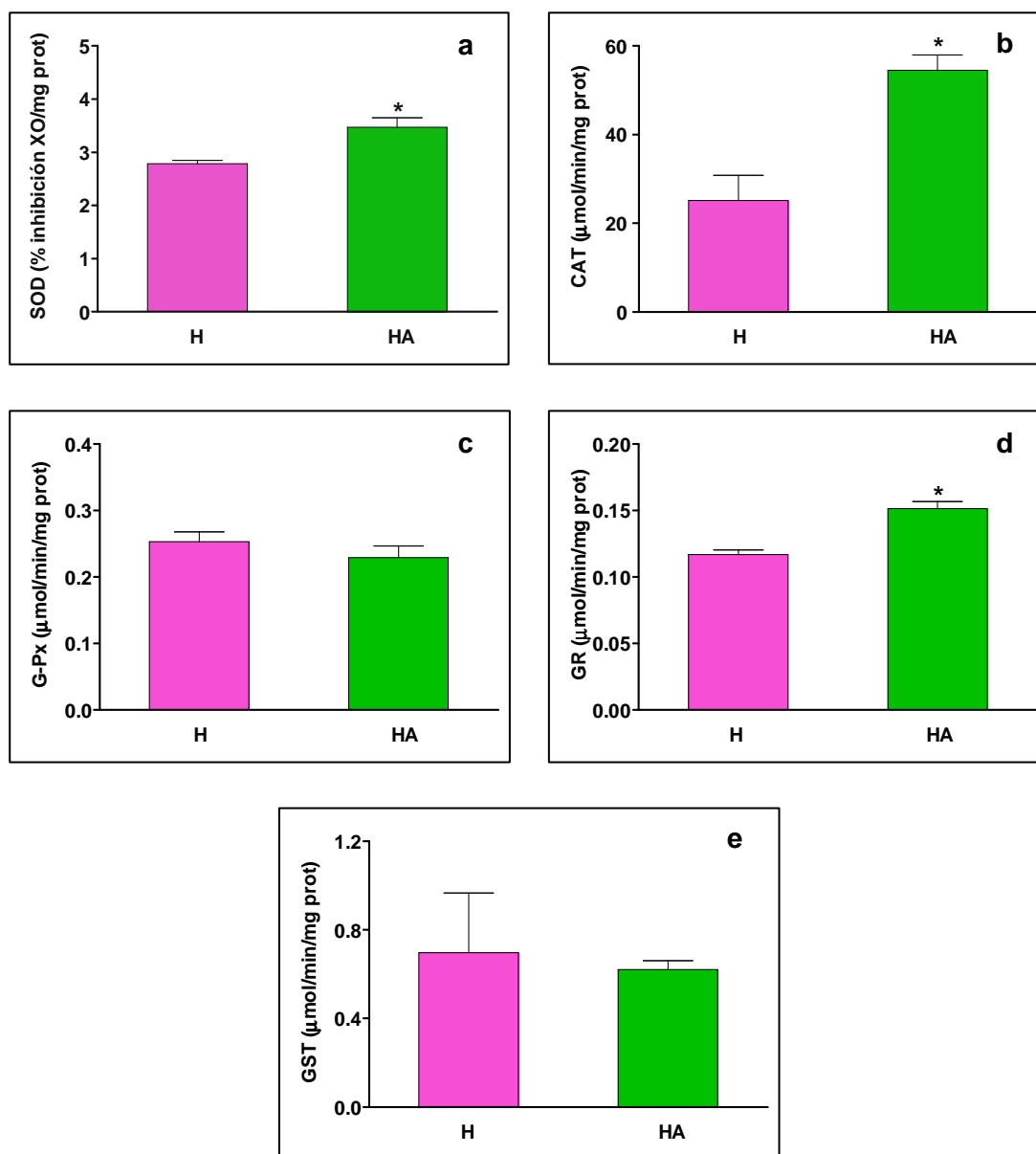
**Tabla 23** - Producción de anión superóxido en anillos de aorta en condiciones basales y después de estimulación con NADPH ( $10^{-4}$  M) en ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A).



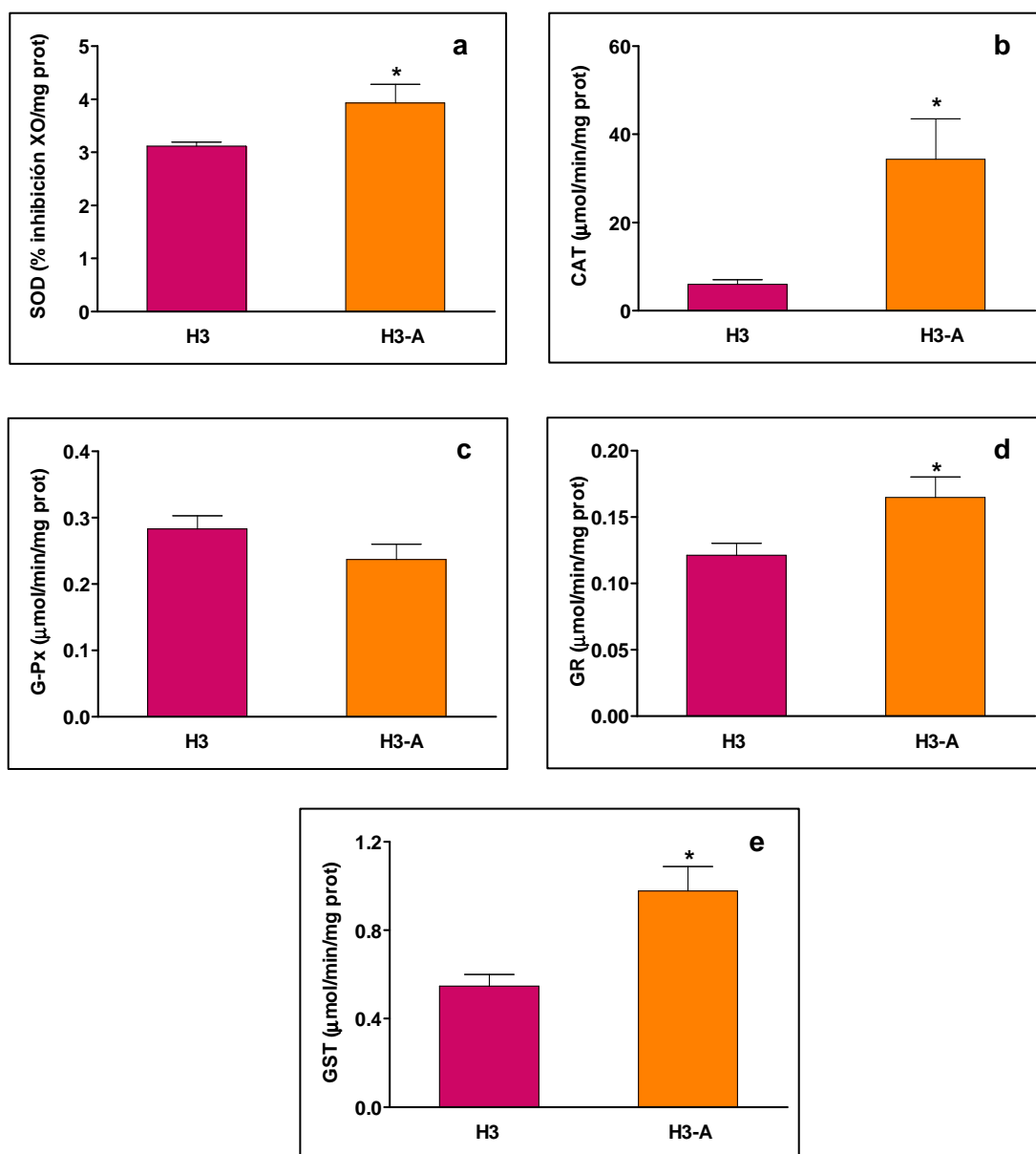
#### **5.4.- Actividad de las enzimas antioxidantes en hígado**

La incorporación a la dieta de Ometrix<sup>®</sup>, en los animales estudiados durante 2 meses, produjo un incremento significativo de tres de las principales enzimas antioxidantes: SOD (25%), GR (30%) y especialmente de CAT (117%). En este grupo de animales no se produjeron modificaciones en la actividad de G-Px y GST (Figura 34).

En los animales que recibieron Ometrix<sup>®</sup> tras un mes de dieta hipercolesterolémica se produjeron incrementos similares en la actividad de SOD (26%) y GR (36%) acompañados de un incremento del 471% en la actividad de la CAT y de un 79% en la de la GST. Al igual que en el caso de anterior no hubo cambios en la actividad de la G-Px (Figura 35).



**Figura 34** - Actividad de superóxido dismutasa (SOD) (a), catalasa (CAT) (b), glutatión peroxidasa (G-Px) (c), glutatión reductasa (GR) (d) y glutatión S-transferasa (GST) (e) en hígado de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 2 meses: controles (H) y tratadas con Ometrix® (HA). \*  $p < 0,05$  vs H.



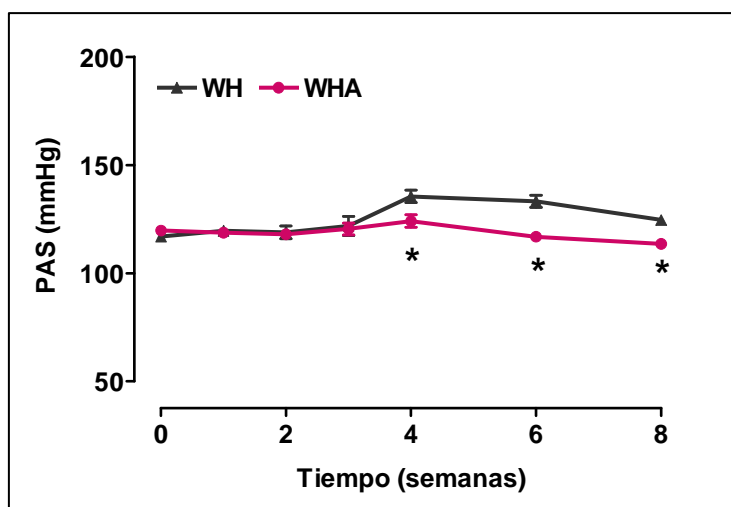
**Figura 35** - Actividad de superóxido dismutasa (SOD) (a), catalasa (CAT) (b), glutatión peroxidasa (G-Px) (c), glutatión reductasa (GR) (d) y glutatión S-transferasa (GST) (e) en hígado de ratas SHR-hipercolesterolémicas durante 3 meses: controles (H3) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> los 2 últimos meses (H3-A). \*  $p < 0,05$  vs H3.

## ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS WISTAR HIPERCOLESTEROLÉMICAS

### 1.- Estudios *in vivo*

#### 1.1.- Control de presión arterial y frecuencia cardíaca

Como se muestra en la figura 36 todos los animales mantuvieron a lo largo del periodo de estudio la presión arterial en valores de normotensión. Durante el estudio no se observaron modificaciones significativas de la frecuencia cardíaca. Sin embargo, a partir de la cuarta semana se observó un pequeño incremento de los valores de PAS en el grupo control hipercolesterolémico (WH), observándose, a partir de este momento, diferencias significativas entre los 2 grupos (semana 8:  $125 \pm 2$  mmHg en WH y  $114 \pm 2$  mmHg en WHA).



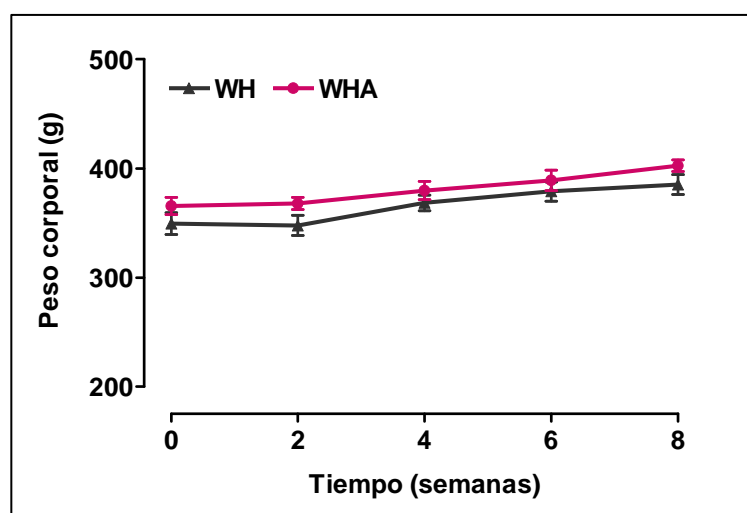
**Figura 36** - Evolución de la presión arterial sistólica (PAS) en ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses.

\*  $p < 0,05$  vs WH.

## 1.2.- Control del peso corporal y de la ingesta alimentaria

La ingesta de las ratas alimentadas con la dieta hipercolesterolémica ( $25 \pm 3$  g/día) fue significativamente superior a la de las ratas tratadas con Ometrix<sup>®</sup> ( $16 \pm 1$  g/día). En el caso del consumo de agua no se observaron diferencias.

El peso de los animales al iniciar el tratamiento, así como su evolución a lo largo del estudio fue similar en los dos grupos (Figura 37).



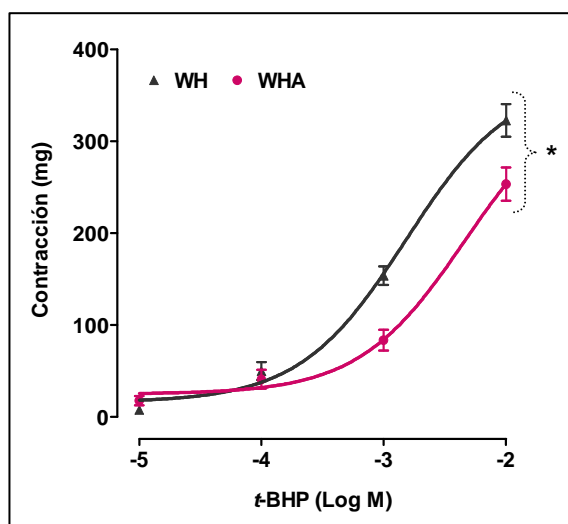
**Figura 37** - Evolución del peso corporal en ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (WHA) durante 2 meses.

## 2.- Estudios *in vitro*

### 2.1.- Estudios de funcionalidad - Arteria aorta

#### Curvas concentración-respuesta a *terc*-butilhidroperóxido

En las curvas concentración-respuesta con *t*-BHP en anillos de arteria aorta se registraron valores de contracción significativamente mayores en las ratas control que en las tratadas con Ometrix® (323±18 mg para WH y 253±18 mg para WHA a la dosis de 10<sup>-2</sup> M) como se puede ver en la figura 38.



**Figura 38** - Curvas concentración-respuesta a *terc*-butilhidroperóxido (*t*-BHP, 10<sup>-5</sup>-10<sup>-2</sup> M), en aorta de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH.

## **Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes**

### **Relajación a acetilcolina**

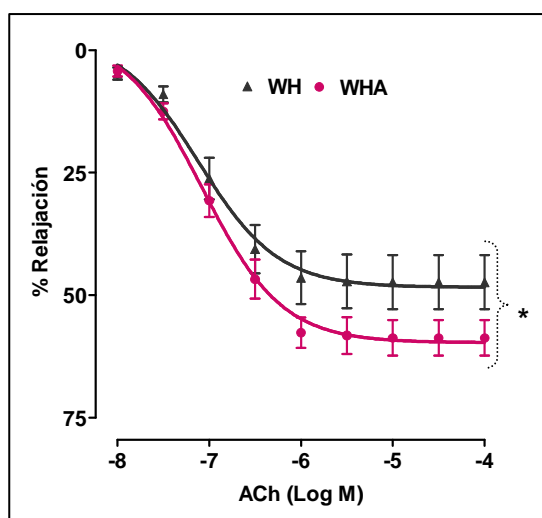
Las curvas concentración-respuesta a ACh en aorta mostraron un efecto máximo mayor en los animales que recibieron Ometrix® que en los controles hipercolesterolémicos (Figura 39). El análisis de las curvas mostró que no había diferencias significativas en los valores de  $pD_2$  (Tabla 24).

Las curvas a ACh se repitieron después de incubar los anillos con indometacina. Su presencia redujo de manera significativa la relajación máxima en los animales tratados y no en los controles, por lo que tras la incubación las curvas de relajación a ACh se superponen y se obtienen valores de  $pD_2$  y  $E_{max}$  similares (Figura 40 y Tabla 24).

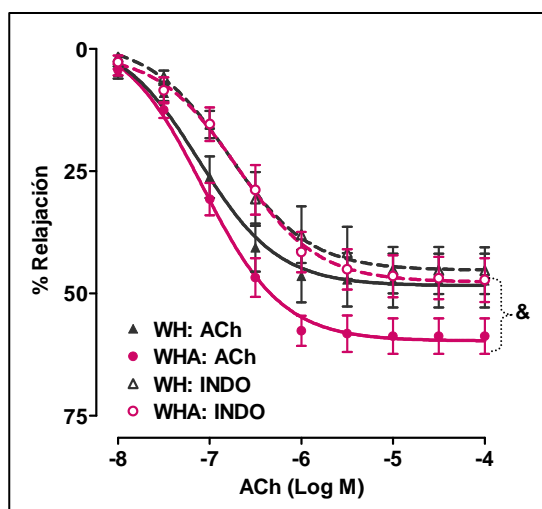
No se apreciaron diferencias en la biodisponibilidad de NO obtenida teniendo en cuenta la respuesta de fenilefrina antes y después de la incubación con L-NAME ( $10^{-4}$  M) entre los grupos de estudio ( $172 \pm 10\%$  para WH y  $174 \pm 12\%$  para WHA).

### **Relajación a nitroprusiato sódico**

En la figura 41 se representan las curvas concentración-respuesta obtenidas con NTP en anillos de aorta. No existen diferencias en la respuesta máxima ( $86,4 \pm 2,6\%$  en el grupo WH y  $91,9 \pm 1,6\%$  en el grupo WHA) ni tampoco aparecen diferencias en los valores de  $pD_2$  ( $7,6 \pm 0,1$  grupo WH y  $7,7 \pm 0,1$  grupo WHA).



**Figura 39** - Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) en aorta de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH.

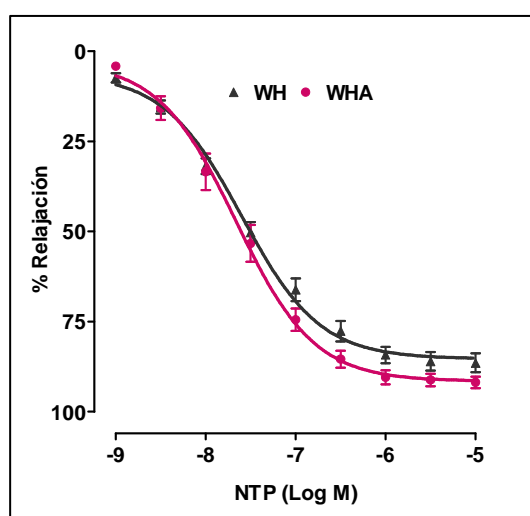


**Figura 40** - Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) en ausencia y en presencia de indometacina (INDO,  $5 \times 10^{-6}$  M) en aorta de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses. &  $p < 0,05$  vs WHA: ACh.



	ACh		INDO + ACh	
	$E_{max}$ (%)	$pD_2$	$E_{max}$ (%)	$pD_2$
WH	$47,4 \pm 5,5$	$7,1 \pm 0,2$	$45,4 \pm 4,8$	$6,8 \pm 0,2$
WHA	$58,7 \pm 3,6^*$	$7,1 \pm 0,1$	$47,3 \pm 4,5^{\&}$	$6,7 \pm 0,2$

**Tabla 24** - Valores de efecto máximo ( $E_{max}$ ) y de  $pD_2$  de las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en ausencia y en presencia de indometacina (INDO,  $5 \times 10^{-6}$  M) en aorta de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH y  $\& p < 0,05$  vs ACh.



**Figura 41** - Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) en aorta de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses.

## **2.2.- Estudios de funcionalidad - Lecho vascular mesentérico**

### ***Respuesta a agentes contracturantes***

No se encontraron diferencias significativas ni en la presión de perfusión basal ni en la respuesta contracturante a KCl o FE, entre los grupos control y tratado con Ometrix<sup>®</sup> (Tabla 25).

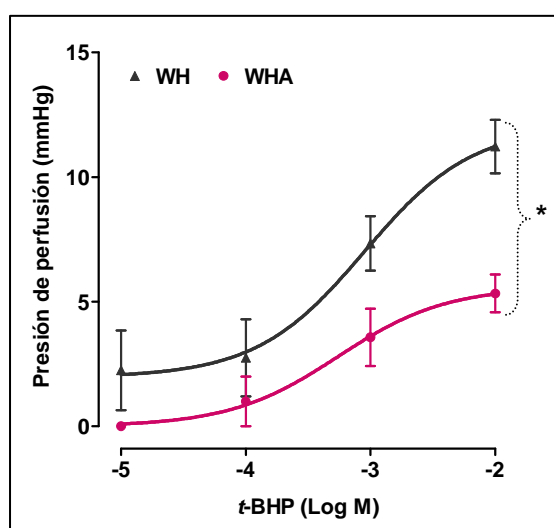
Las contracciones producidas por *t*-BHP en el grupo control fueron significativamente superiores, con todas las concentraciones ensayadas, a las que se produjeron en los animales tratados como queda reflejado en las curvas concentración-respuesta de la figura 42 ( $11\pm 1$  mmHg en el grupo WH y  $5\pm 1$  mmHg en el grupo WHA a la dosis  $10^{-2}$  M).

### ***Curvas concentración-respuesta a acetilcolina***

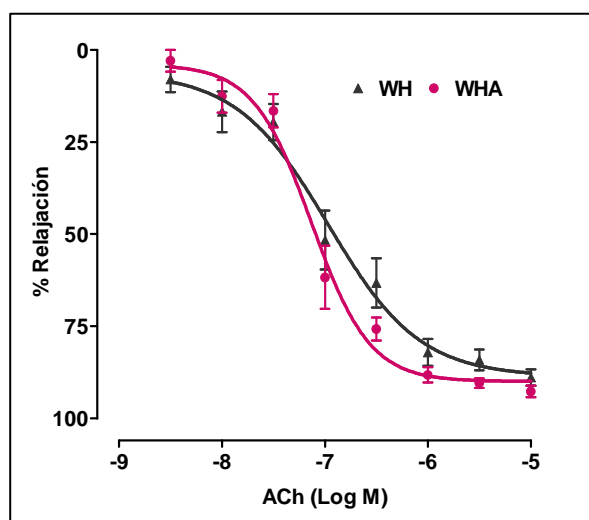
Como se muestra en la figura 43 las curvas de relajación a ACh son similares entre el grupo control y el que recibe Ometrix<sup>®</sup> incorporado en la dieta. En ambos grupos se consigue una relajación casi total y un valor de  $pD_2$  similar como se puede ver en la tabla 26.

	P. basal (mmHg)	KCl 80 mM (mmHg)	FE 10 <sup>-5</sup> M (mmHg)
WH	14,4 ± 2,4	85,0 ± 7,7	87,5 ± 9,6
WHA	11,6 ± 0,8	66,6 ± 7,4	84,1 ± 6,8

**Tabla 25** - Valores de presión de perfusión basal y respuesta contracturante a KCl y FE en lecho vascular mesentérico de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (WHA) durante 2 meses.



**Figura 42** - Curvas concentración-respuesta a *tert*-butilhidroperóxido (t-BHP, 10<sup>-5</sup>-10<sup>-2</sup> M), en lecho vascular mesentérico de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH.



**Figura 43** - Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $3 \times 10^{-9}$ - $10^{-5}$  M), en lecho vascular mesentérico de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses.

	$E_{max}$ (%)	$pD_2$
<b>WH</b>	$88,9 \pm 2,2$	$7,0 \pm 0,1$
<b>WHA</b>	$92,7 \pm 1,6$	$7,1 \pm 0,1$

**Tabla 26** - Valores de efecto máximo ( $E_{max}$ ) y de  $pD_2$  de las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en lecho vascular mesentérico de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses.

## 2.3.- Estudios de funcionalidad - Riñón perfundido

### ***Respuesta a agentes contracturantes***

La presión de perfusión basal de los riñones procedentes de los animales tratados fue superior a la de los controles Wistar-hipercolesterolémicos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las respuestas contracturantes a KCl o a FE (Tabla 27).

Las curvas concentración-respuesta con *t*-BHP realizadas en el grupo control alcanzaron su efecto máximo con una concentración de  $10^{-3}$  M, mientras que en el grupo tratado con Ometrix® las contracciones fueron mucho menores desde las primeras dosis y la respuesta obtenida con la dosis más alta fue significativamente menor ( $51 \pm 9$  mmHg para el grupo control y  $25 \pm 10$  mmHg para el grupo tratado,  $p < 0,05$ ) como se puede ver en la figura 44.

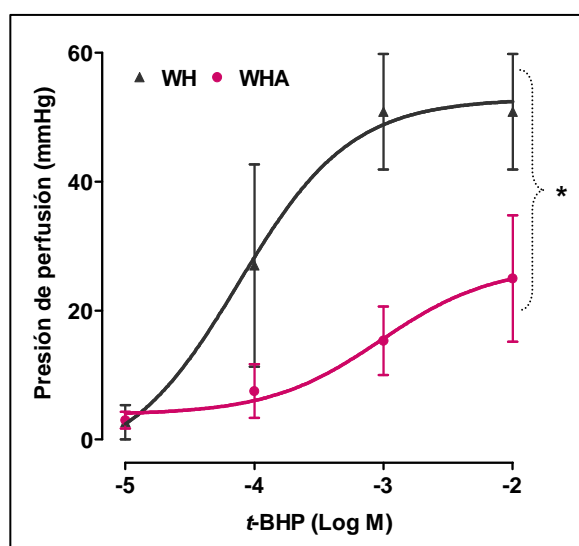
### ***Curvas concentración-respuesta a acetilcolina***

En la figura 45 se pueden observar las curvas concentración-respuesta realizadas con ACh en animales control (WH) y tratados con Ometrix® (WHA). El tratamiento produjo un desplazamiento de la curva a la izquierda, obteniéndose diferencias significativas en la respuesta máxima. Los valores de  $pD_2$  no se modificaron (Tabla 28).

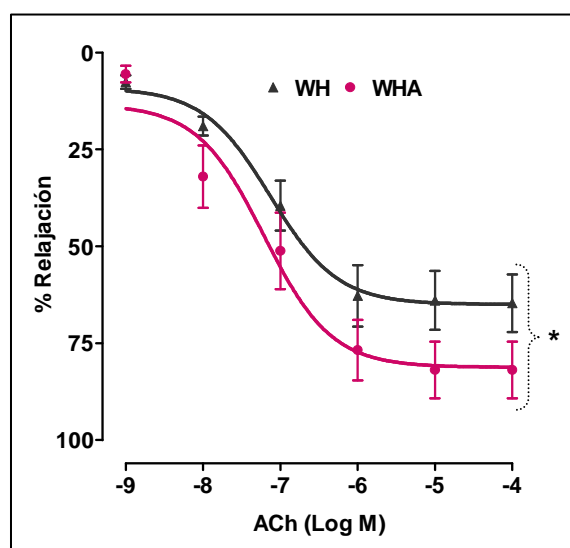
La biodisponibilidad de NO obtenida teniendo en cuenta la respuesta de FE antes y después de la incubación con L-NAME ( $10^{-4}$  M) fue diferente en ambos grupos, mientras en el grupo control apenas se modificó respecto a la respuesta inicial, en el grupo que recibió Ometrix® la respuesta se incrementó en un 60%.

	P. basal (mmHg)	KCl 80 mM (mmHg)	FE 10 <sup>-6</sup> M (mmHg)
WH	57,1 ± 4,8	104,4 ± 12,7	118,3 ± 13,6
WHA	78,6 ± 4,3 *	83,1 ± 15,5	106,0 ± 14,5

**Tabla 27** - Valores de presión de perfusión basal y respuesta contracturante a KCl y FE en riñón perfundido de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH.



**Figura 44** - Curvas concentración-respuesta a *terc*-butilhidroperóxido (t-BHP, 10<sup>-5</sup>-10<sup>-2</sup> M) en riñón perfundido de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH.



**Figura 45** - Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M), en riñón perfundido de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH.

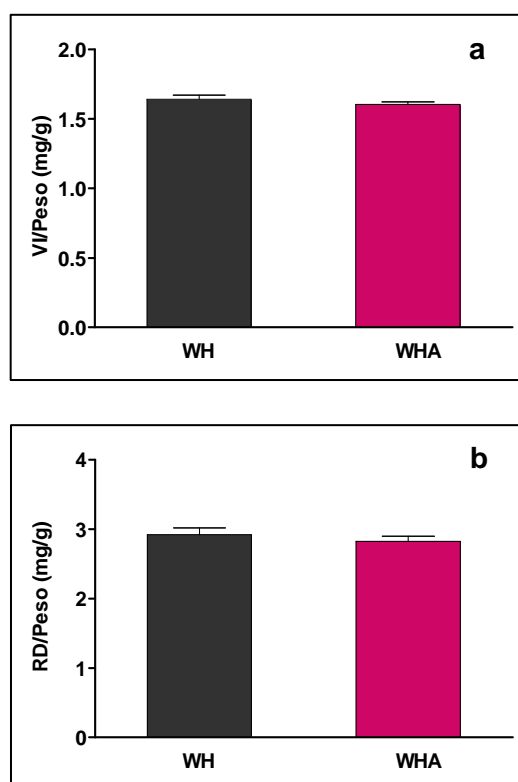
	$E_{max}$ (%)	$pD_2$
<b>WH</b>	$64,7 \pm 7,5$	$7,1 \pm 0,2$
<b>WHA</b>	$81,9 \pm 7,3$ *	$7,2 \pm 0,2$

**Tabla 28** - Valores de efecto máximo ( $E_{max}$ ) y de  $pD_2$  de las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en riñón perfundido de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH.

### 3.- Estudios morfométricos

#### 3.1.- Hipertrofia cardiaca y renal

Como se observa en la figura 46 la incorporación en la dieta de Ometrix® no indujo modificaciones en los valores obtenidos de la relación entre el peso corporal y el peso del ventrículo izquierdo o del riñón en los animales normotesos.



**Figura 46** - Índice de hipertrofia cardiaca (VI/Peso) (a) y renal (RD/Peso) (b) de ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses.



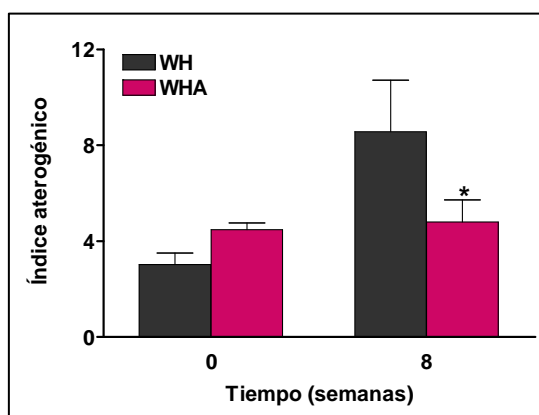
## **4.- Determinación del perfil lipídico**

### **4.1.- En plasma**

En la tabla 29 se representan los valores de las concentraciones plasmáticas de CT, TG, HDLc y LDLc al inicio y al final del estudio. El tratamiento con Ometrix<sup>®</sup> evitó el incremento significativo de los niveles de CT y LDLc que se produjo en los animales control alimentados con la dieta hipercolesterolémica durante 8 semanas. Aunque la dieta hipercolesterolémica no modificó los niveles de TG, con la administración de Ometrix<sup>®</sup> éstos disminuyeron significativamente. Como se muestra en la figura 47 el índice aterogénico se incrementó de manera significativa en las ratas hipercolesterolémicas mientras que la incorporación de Ometrix<sup>®</sup> a la dieta hipercolesterolémica previno este incremento.

	Tiempo (semana)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDLc (mg/dL)	LDLc (mg/dL)
	0	91,0 ± 8,4	56,5 ± 8,0	21,7 ± 1,3	56,2 ± 8,8
<b>WH</b>	8	136,6 ± 13,5 <sup>a</sup>	66,4 ± 7,5	27,4 ± 7,6	99,0 ± 11,2 <sup>a</sup>
<b>WHA</b>	8	89,1 ± 12,3 <sup>*</sup>	35,5 ± 4,0 <sup>*,a</sup>	20,0 ± 2,9	63,3 ± 14,5 <sup>*</sup>

**Tabla 29** - Niveles plasmáticos de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol unido a HDL (HDLc) y colesterol unido a LDL (LDLc) en ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH y <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs semana 0.



**Figura 47** - Efectos de la incorporación de Ometrix<sup>®</sup> en la dieta sobre el índice aterogénico en ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH.

#### 4.2.- En hígado

No se observaron diferencias significativas en la relación entre el peso del hígado y el peso corporal entre ambos grupos ( $42 \pm 2$  mg/g híg en el grupo WH y  $43 \pm 2$  mg/g híg en el grupo WHA).

Los niveles de CT y TG en hígado fueron muy superiores en el grupo tratado respecto del grupo control hipercolesterolémico como se muestra en la tabla 30.

	CT (mg/g híg)	TG (mg/g híg)
WH	$35,9 \pm 3,3$	$18,8 \pm 2,1$
WHA	$107,8 \pm 8,1$ *	$70,4 \pm 5,6$ *

**Tabla 30** - Niveles hepáticos de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) en ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (WHA) durante 2 meses.  
\*  $p < 0,05$  vs WH.

## 5.- Indicadores de estrés oxidativo

### 5.1.- Peroxidación lipídica

No se encontraron diferencias significativas en la cuantificación de MDA plasmático entre los grupos WH y WHA. Sin embargo, el tratamiento incrementó el MDA medido en hígado (Tabla 31).

	Plasma	Hígado
	MDA ( $\mu$ M)	MDA (nmol/g híg)
WH	11,0 $\pm$ 0,8	9,6 $\pm$ 0,3
WHA	11,3 $\pm$ 0,5	12,6 $\pm$ 0,7 *

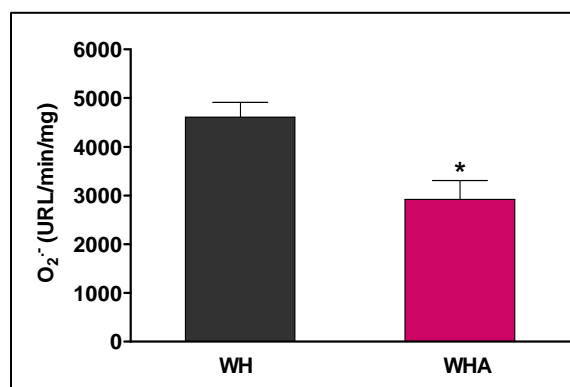
**Tabla 31** - Niveles de malonildialdehído (MDA) en plasma y en hígado en ratas Wistar hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> (WHA) durante 2 meses.

\*  $p < 0,05$  vs WH.

## 5.2.- Detección del anión superóxido en aorta

La producción basal de  $O_2^{\cdot -}$  en los anillos procedentes de ratas Wistar-hipercolesterolémicas control fue de  $108 \pm 23$  URL/min/mg, valor que no se modificó de manera significativa en el grupo tratado ( $123 \pm 21$  URL/min/mg).

En la figura 48 podemos observar que, cuando la producción de este anión se estimuló con NADPH, el tratamiento mostró un descenso significativo de los niveles.



**Figura 48** - Producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) en anillos de aorta estimulados con NADPH ( $10^{-4}$  M) en ratas Wistar-hipercolesterolémicas control (WH) y tratadas con Ometrix® (WHA) durante 2 meses. \*  $p < 0,05$  vs WH.

## ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS WISTAR CON DAÑO HEPÁTICO AGUDO

Este estudio se realizó para determinar la capacidad que los ácidos grasos omega 3/6/9 presentes en Ometrix® tienen para prevenir el daño que se produce por la administración de una única dosis de *t*-BHP (1,4 mmol/kg) 18 horas antes del sacrificio. Para ello, como se comentó en la metodología, se utilizaron ratas Wistar alimentadas con dieta estándar de las que la mitad reciben por vía oral mediante sonda gástrica una dosis diaria de 5 g/kg de Ometrix®.

A lo largo del estudio se controló el peso corporal de los animales, que no mostró diferencias en ningún momento entre los grupos control y tratados con Ometrix®. Una vez finalizados los 15 días de estudio, los animales se sacrifican y se les extrae y pesa el hígado. Como se observa en la tabla 32 el peso del hígado se incrementó en los animales que recibieron la inyección de *t*-BHP, por lo que al establecer la relación entre el peso del hígado y el peso corporal ésta fue mayor que la obtenida para sus correspondientes grupos controles (animales que no recibieron *t*-BHP).

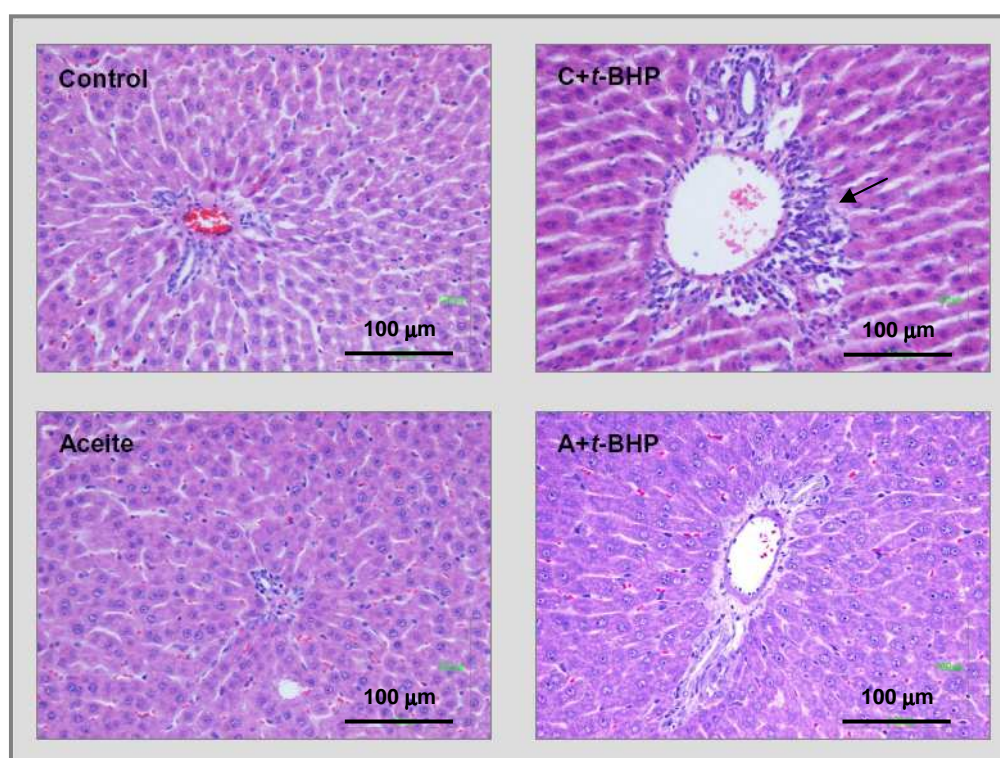
	Peso Corporal (g)	Peso Hígado (mg)	Híg/Peso (mg/g)
<b>C</b>	329 ± 5	8963 ± 349	27,6 ± 1,1
<b>C+<i>t</i>-BHP</b>	323 ± 5	10945 ± 206 *	33,9 ± 0,4 *
<b>A</b>	324 ± 4	9202 ± 217	28,4 ± 0,6
<b>A+<i>t</i>-BHP</b>	326 ± 7	10509 ± 210	32,2 ± 0,2 #

**Tabla 32** - Peso corporal, peso del hígado y relación entre ambos (Híg/Peso) de ratas Wistar: control (C), tratadas con Ometrix® 5 g/kg (A), control con administración de *t*-BHP (C+*t*-BHP) y tratadas con Ometrix® y con administración de *t*-BHP (A+*t*-BHP).

\*  $p < 0,05$  vs C y #  $p < 0,05$  vs C+*t*-BHP.

## 1.- Histología en hígado

Los estudios histológicos realizados en hígado muestran que la administración de *t*-BHP en los animales control produjo hepatitis tóxica que se manifiesta con un proceso inflamatorio con infiltración de neutrófilos localizado principalmente en la región periportal (indicado con una flecha en la figura 49). Estas alteraciones no aparecieron en los animales que recibieron Ometrix® y tras la administración de *t*-BHP los daños que se podujeron fueron mucho menores respecto a los que se observaron en el grupo C+*t*-BHP.



**Figura 49** - Fotomicrografías ópticas de cortes histológicos de hígado teñidos con hematoxilina-eosina de ratas Wistar: control (C), tratadas con Ometrix® 5 g/kg (A), control con administración de *t*-BHP (C+*t*-BHP) y tratadas con Ometrix® y con administración de *t*-BHP (A+*t*-BHP).

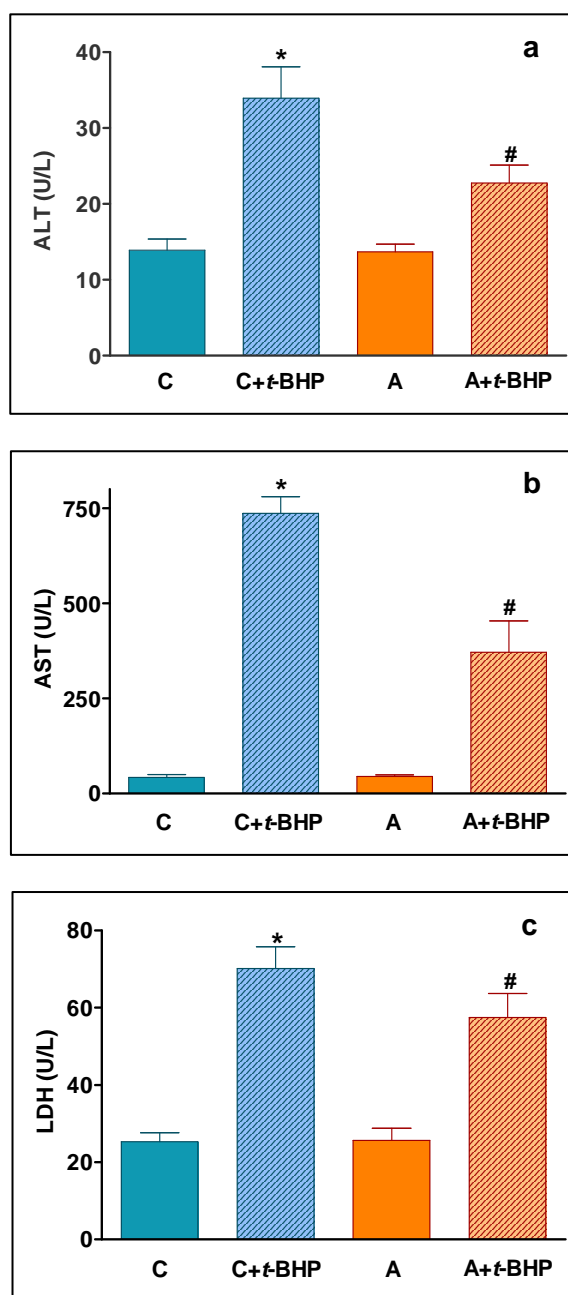
## 2.- Actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático agudo

La inyección de *t*-BHP en los animales control produjo un claro incremento de la actividad de las enzimas ALT, AST y LDH (Tabla 33). El tratamiento con Ometrix® no modificó la actividad basal de ninguna ellas, pero se observó un incremento menos acusado en los animales que previamente eran tratados con Ometrix® y recibieron la inyección de *t*-BHP 18 horas antes del sacrificio (Figura 50).

	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)
<b>C</b>	13,9 ± 1,5	41,9 ± 7,6	25,3 ± 2,3
<b>C+<i>t</i>-BHP</b>	34,0 ± 4,1 *	736,8 ± 43,9 *	70,2 ± 5,7 *

**Tabla 33** - Actividad de alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH) en ratas Wistar control (C) y control con administración de *t*-BHP (C+*t*-BHP). \*  $p < 0,05$  vs C.





**Figura 50** - Actividad de alanino aminotransferasa (ALT) (a), aspartato aminotransferasa (AST) (b) y lactato deshidrogenasa (LDH) (c) en ratas Wistar: control (C), tratadas con Ometrix® 5 g/kg (A), control con administración de t-BHP (C+t-BHP) y tratadas con Ometrix® y con administración de t-BHP (A+t-BHP).

\*  $p < 0,05$  vs C y #  $p < 0,05$  vs C+t-BHP.

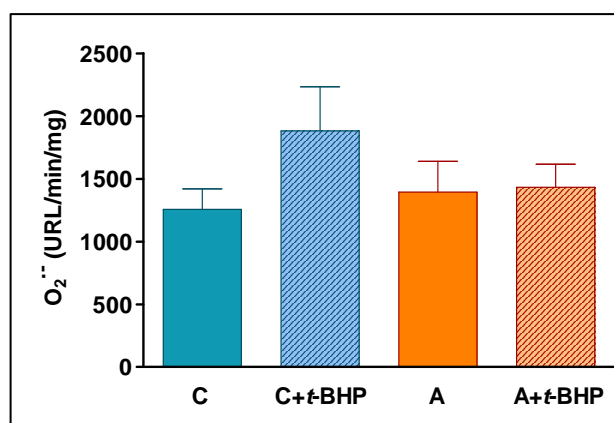
### 3.- Indicadores de estrés oxidativo

#### 3.1. - Detección del anión superóxido en aorta

Como puede observarse en la tabla 34 la administración de *t*-BHP incrementó ligeramente la producción de  $O_2^-$  únicamente en anillos de aorta estimulados con NADPH, aunque las diferencias no llegaron a alcanzar significancia estadística ( $p=0,056$ ). El tratamiento con Ometrix<sup>®</sup> por sí sólo no produce ninguna modificación en la señal que se registra en los anillos, estén estimulados o no. Cuando a los animales tratados con Ometrix<sup>®</sup> se les administra *t*-BHP no se modifica la producción basal de  $O_2^-$  pero se previene el incremento observado en su correspondiente grupo control (C-*t*-BHP) (Figura 51).

	BASAL (URL/min/mg)	ESTIMULADO (URL/min/mg)
<b>C</b>	128 ± 22	1254 ± 163
<b>C+<i>t</i>-BHP</b>	88 ± 12	1882 ± 350
<b>A</b>	87 ± 11	1395 ± 242
<b>A+<i>t</i>-BHP</b>	72 ± 13	1430 ± 185

**Tabla 34** - Producción de anión superóxido en anillos de aorta en condiciones basales y después de estimulación con NADPH ( $10^{-4}$  M) en ratas Wistar: control (C), tratadas con Ometrix<sup>®</sup> 5 g/kg (A), control con administración de *t*-BHP (C+*t*-BHP) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> y con administración de *t*-BHP (A+*t*-BHP).



**Figura 51** - Producción de anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en anillos de aorta estimulados con NADPH en ratas Wistar: control (C), tratadas con Ometrix<sup>®</sup> 5 g/kg (A), control con administración de *t*-BHP (C+*t*-BHP) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> y con administración de *t*-BHP (A+*t*-BHP).

### 3.2.- Peroxidación lipídica

La inyección de una dosis única de *t*-BHP no modificó de forma significativa los niveles de MDA ni en plasma ni en hígado de ratas Wistar alimentadas con dieta estándar. La administración de Ometrix® determinó una reducción significativa de los niveles plasmáticos de MDA tanto en los animales que recibieron *t*-BHP como en los que no lo recibieron. Los niveles de MDA en hígado no se modificaron por la administración de Ometrix® en ninguno de los 2 casos con respecto a sus correspondientes controles (Tabla 35).

	Plasma	Hígado
	MDA ( $\mu$ M)	MDA (nmol/g híg)
<b>C</b>	5,2 $\pm$ 0,4	14,4 $\pm$ 1,1
<b>C+<i>t</i>-BHP</b>	5,9 $\pm$ 0,4	16,4 $\pm$ 0,5
<b>A</b>	4,0 $\pm$ 0,2 *	14,8 $\pm$ 0,6
<b>A+<i>t</i>-BHP</b>	4,1 $\pm$ 0,2 #	16,8 $\pm$ 0,6

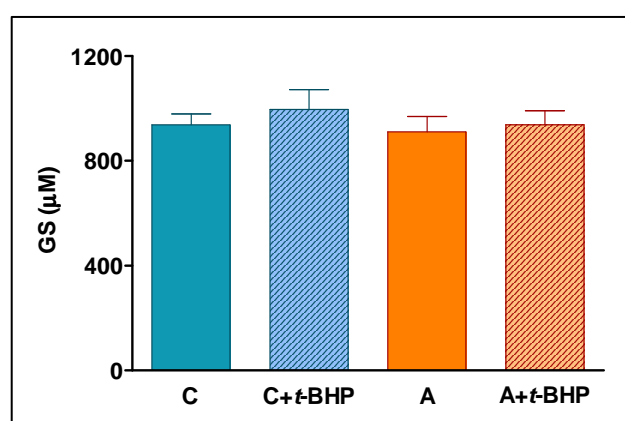
**Tabla 35** - Niveles de malonildialdehido (MDA) en plasma y en hígado en ratas Wistar: control (C), tratadas con Ometrix® 5 g/kg (A), control con administración de *t*-BHP (C+*t*-BHP) y tratadas con Ometrix® y con administración de *t*-BHP (A+*t*-BHP).

\*  $p < 0,05$  vs C y #  $p < 0,05$  vs C+*t*-BHP.

### 3.3.- Cuantificación de glutatión

#### En sangre

Como podemos apreciar en la figura 52 no existieron diferencias significativas en los niveles de GS entre los cuatro grupos de estudio. Sin embargo, si pudimos observar que en el grupo control que recibió *t*-BHP la concentración fue ligeramente superior a la del grupo control. En el grupo que recibió Ometrix® los valores fueron muy próximos, pero ligeramente inferiores de los del grupo control y se mantuvieron en niveles similares al control en los animales que además de Ometrix® recibieron *t*-BHP. No se pudo medir la cantidad de GSSG en estos animales y por ello tampoco establecer su estado redox.



**Figura 52** - Niveles de glutatión total (GS) en sangre en ratas Wistar: control (C), tratadas con Ometrix® 5 g/kg (A), control con administración de *t*-BHP (C+t-BHP) y tratadas con Ometrix® y con administración de *t*-BHP (A+t-BHP).

## En hígado

La administración de *t*-BHP a los animales control incrementó significativamente los niveles de GS y en menor grado los de GSSG. Los animales que recibieron Ometrix® presentaron unos valores más bajos de GS y GSSG que sus correspondientes controles. Debemos señalar que aunque la inyección de *t*-BHP no modificó el estado redox de los animales que no recibieron tratamiento, este parámetro sí sufrió un incremento significativo cuando la inyección se aplicó a animales tratados con Ometrix® (Tabla 36).

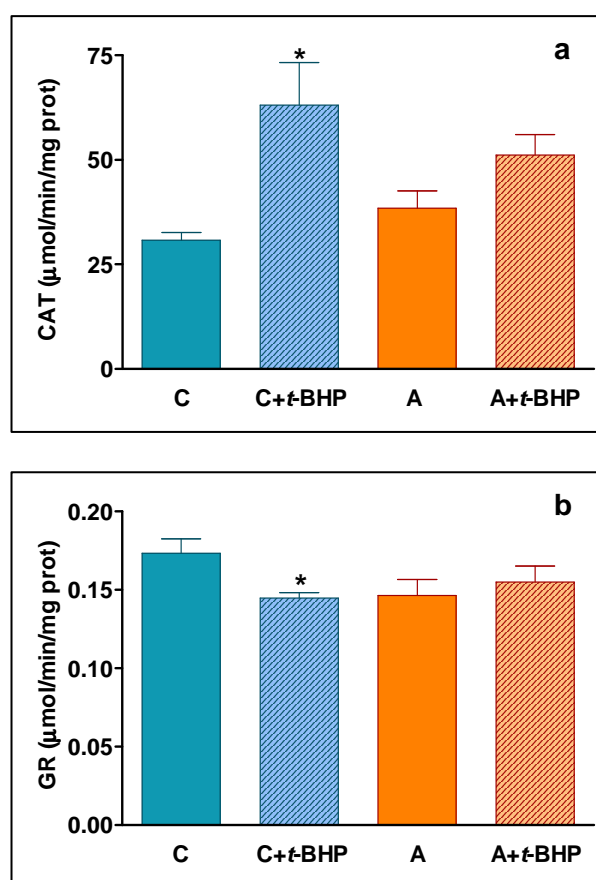
	<b>GS</b> ( $\mu\text{mol/g híg}$ )	<b>GSSG</b> ( $\mu\text{mol/g híg}$ )	<b>Estado redox</b>
<b>C</b>	4,3 $\pm$ 0,4	0,072 $\pm$ 0,004	58,2 $\pm$ 3,8
<b>C+<i>t</i>-BHP</b>	5,4 $\pm$ 0,3 *	0,083 $\pm$ 0,007	64,0 $\pm$ 3,2
<b>A</b>	2,8 $\pm$ 0,3 *	0,046 $\pm$ 0,010 *	55,8 $\pm$ 6,2
<b>A+<i>t</i>-BHP</b>	3,9 $\pm$ 0,2 #	0,048 $\pm$ 0,003 #	76,7 $\pm$ 4,1 #

**Tabla 36** - Niveles de glutatión total (GS), oxidado (GSSG) y estado redox en hígado en ratas Wistar: control (C), tratadas con Ometrix® 5 g/kg (A), control con administración de *t*-BHP (C+*t*-BHP) y tratadas con Ometrix® y con administración de *t*-BHP (A+*t*-BHP).

\*  $p < 0,05$  vs C y #  $p < 0,05$  vs C+*t*-BHP.

### 3.4.- Actividad de las enzimas antioxidantes en hígado

Como se puede ver en la figura 53 la inyección de *t*-BHP a los animales control produce un aumento significativo de la actividad de la CAT y una reducción de la actividad de la GR. El tratamiento con Ometrix® no produce ningún cambio significativo en la actividad de ninguna de las enzimas determinadas respecto a los niveles de los animales control (Tabla 37) y previene los cambios provocados por *t*-BHP en la actividad de CAT y GR.



**Figura 53** - Actividad de catalasa (CAT) (a) y glutatión reductasa (GR) (b) en hígado de ratas Wistar: control (C), tratadas con Ometrix® 5 g/kg (A), control con administración de *t*-BHP (C+*t*-BHP) y tratadas con Ometrix® y con administración de *t*-BHP (A+*t*-BHP).

\*  $p < 0,05$  vs C.

	<b>SOD</b>	<b>G-Px</b>	<b>GST</b>
	<b>(% inhibición XO/mg prot)</b>	<b>(<math>\mu</math>mol /min/mg prot)</b>	
<b>C</b>	2,6 $\pm$ 0,1	0,28 $\pm$ 0,03	1,71 $\pm$ 0,17
<b>C+t-BHP</b>	2,6 $\pm$ 0,1	0,23 $\pm$ 0,16	1,42 $\pm$ 0,15
<b>A</b>	2,7 $\pm$ 0,3	0,22 $\pm$ 0,01	1,76 $\pm$ 0,25
<b>A+t-BHP</b>	2,8 $\pm$ 0,2	0,20 $\pm$ 0,07	1,46 $\pm$ 0,17

**Tabla 37** - Actividad de superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (G-Px) y glutatión S-transferasa (GST) en hígado de ratas Wistar: control (C), tratadas con Ometrix<sup>®</sup> 5 g/kg (A), control con administración de t-BHP (C+t-BHP) y tratadas con Ometrix<sup>®</sup> y con administración de t-BHP (A+t-BHP).





*DISCUSIÓN*



La evidencia científica avala el papel positivo que una alimentación saludable tiene en la reducción de la incidencia de ECV. Sin embargo, la sociedad actual, incluyendo en ella países como el nuestro considerados típicamente mediterráneos, parecen alejarse de este patrón. El incremento en la ingesta de grasas saturadas, ácidos grasos *trans*, así como el desequilibrio entre los ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 ingeridos y el descenso en el consumo de frutas y verduras (fuentes de antioxidantes naturales) provocan un aumento del consumo energético que, unido al sedentarismo, hacen que las ECV se incrementen cada día más en las sociedades más industrializadas.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto que tiene la incorporación en la dieta de una mezcla de aceites rica en ácidos grasos  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 y  $\omega$ -9 (Ometrix<sup>®</sup>) sobre los cambios observados en la presión arterial, los lípidos plasmáticos, la reactividad vascular y el estado oxidativo que se generan como resultado de la hipertensión y/o la hipercolesterolemia.

Los ácidos grasos esenciales y muchos de sus metabolitos de cadena larga como EPA y DHA, han demostrado su eficacia en la reducción de la PAS<sup>149,150,151,152</sup> y los lípidos plasmáticos<sup>153,154</sup>, en animales de experimentación y en humanos. Pero estos estudios se han realizado en la mayoría de los casos en situaciones en las que se presenta sólo una patología.

Para evaluar el efecto de Ometrix<sup>®</sup> hemos utilizado ratas SHR, ya que son un modelo de HTA experimental ampliamente citado en la bibliografía debido a su similitud con la HTA primaria en humanos. Estos animales presentan numerosas alteraciones funcionales y estructurales de los órganos implicados en el control de la presión arterial y dichos cambios están relacionados y en parte determinados por la HTA. Además, en estos animales provocamos un estado de hipercolesterolemia mediante una dieta con alto contenido en colesterol (1% de colesterol y 0,25% de ácido cólico) para poder evaluar el efecto de Ometrix<sup>®</sup> cuando ambas patologías están presentes en el animal. Los resultados del tratamiento con Ometrix<sup>®</sup> sobre la HTA y la hipercolesterolemia se comparan con los obtenidos en animales de la misma cepa que no han tenido tratamiento, lo cual nos sirve para evaluar el papel que juegan dichas alteraciones en el desarrollo de lesiones cardiovasculares.

Todos los animales tienen libre acceso a las dietas hipercolesterolémica o hipercolesterolémica enriquecida con Ometrix<sup>®</sup>, para establecer si la mezcla de ácidos grasos omega 3/6/9 que lo componen es capaz de prevenir los efectos que provoca la hipercolesterolemia (tratamiento durante 2 meses con dieta con alto contenido en colesterol y Ometrix<sup>®</sup>) o de revertirlos (dieta hipercolesterolémica durante el primer mes y posteriormente incorporación de Ometrix<sup>®</sup> 2 meses más), cuando los animales son hipertensos y ver qué ocurre en el caso de animales con hipercolesterolemia y presión arterial normal (ratas Wistar tratadas durante 2 meses con dieta con alto contenido en colesterol y Ometrix<sup>®</sup>).

Previamente a estos estudios, se realizaron otros para determinar la influencia de la dieta hipercolesterolémica sobre la PAS, el perfil lipídico y la funcionalidad vascular en arteria aorta. Para ello utilizamos ratas SHR y Wistar que fueron alimentadas con dieta estándar (grupos controles, C o WC) o con alto contenido en colesterol (grupos hipercolesterolémicos, H o WH).

En nuestros experimentos los resultados demuestran que la dieta hipercolesterolémica incrementa los niveles plasmáticos de CT y LDLc sin que se modifiquen los de HDLc o los de TG, tanto en animales normotensos como hipertensos. Estos cambios en los lípidos plasmáticos tienen como consecuencia un incremento del índice aterogénico indicando un mayor riesgo cardiovascular en estos animales. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros autores<sup>155,156</sup> en el mismo tipo de animales, aunque utilizaron dosis más altas de colesterol que en nuestro caso.

Asociado a estos cambios, también observamos una pérdida de la función endotelial de las aortas de los animales hipercolesterolémicos, similar en las ratas hipertensas y normotensas determinado por la pérdida parcial de la relajación a ACh sin que esto se acompañara de cambios en los niveles de presión arterial (Figura 16). Esto pone de manifiesto que la hipercolesterolemia sola o asociada a hipertensión, sin cambios en la trigliceridemia, altera al menos parcialmente la función endotelial de arterias de conductancia en ratas Wistar y SHR como sucede en humanos<sup>157,158</sup>. Algunos autores, sin embargo, han demostrado que estos cambios en la función endotelial no se producen en ratas SHR con hipercolesterolemia<sup>159</sup> o incluso que es la hipertrigliceridemia pero no la

hipercolesterolemia la responsable de la disfunción endotelial<sup>160</sup>. Existe discrepancia en los resultados obtenidos, debido posiblemente a las diferentes condiciones experimentales como edad de los animales, proporción de colesterol en las dietas o duración de los estudios, entre otras.

La dieta rica en colesterol que utilizamos provocaba hipercolesterolemia y alteraciones en la función endotelial tanto en animales normotensos como hipertensos sin cambios en la trigliceridemia ni en los niveles de PAS. De esta manera podíamos valorar el efecto de la incorporación a la dieta de Ometrix® sobre el índice de riesgo cardiovascular y los cambios estructurales y funcionales en el sistema cardiovascular en animales con hipercolesterolemia sola o asociada a hipertensión genética.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que aunque no se producen diferencias en la evolución del peso de los animales a lo largo del estudio por la influencia de las distintas dietas, sí se producen cambios significativos en la cantidad de alimento ingerido, que es inferior en los animales que reciben Ometrix®. El comportamiento es similar tanto en los animales hipertensos como en los normotensos. Pensamos que este hecho pueda estar relacionado con el mayor aporte energético procedente de las grasas que incorpora Ometrix®.

Al revisar la bibliografía comprobamos que hay un gran número de artículos que recogen resultados de la influencia de diferentes tipos de dietas hipercolesterolémicas sobre el peso, el perfil lipídico y parámetros cardiovasculares en ratas pero pocos hacen referencia sobre la ingesta alimentaria, además, la gran variabilidad en los diseños experimentales y en la composición de las dietas dificultan mucho la posible comparación entre los resultados. En el estudio de Vecera y cols.<sup>161</sup> se utilizaron ratas Wistar alimentadas con una dieta estándar o con una dieta hipercolesterolémica (1% de colesterol) suplementada con un 10% de manteca o de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 procedentes de *Ribes nigrum*. A diferencia de lo que hemos observado en nuestro estudio ellos observaron que los animales que recibían la dieta hipercolesterolémica que incorpora un 10% de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 consumían mayor cantidad de alimento y tenían una menor ganancia de peso que los animales control y los que recibían una dieta hipercolesterolémica enriquecida en manteca. Sin embargo, existen dos aspectos

importantes en este estudio que hacen que los resultados no sean comparables con los obtenidos por nosotros. En primer lugar, el grupo control con el que comparan los resultados es un grupo que recibe dieta estándar sin suplemento de colesterol y por otro lado, la composición en ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 y su proporción relativa en la dieta de aceite procedente de *Ribes nigrum* es muy diferente a la de Ometrix®.

En el seguimiento de la PAS nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Frenoux y cols.<sup>152</sup> en ratas SHR, ya que observaron cómo una dieta enriquecida en AGPI reduce la PAS de una forma similar a la que hemos observado con Ometrix® a lo largo de los diferentes periodos de estudio. También estos autores, al igual que nosotros, observaron una ligera reducción de la PAS en ratas normotensas alimentadas con dietas ricas en AGPI, siempre manteniendo valores de normotensión. Estudios realizados con otros tipos de aceites ricos en AGPI y AGMI<sup>162</sup> también han demostrado descensos similares a los de nuestro estudio en la presión arterial de ratas SHR. Es ampliamente conocida la influencia que la ingesta de AGE tiene sobre el metabolismo de los ácidos grasos de las membranas celulares, modifica la formación de los diferentes eicosanoides que como hemos mencionado en esta memoria, pueden afectar a los niveles de presión arterial. Grimsgaard y cols.<sup>163</sup> sugieren que el incremento en estos AGE atenúa el desarrollo de la HTA en SHR y está asociado al descenso de la presión arterial. Igualmente Frenoux y cols.<sup>152</sup> indican como mecanismo responsable la inhibición que producen, fundamentalmente DHA y EPA, de las enzimas 5 y 6 desaturasa, modificando así la ruta de síntesis de eicosanoides y generando especies con características más vasodilatadoras que favorecen el descenso en la presión arterial. Otros autores atribuyen parte de la acción antihipertensiva al ácido  $\gamma$ -linolénico ya que modifica el sistema renina angiotensina aldosterona<sup>164</sup> además de favorecer la formación de prostaglandinas de la serie 2.

El mayor efecto relajante endotelio dependiente producido por ACh que hemos obtenido en aorta de los animales tratados con Ometrix®, ya sean SHR o Wistar, también apoya la propuesta de la participación de los ácidos grasos incorporados en la dieta tanto para la reducción de la presión arterial como para la mejora en la disfunción endotelial. En los estudios preliminares observamos que la

dieta hipercolesterolémica disminuía la relajación endotelio dependiente en aorta tanto de animales hipertensos como de normotensos. Aunque, como ya hemos comentado, algunos autores<sup>159,160</sup> no han observado esta pérdida de la relajación máxima en ratas hipercolesterolémicas, es un hecho ampliamente probado que en humanos la hipercolesterolemia perjudica la función endotelial incluso en ausencia de placas de ateroma y que dietas enriquecidas con aceites de pescado mejoran esta alteración<sup>157,158</sup>.

En anillos de arteria aorta la presencia de indometacina, un inhibidor de la COX, incrementó la relajación máxima a ACh en aorta en todos los grupos de animales hipertensos, tanto los controles hipercolesterolémicos como los que recibieron Ometrix<sup>®</sup> (Figura 21), pero no hubo diferencias entre los grupos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Engler<sup>122</sup> en ratas y por Goode y cols.<sup>165</sup> en arterias pequeñas humanas. En ambos casos se estudió la influencia de los ácidos grasos  $\omega$ -3/6/9 y aceites de pescado sobre la reactividad vascular indicando la implicación de ciertos prostanoideos de acción contracturante de la vía de la COX en el control de la relajación endotelio dependiente. En el caso de ratas normotensas, se redujo el efecto relajante tras la incubación únicamente de manera significativa en el grupo tratado. El estudio de Vizioli y cols<sup>166</sup> también muestra que en ratas Wistar se reduce la relajación con ACh obtenida tras la incubación con indometacina al desplazar la curva a la derecha. Estos autores sugieren que en torno al 20% de la relajación inducida por ACh se debe a la presencia de algunos prostanoideos de acción relajante que se producen por la vía de la COX en este tipo de animales.

Los prostanoideos que se generan por la vía de la COX dependen fundamentalmente de los ácidos grasos que estén presentes en la pared celular en ese momento. Es conocido que las PG y LT originados a partir de AA tienen un gran efecto proinflamatorio, también se sabe que EPA y DHA compiten con el AA para unirse con la COX y las especies que se generan a partir de estos ácidos grasos son menos vasoconstrictoras e incluso vasodilatadoras, como la PGI<sub>2</sub> y la PGI<sub>3</sub><sup>99,167</sup>. En este sentido podemos explicar lo que ocurre con las relajaciones a ACh tanto en los animales hipertensos como normotensos. En estados patológicos como la hipercolesterolemia y la HTA existe un desequilibrio hacia la

vasoconstricción lo que reduce el efecto relajante inducido por ACh. El tratamiento con Ometrix<sup>®</sup> incrementa las concentraciones de EPA y DHA en la membrana y con ello las PG y LT que se producen son menos contracturantes mejorando la relajación vascular.

Cuando en aorta de ratas SHR se inhibe la vía de la COX mediante indometacina, dejan de sintetizarse productos vasoconstrictores tales como PGH<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub><sup>168</sup>, lo cual aumenta la relajación en este lecho vascular. Este hecho se observa de manera similar en los ensayos realizados en aorta de SHR de nuestro estudio por lo que la producción de prostanoides menos contracturantes por la vía de la COX está implicada en la mejora de la función endotelial producida por Ometrix<sup>®</sup>. Por el contrario, en ratas Wistar los prostanoides que se originan por la vía de la COX facilitan la relajación endotelio dependiente, por lo que al inhibir esta enzima puede dificultarse la relajación como ocurre en las Wistar tratadas de nuestro estudio.

La relajación producida por ACh en las arterias de conductancia está mediada principalmente por la acción del NO, sin embargo, en arterias de resistencia como las mesentéricas o las renales, aunque se sabe que la ACh es un potente vasodilatador los mecanismos implicados en la respuesta no están claramente definidos y algunos autores han observado que depende también de otros factores como el FHDE <sup>129,169,170</sup>.

A diferencia de la arteria aorta, en lecho vascular renal y mesentérico no se observaron modificaciones en la respuesta relajante por efecto del tratamiento con Ometrix<sup>®</sup>, independientemente del tiempo que llevara instaurada la hipercolesterolemia. Únicamente pudimos apreciar cierta mejoría en las ratas Wistar hipercolesterolémicas tratadas, en las curvas realizadas con ACh en lecho vascular renal. Estos resultados nos permiten pensar que los FHDE no se modifican por la presencia de los ácidos grasos  $\omega$ -3/6/9 contenidos en Ometrix<sup>®</sup>.

Se ha demostrado ampliamente que en HTA y otras patologías como diabetes, síndrome metabólico, etc. aparecen alteraciones funcionales y estructurales del sistema vascular provocando un estado de disfunción endotelial. El hecho que inhibidores de la COX reduzcan los niveles de presión una vez establecida la HTA en SHR<sup>171</sup>, ha llevado a pensar que en estos animales no existe



una menor liberación de NO<sup>172</sup> sino un aumento de la producción de algún factor endotelial constrictor derivado de COX. Este podría ser tanto PGH<sub>2</sub> como TXA<sub>2</sub>. La producción exagerada de radicales libres como los O<sub>2</sub><sup>-</sup> que *per se* tienen acción contracturante y además tienen capacidad para oxidar el NO formando ONOO<sup>-</sup> con acción contracturante, podrían ser también los responsables de dicha disfunción endotelial<sup>173</sup>.

En el trabajo de García-Cohen y cols.<sup>174</sup> realizado en aorta de SHR y Wistar Kyoto para estudiar los posibles mecanismos implicados en la respuesta que produce *t*-BHP, se sugiere que la contracción está mediada por metabolitos de la COX, principalmente de la isoforma 2, probablemente PGH<sub>2</sub> y algunos isoprostanoideos. Teniendo esto en cuenta, el efecto que tiene el tratamiento con Ometrix<sup>®</sup> al reducir la contracción que produce *t*-BHP puede ser debida a que las PG que se originan desde EPA y DHA (presentes en la mezcla de aceites) por la vía de la COX tienen una potencia contracturante menor.

La disfunción endotelial, definida como un desequilibrio entre factores vasoactivos, es un evento primario en la fisiopatología de la aterosclerosis y la HTA y un predictor de mal pronóstico<sup>41</sup>. Las alteraciones clave en los factores vasoactivos características de la disfunción endotelial incluyen una reducción en la producción basal de NO y un aumento de la liberación de ERO, endotelina-1 y prostanoideos vasoconstrictores. Cuando valoramos la biodisponibilidad de NO en aorta observamos que los valores entre los grupos control hipercolesterolémico y tratado fueron similares tanto si los animales eran hipertensos como normotensos y la incorporación de Ometrix<sup>®</sup> a la dieta no modificó este parámetro en ninguno de los grupos estudiados.

En cuanto a la relajación endotelio independiente que realizamos en aorta con NTP, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por diferentes grupos de investigación. En el estudio de López y cols.<sup>175</sup> se compara el efecto del aceite de maíz, rico en  $\omega$ -6, con el del aceite del pescado *Brevoortia tyrannus*, rico en  $\omega$ -3, observando que la relajación endotelio independiente es similar en los dos grupos de estudio. Tampoco en el estudio realizado por Christon y cols.<sup>176</sup> se observan modificaciones en la relajación endotelio independiente obtenida de anillos de aorta

de ratas Sprague-Dawley incubados con EPA o DHA directamente en el baño de órganos, respecto a la respuesta obtenida de anillos sin incubación previa.

De igual manera nosotros no observamos diferencias en la respuesta a NTP como consecuencia de la incorporación de Ometrix<sup>®</sup>, ni en el grupo de animales hipertensos (Figura 22) ni normotensos (Figura 41) lo que indica que la respuesta al NO no se ve afectada.

El hígado es el órgano fundamental para el metabolismo lipídico, transforma las grasas aportadas por la dieta en TG, colesterol y fosfolípidos que, posteriormente son distribuidos al resto del organismo mediante las distintas fracciones lipoproteicas. Una parte se destina a cubrir las necesidades nutricionales de las células y otra se almacena como fuente de energía potencial en el tejido adiposo. La composición de las grasas de la dieta, más que la cantidad, influye directamente en el perfil plasmático de los lípidos. Numerosos estudios llevados a cabo en humanos han demostrado que la sustitución de las grasas saturadas en la dieta por grasas insaturadas, principalmente en forma de aceite de oliva, da lugar a un descenso de los niveles de CT y de LDLc que se acompaña de un aumento de HDLc<sup>177,178</sup>.

Los AGPI producen principalmente una reducción en las concentraciones plasmáticas de TG, proporcional a los niveles previos presentes en plasma. Se han propuesto varios mecanismos para explicar este efecto. Tras una comida con alto contenido graso se produce en el hígado una respuesta lipémica posprandial, que resulta más elevada cuanto más saturada sea la grasa ingerida, con las grasas insaturadas se produce una menor elevación postprandial de los TG, que es mínima con dietas ricas en  $\omega$ -3. Este efecto está mediado por el PPAR- $\alpha$  y el PPAR- $\gamma$  que inducen la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y la adipogénesis<sup>114</sup>.

Numerosos autores han descrito que dietas con alto contenido en colesterol producen incrementos en distintas fracciones lipídicas en plasma<sup>155,156</sup>. Al igual que en estos trabajos, en los estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, mostramos cómo la dieta con alto contenido en colesterol produce en animales hipertensos y normotensos un incremento en las concentraciones plasmáticas de CT, LDLc y una elevación del IA. Esto refleja que el cambio de dieta modifica el perfil lipídico en plasma y da lugar a un estado hipercolesterolémico desde el que

podemos evaluar la eficacia de la mezcla de ácidos grasos  $\omega$ -3/6/9 en la mejoría del perfil lipídico plasmático. De esta manera la reducción significativa en las concentraciones plasmáticas de CT, TG y LDLc que se produjeron en los animales alimentados con Ometrix<sup>®</sup> muestra su eficacia en el control lipídico. Los distintos modelos experimentales utilizados en este trabajo nos permiten afirmar que estos ácidos grasos evitan la elevación de las concentraciones de CT, TG y LDLc tanto en animales hipertensos como normotensos. Igualmente podemos afirmar que Ometrix<sup>®</sup> reduce los niveles de CT y LDLc en los animales que tienen la hipercolesterolemia ya establecida. Al no modificarse la concentración de HDLc o incluso elevarse en los animales que empiezan el tratamiento cuando la hipercolesterolemia está establecida, el índice aterogénico resulta mucho menor en los animales que reciben Ometrix<sup>®</sup>. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Yuan y cols.<sup>179,180</sup> que investigaron la influencia del tipo de grasa, saturada (mantequilla o sebo) o insaturada (aceite de soja rico en  $\omega$ -6 o del pez *Brevoortia tyrannus* rico en  $\omega$ -3), sobre los lípidos plasmáticos en animales SHR y Wistar Kyoto alimentados con dieta normocolesterolémica (0,5% colesterol) o hipercolesterolémica (5% colesterol). Estos autores observaron que la fuente de grasa y la raza influyen en las concentraciones de CT plasmático. Las ratas alimentadas con la dieta hipercolesterolémica mostraron niveles superiores de CT y un mayor IA que las alimentadas con la dieta normocolesterolémica aunque este incremento fue mucho menor con la dieta enriquecida con el aceite rico en  $\omega$ -3 que con las otras fuentes de grasa.

Las concentraciones de CT y de TG determinadas en hígado fueron superiores en los animales tratados con Ometrix<sup>®</sup> que en sus respectivos controles hipercolesterolémicos. Estas diferencias fueron especialmente marcadas en las ratas normotensas. Al igual que ocurría con las concentraciones de lípidos en plasma en los estudios preliminares también se observaron incrementos en las concentraciones de CT y TG determinadas en hígado de animales alimentados con dieta hipercolesterolémica respecto a animales que recibieron dieta estándar, tanto si los animales eran hipertensos como si eran normotensos. Teniendo en cuenta que los niveles plasmáticos de CT son mucho menores en los animales alimentados con Ometrix<sup>®</sup>, los resultados obtenidos en hígado pueden ser debidos

a que el colesterol que ingieren se acumula en este órgano en lugar de estar circulante en la sangre.

Los estudios llevados a cabo por Perona y cols.<sup>181</sup> donde determinan la composición de los lípidos hepáticos en SHR alimentadas con dietas enriquecidas en aceite de oliva y en aceite de girasol rico en ácido oleico, ambos con alto contenido en  $\omega$ -9, también apuntan en este sentido. Con ambas dietas se incrementaron los niveles de TG y de lípidos totales en hígado con respecto a los animales control alimentados con dietas estándar aunque no se observaron diferencias entre las dietas enriquecidas.

Por otra parte Vecera y cols.<sup>161</sup> estudiaron el CT y los TG hepáticos en ratas Wistar. Estos autores, al igual que nosotros, observaron que las dietas hipercolesterolémicas enriquecidas en manteca o en *Ribes nigrum* (rico en  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6) incrementaron los niveles de CT en hígado respecto al que mostraron animales alimentados con dieta estándar. A diferencia de nuestros estudios ellos observaron que el incremento en los niveles de TG se produjo únicamente en el grupo hipercolesterolémico enriquecido con manteca y que no existieron diferencias significativas en los niveles de CT entre las dietas hipercolesterolémicas enriquecidas.

Además en nuestros experimentos observamos un incremento en la relación entre el peso del hígado y el peso corporal en los animales hipertensos que recibieron Ometrix® con respecto a los que sólo recibieron la dieta hipercolesterolémica. La dieta hipercolesterolémica enriquecida con Ometrix® agrava estos hechos ya que se incrementa aún más el contenido lipídico y la esteatosis que se observa a nivel histológico (Figura 31). Estos resultados coinciden con lo observado por otros autores<sup>182,183</sup> en ratas que reciben dietas hipercolesterolémicas, en las que se produce una acumulación de grasas a nivel hepático.

Aunque Buettner y cols.<sup>183</sup> observaron mejoría en la esteatosis que mostraban animales alimentados con dieta hipercolesterolémica enriquecida con aceites de pescado respecto a animales con dieta hipercolesterolémica enriquecida con manteca, Cintra y cols.<sup>182</sup> no observaron esta mejoría en animales alimentados con dieta hipercolesterolémica enriquecida con manteca y trucha mostrando cortes

histológicos con grandes acúmulos grasos de manera similar a lo que ocurre en nuestro estudio con el tratamiento con Ometrix®. Las diferentes composiciones de las dietas de estos estudios dificulta la comparación entre los resultados obtenidos por estos autores y los nuestros.

La HTA produce una serie de modificaciones en el sistema vascular encaminadas a compensar el incremento en la presión arterial. Es un factor determinante en la aparición de hipertrofia cardíaca que se manifiesta principalmente en el ventrículo izquierdo y se debe a un aumento en el tamaño o número de cardiomiocitos y a la hiperplasia de fibroblastos, produciéndose en último término fallo cardíaco.

Está descrito que las ratas SHR desarrollan hipertrofia ventricular izquierda (HVI) de manera progresiva<sup>184</sup>, en nuestros experimentos los animales hipertensos presentan una clara HVI si comparamos sus valores de la relación peso VI/ peso corporal con los obtenidos en nuestro laboratorio con ratas Wistar Kyoto<sup>185,186,187</sup> o con los obtenidos en este trabajo con ratas Wistar.

Ometrix® reduce ligera pero significativamente la HVI en los dos grupos de animales hipertensos estudiados, poniendo de manifiesto que tiene un cierto efecto cardioprotector que podría estar relacionado con el efecto antihipertensivo observado también en nuestros experimentos. Esto no lo observamos en las ratas normotensas porque son animales que no tienen hipertrofia establecida.

Dietas enriquecidas en aceites de pescado han demostrado que pueden modular la composición de los ácidos grasos de las membranas de los cardiomiocitos de manera dosis dependiente y que dosis relativamente pequeñas producen grandes cambios en la composición de las membranas cardíacas que se relacionan con menor riesgo de ECV. En modelos animales, el efecto que tienen los ácidos grasos mono y poliinsaturados sobre el corazón incluye la prevención de arritmias, descenso de la fibrilación ventricular, reducción en el daño que produce la isquemia al reducir las necesidades de oxígeno, prevención del fallo cardíaco y la mejora en la hipertrofia cardíaca<sup>188</sup>. En distintos modelos animales de HTA se ha descrito cómo los AGPI, principalmente DHA y EPA, mejoran la hipertrofia cardíaca. En el modelo de hipertensión por estenosis de la arteria renal izquierda Rousseau y cols.<sup>189</sup> ponen de manifiesto que una dieta enriquecida en DHA y EPA

mejora la hipertrofia cardíaca y reduce la presión arterial. Estos autores indican que la incorporación de DHA y EPA a la membrana de las células interfiere en el metabolismo celular a nivel de la enzima convertidora de angiotensina y que este puede ser el mecanismo por el que se reduce tanto la hipertrofia cardíaca como la presión arterial en este modelo animal.

Sin embargo, otros autores como Mitasikova y cols.<sup>190</sup> que utilizaron ratas SHR viejas (14 meses) a las que se administró 20 mg/día de AGPI, no observaron modificación en la hipertrofia cardíaca, aunque sí se suprimió la fibrilación ventricular inducida y se redujo la presión arterial. Estas mejorías las atribuyen a las modificaciones en la membrana celular producidas por la integración en la misma de los AGPI. El hecho de que no se modifique la hipertrofia cardíaca puede ser debido a la avanzada edad de los animales utilizados.

Además de alteraciones en el músculo cardíaco, los cambios hemodinámicos y humorales presentes en la HTA afectan también a la estructura de los vasos sanguíneos. La HTA mantenida en el tiempo expone a las arterias a una sobrepresión que hace que éstas adapten las paredes y el lumen para soportar ese incremento en la presión arterial, produciéndose un remodelado vascular. Así, existen procesos hipertróficos que aparecen fundamentalmente en las arterias de conductancia, y que se relacionan con el incremento en el CSA, se modifique o no el lumen y procesos eutróficos en los que el CSA no se modifica y suele reducirse el lumen<sup>191</sup>. Hemos realizado estudios morfométricos en arterias de conductancia (aorta) y de resistencia (arterias intrarrenales) valorando el CSA, el grosor de la pared, el lumen y la relación entre grosor y lumen. Estos parámetros permiten evaluar si existen procesos de remodelado vascular y si éstos se modifican con el tratamiento.

Estudios en animales y en humanos indican que EPA y DHA presentes en los aceites de pescado pueden proteger contra lesiones cardiovasculares como la aterosclerosis mediante la inhibición de la proliferación de las CMLV<sup>192</sup>, causando la apoptosis de este tipo de células<sup>193</sup>.

En las ratas SHR tratadas con Ometrix® se produce una reducción del CSA y del grosor de la pared que podría ser debida a que los AGPI presentes en nuestra mezcla de aceites inhiban el crecimiento de las CMLV mediante la supresión del

TGF- $\beta$  al igual que lo observaron Nakayama y cols.<sup>107</sup> con EPA en cultivos celulares de CMLV.

Además la mejoría en los procesos de remodelado a nivel de la arteria aorta se correlacionan con el incremento en la relajación endotelio dependiente y con la reducción de la presión arterial observada en los animales alimentados con Ometrix<sup>®</sup>, confirmando que la mezcla de aceites utilizada mejora el estado funcional y la estructura de las arterias de conductancia.

En el caso de las arterias de resistencia, intrarrenales, el análisis morfométrico mostró que el tratamiento incrementó el lumen sin modificar el CSA ni el grosor de la pared por lo que la relación grosor-lumen se redujo, invirtiendo los fenómenos de remodelado eutrófico que aparecen en los vasos de los animales control hipertensos e hipercolesterolémicos. Estas reducciones sólo fueron estadísticamente significativas en el grupo que recibe desde el inicio Ometrix<sup>®</sup> y no llegaron a serlo cuando el tratamiento comienza con la hipercolesterolemia ya establecida. Aunque la HTA modifica la morfología de los vasos, la reducción de la presión arterial con antihipertensivos no asegura que el remodelado se corrija. Recientemente se han estudiado muchos de los antihipertensivos utilizados y se ha visto que la mayoría de los  $\beta$ -bloqueantes aunque reducen la presión arterial no mejoran el remodelado mientras que, de manera general, los inhibidores de la ECA, los antagonistas de receptores de angiotensina II y los antagonistas del calcio sí lo hacen<sup>194</sup>, por lo que el incremento en el lumen y la reducción en la relación grosor-lumen que se produce con el tratamiento no sólo están relacionados con la reducción en la presión arterial sino que puede compartir mecanismos de acción similares a los que producen IECA, ARA II o los antagonistas del calcio.

Como se ha comentado anteriormente, en estados hipertensivos es habitual que exista un incremento en la síntesis de  $O_2^{\cdot-}$  y esto reduzca la cantidad de NO disponible al formarse ONOO<sup>-</sup>. Este exceso de  $O_2^{\cdot-}$  y de ONOO<sup>-</sup> debe metabolizarse y eliminarse cuanto antes para evitar que se produzca disfunción endotelial. La determinación de  $O_2^{\cdot-}$  mediante luminiscencia con lucigenina ha sido ampliamente utilizada para valorar la producción de radicales  $O_2^{\cdot-}$  en lechos

vasculares que muestran alteraciones de la función endotelial en distintos estados patológicos como la HTA<sup>195</sup>, la hipercolesterolemia<sup>196</sup> y la diabetes mellitus<sup>197</sup>.

En nuestros experimentos hemos estudiado la producción basal de  $O_2^{\cdot-}$  y la estimulada con NADPH en anillos de aorta y no encontramos diferencias en ninguno de los valores entre los animales hipertensos e hipercolesterolémicos que recibieron Ometrix<sup>®</sup> y sus correspondientes controles. Sin embargo, la dieta hipercolesterolémica en los animales normotensos produjo un incremento significativo de la cantidad de  $O_2^{\cdot-}$  respecto a los animales alimentados con dieta estándar (Tabla 34) que fue menor en los animales normotensos tratados con Ometrix<sup>®</sup>. El gran incremento de  $O_2^{\cdot-}$  que se produce en los animales normotensos e hipercolesterolémicos comparado con los niveles en ratas hipertensas e hipercolesterolémicas puede estar relacionado con la adaptación de las SHR a una mayor producción de  $O_2^{\cdot-}$ . Por otra parte, la hipercolesterolemia en ratas normotensas provocaría un incremento en la cantidad de  $O_2^{\cdot-}$  que este tipo de animales no es capaz de amortiguar y que el tratamiento sí consigue reducir significativamente.

El estrés oxidativo es el término comúnmente usado para indicar el desequilibrio entre las concentraciones de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno y de cómo las defensas antioxidantes del organismo controlan su equilibrio. Este desequilibrio juega un papel muy importante en muchas patologías como la HTA y la hipercolesterolemia como se comentó ampliamente en la introducción<sup>31,43,55,56,57</sup>. Para controlar este equilibrio, el organismo está dotado de un complejo sistema de detoxificación de ERO compuesto de enzimas como la SOD, la CAT o la G-Px y por moléculas de bajo peso molecular como el glutatión que actúan estabilizando las ERO y los lipoperóxidos al donar un  $H^+$  y así limitar los daños que estos producen en diferentes tejidos como el corazón, el hígado o el riñón.

Pero el término estrés oxidativo no está bien definido y existen más de 40 índices diferentes para establecerlo. Dotan y cols.<sup>198</sup> realizaron una revisión de los métodos más utilizados para su determinación, estudiando si alguno es más útil que otro o si existen relaciones entre los diferentes métodos.



En el presente trabajo se han realizado las determinaciones que más habitualmente se recogen en la bibliografía como concentraciones de MDA, de GSH y GSSG y se ha cuantificado la actividad de las enzimas principales del sistema antioxidante: la SOD, la CAT, la G-Px, la GR y la GST.

La determinación de MDA a nivel plasmático no mostró diferencias significativas entre los grupos controles y tratados ni en animales hipertensos ni en normotensos. Sin embargo, a nivel hepático, el tratamiento con Ometrix® incrementó los niveles de MDA en todos los estudios realizados. Este incremento también lo observaron Brandsch y cols.<sup>199</sup> con ratas SHR alimentadas con dietas enriquecidas en ácidos grasos  $\omega$ -3 (aceite de salmón) frente a ratas alimentadas con dietas enriquecidas en grasas saturadas (manteca). Ellos comprobaron que, tanto en plasma como en hígado, las grasas saturadas sufren menor grado de oxidación que las grasas insaturadas debido al mayor número de dobles enlaces de estas últimas. De esta manera demuestran la susceptibilidad de los AGPI a la oxidación. A pesar de esto hay que tener en cuenta que la medida de MDA es inespecífica del grado de lipoperoxidación y que existen otros indicadores.

El GSH juega un papel muy importante en la defensa contra el daño oxidativo al eliminar radicales libres del medio mediante la conjugación con ellos<sup>200</sup>. El incremento en los niveles de glutatión a nivel sanguíneo debe considerarse como un mecanismo de defensa en respuesta al incremento del estado oxidativo. Como ya hemos mencionado, tanto la HTA como la hipercolesterolemia están relacionados con un incremento en el estrés oxidativo. Los niveles en sangre de GSH son un indicador fiable del estado antioxidante del organismo<sup>201</sup>.

En nuestros experimentos hemos obtenido niveles de glutatión total en sangre menores en los animales hipertensos que recibieron Ometrix® simultáneamente a la dieta hipercolesterolémica desde el inicio del estudio con respecto al grupo control, mientras que este efecto no se observa en el grupo de animales hipertensos que recibieron Ometrix® cuando la hipercolesterolemia estaba previamente establecida. Esto se acompaña de un incremento en los niveles de glutatión total y disminución de GSSG en hígado que nos indicaría que Ometrix® puede inducir cambios pro-oxidantes en los indicadores de estrés oxidativo en sangre y a su vez mejorar el estado oxidativo a nivel hepático.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Vecera y cols.<sup>161</sup> donde se pone de manifiesto que ratas alimentadas con dieta hipercolesterolémica y aceite de grosellas (ricas en  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6) presentan cambios pro-oxidantes en los marcadores de estrés oxidativo en sangre, con un descenso de las concentraciones de glutatión en sangre sin cambios en los niveles de TBARS en plasma y acompañado de un incremento del glutatión total en hígado. Estos autores concluyen que la incorporación de aceite de grosellas a una dieta hipercolesterolémica podría tener efectos adversos sobre el estado oxidativo, especialmente en plasma, aunque observan efectos beneficiosos sobre el metabolismo de lípidos en el hígado, como hemos comentado anteriormente. Además, el incremento de los niveles de GS en hígado junto con el descenso de GSSG, se ha sugerido como mecanismo compensatorio que reflejaría la mayor capacidad del hígado para soportar un incremento en el estrés oxidativo que los eritrocitos<sup>200,202,203</sup>.

El daño oxidativo es común en numerosas enfermedades incluyendo la HTA. En estudios con animales y humanos se ha demostrado que la presión sanguínea está inversamente relacionada con la actividad de la SOD y la concentración de GSH<sup>204,205</sup>. Además, las ERO y los productos de la peroxidación lipídica afectan a la actividad enzimática como muestran Pigeolet y cols.<sup>206</sup> en un estudio en el que altas concentraciones de diferentes peróxidos y  $O_2^{\cdot -}$  inactivan las enzimas SOD, G-Px y CAT dando lugar a un proceso que desemboca en muerte celular. La GR regenera el GSH de su forma oxidada que se produce con la actividad de la G-Px, por lo que una actividad alta de GR indica mayor capacidad del organismo para controlar el equilibrio oxidativo.

Por todo esto, el incremento detectado en las actividades enzimáticas de SOD, CAT y GR en los animales tratados con Ometrix<sup>®</sup> indica mayor capacidad para amortiguar la presencia de ERO incrementada debido a la HTA de los animales. No se observaron diferencias en la actividad de G-Px mientras que la actividad de GST sólo se incrementó en los animales tratados tras establecer la hipercolesterolemia. En los estudios de Yuan y cols.<sup>180,207</sup> se muestra cómo el colesterol y el tipo de grasa (saturada o insaturada) incorporado en la dieta de SHR, influye en la actividad de las enzimas que pertenecen al sistema de defensa

antioxidante. Estos autores indican que los animales alimentados con dietas ricas en grasas insaturadas  $\omega$ -3 presentan una actividad mayor de las enzimas hepáticas CAT y GR que las ratas alimentadas con grasas insaturadas  $\omega$ -6. En estos estudios no se observaron modificaciones en las actividades de SOD y G-Px. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por este grupo en relación al incremento de actividad de las enzimas CAT y GR y al mantenimiento de la actividad G-Px en las SHR hipercolesterolémicas tratadas con Ometrix<sup>®</sup> pero existen discrepancias en cuanto a la actividad de SOD. Las diferencias en el modelo experimental pueden explicar estas variaciones ya que los animales del estudio de Yuan y cols. se alimentan con dietas ricas en un solo tipo de grasa, saturada, insaturada  $\omega$ -6 o insaturada  $\omega$ -3, mientras que la mezcla de aceites que componen Ometrix<sup>®</sup> es más equilibrada entre los distintos tipos de grasa (1:1 entre  $\omega$ -6/ $\omega$ -3). A esto podemos añadir que en estos estudios de Yuan y cols. no existe un grupo control hipercolesterolémico al que no se le incorpore en la dieta algún tipo de grasa y con ello sólo se observe la influencia del colesterol sobre la actividad de las enzimas antioxidantes sin que puedan estar moduladas por el tipo de grasa.

El incremento en la actividad de GR ha de relacionarse con el incremento en los niveles de GS, en hígado, detectado en los animales tratados así como con las menores concentraciones de GSSG, también en hígado, en estos animales, ya que la GR regenera el GSH desde su forma oxidada mediante el consumo de NADPH. Además las ratas SHR hipercolesterolémicas muestran altos niveles de GSSG que se corresponden con bajas actividades de la GR con lo que claramente existe una mayor facilidad para regenerar GSH en el organismo de los animales tratados con Ometrix<sup>®</sup>.

## ESTUDIOS CON OMETRIX® EN RATAS WISTAR CON DAÑO HEPÁTICO AGUDO

El *t*-BHP puede ser metabolizado por dos vías diferentes, una implica al citocromo p450 dando lugar a la formación de radicales libres intermedios que inician la peroxidación lipídica, afectando la integridad celular y formando enlaces covalentes con moléculas dentro de las células que producen daño y posterior muerte<sup>208</sup>. La segunda ruta metabólica implica la G-Px y a su sustrato GSH, generando inicialmente *t*-butanol y GSSG, que altera la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> e incrementa la formación de ERO<sup>209,210</sup>.

Los peróxidos lipídicos, generados tanto por la presencia de *t*-BHP como por otras sustancias que provocan estrés oxidativo, causan hepatotoxicidad incrementando la actividad a nivel plasmático de ALT, AST y LDH, la formación de MDA y la depleción de GSH en plasma e hígado. Así el *t*-BHP ha sido utilizado como inductor químico para generar modelos animales con daño hepático<sup>209,210,211</sup>.

Es conocida la influencia que los AGPI tienen sobre el sistema de defensa antioxidante del organismo, actuando en ocasiones como productores de lipoperóxidos y en otras facilitando la eliminación de ERO, como ya se ha comentado a lo largo de esta memoria. En el presente trabajo quisimos valorar si los ácidos grasos omega 3/6/9 presentes en Ometrix® son capaces de amortiguar el daño oxidativo agudo producido por la administración de *t*-BHP.

El incremento producido por la administración de *t*-BHP 18 horas antes del sacrificio en la actividad de las enzimas ALT, AST y LDH mostró que el daño hepático agudo se había producido. ALT es una enzima de localización principalmente en el hígado, mientras que AST es una enzima que se distribuye también en otros órganos (corazón, cerebro, riñón, etc.) por lo que los elevados niveles encontrados en el plasma de los animales controles que reciben *t*-BHP (C+*t*-BHP) podría indicar que se ha producido daño también en otros órganos. El tratamiento con Ometrix® no alteró la actividad basal de estas enzimas pero sí controló el incremento debido al daño tóxico provocado por el *t*-BHP, ejerciendo un efecto protector a nivel hepático.

Por otra parte, observamos un incremento de la relación peso hígado/peso corporal en los animales que recibieron *t*-BHP (Tabla 32) que podría estar indicando que existe un estado de hipertrofia en el hígado. Estado de hipertrofia que se reduce de manera significativa cuando los animales han recibido Ometrix® antes de la inyección de *t*-BHP.

El daño hepático se confirma también a nivel histológico, observándose cómo la administración de *t*-BHP produce a los animales control un proceso inflamatorio especialmente a nivel del espacio porta. Este efecto está ausente cuando se administra previamente Ometrix®.

El MDA es uno de los principales productos de degradación de los ácidos grasos de las membranas celulares y se ha demostrado que tiene actividad hepatotóxica y genotóxica<sup>212</sup>. Se utiliza como indicador de la peroxidación lipídica e informa de la capacidad biológica para soportar estrés oxidativo. Sorprendentemente los resultados de nuestros experimentos muestran que en el grupo control tratado con *t*-BHP no se produce un incremento significativo en la formación de MDA en plasma o en hígado. Esto podría indicar que los mecanismos de defensa antioxidante del organismo son capaces de metabolizar el MDA formado a pesar de que haya procesos de peroxidación lipídica. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Valentão y cols.<sup>213</sup> en ratones a los que se les administra *t*-BHP y obtienen valores de MDA en hígado ligeramente inferiores a los animales controles. Igualmente Cogger y cols.<sup>214</sup> no encuentran diferencias significativas en los valores de MDA en homogenados de hígado de ratas Sprague-Dawley tratadas con diferentes dosis de *t*-BHP con respecto al grupo control. Los grupos tratados con Ometrix® mostraron niveles de MDA en plasma significativamente inferiores a los de sus respectivos grupos control lo que podría indicar que ejerce una protección frente a la peroxidación lipídica en hígado o bien que impide la liberación al plasma de los compuestos formados.

El GSH está ampliamente distribuido en las células del organismo y está implicado en muchas funciones biológicas, actuando como un agente reductor esencial para el mantenimiento del estado redox intracelular. Además es la biomolécula más importante para la protección frente a la citotoxicidad inducida químicamente, al participar en la eliminación de radicales libres intermedios por

conjugación y por reducción de los hidroperóxidos o por desactivación directa de los radicales libres<sup>200</sup>.

En nuestro estudio la administración de *t*-BHP a los animales control no provocó depleción de GS como cabría esperar por la acción tóxica del *t*-BHP, incluso observamos un incremento que es significativo respecto al grupo control y que se acompaña también de un ligero incremento del GSSG. Estos resultados son similares a los publicados por Valentão y cols.<sup>213</sup> que no obtienen depleción de glutatión en hígado en ratones a los que se les administra *t*-BHP. Esto podría atribuirse a un incremento de la respuesta protectora como mecanismo de defensa contra la agresión del *t*-BHP, puesto que es conocido que la disminución de GSH causada por la rápida conjugación con especies electrofílicas puede inducir un incremento en su síntesis<sup>215</sup>. El tratamiento con Ometrix<sup>®</sup> produjo una reducción significativa de los niveles de glutatión total y oxidado que podría ser debida a que los AGPI presentes en Ometrix<sup>®</sup> sufren procesos de peroxidación lipídica y el organismo no es capaz de producir suficiente GSH para destruirlos. Por otra parte, hay que tener en cuenta que una disminución de GS puede no coincidir con una oxidación de GSH. Si la pérdida de GSH fuese debida a una oxidación del mismo, no se produciría una caída tan marcada del GS puesto que se incrementaría el GSSG, cosa que no ocurre en nuestros experimentos. Podría ocurrir que en esta situación se produzca una disminución en la síntesis de GSH a partir de cisteína pero esta posibilidad no la hemos estudiado en este trabajo.

Al determinar los niveles de actividad de las principales enzimas del sistema antioxidante del organismo observamos que la actividad de GR se había reducido significativamente tras la administración de *t*-BHP en los animales control. Esta menor actividad podría explicar el incremento en la cantidad de GSSG detectado a nivel hepático en este grupo. También la actividad de la CAT se incrementa de manera importante en estos animales, lo que podría estar relacionado con un aumento en la formación de peróxido de hidrógeno como consecuencia del efecto tóxico de *t*-BHP.

La incorporación de Ometrix<sup>®</sup> en la dieta no produce cambios significativos en ninguna de las enzimas estudiadas, lo que indica que no afecta los procesos de intercambio entre GSH y GSSG por acción de G-Px y GR, pero es capaz de

impedir las alteraciones en la actividad de la CAT y la GR provocadas por *t*-BHP, contribuyendo así a proteger al organismo de los efectos tóxicos del *t*-BHP.







*CONCLUSIONES*



La incorporación en la dieta de Ometrix<sup>®</sup>, una mezcla de aceites de origen animal y vegetal ricos en ácidos grasos omega-3/6/9:

1. Reduce la presión arterial de ratas genéticamente hipertensas sin modificarla cuando los animales son normotensos.
2. Previene o reduce el incremento de los niveles plasmáticos de colesterol total y LDLc y la disminución de los niveles de HDLc provocados por la dieta hipercolesterolémica en ratas hipertensas. En los animales normotensos se normalizan los niveles de colesterol total y LDLc y se reducen los niveles de triglicéridos. En ambos casos mejora el índice de riesgo cardiovascular.
3. Mejora la disfunción endotelial provocada por la hipertensión y/o la hipercolesterolemia incrementando la relajación dependiente de endotelio. En este efecto podrían estar implicados mecanismos relacionados con la producción de prostanoïdes por la vía de la ciclooxigenasa.
4. Mejora la hipertrofia cardíaca y vascular que se produce por la hipertensión en ratas SHR. En arterias de conductancia su efecto más significativo es una reducción del grosor de la pared y en arterias de resistencia un aumento en el lumen.
5. Mejora el estado redox en hígado en ratas hipertensas e hipercolesterolémicas con un incremento de los niveles de glutatión total y disminución del glutatión oxidado, que se acompaña de un incremento en la actividad enzimática de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa.

6. Impide la elevación de la actividad alanino aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y lactato deshidrogenasa y los cambios en la actividad de la catalasa y la glutatión reductasa inducidos por *t*-BHP, lo que indica que ejerce una acción protectora frente al daño oxidativo agudo producido por este agente.
  
7. Ometrix<sup>®</sup> utilizado como suplemento en la dieta puede resultar beneficioso para el control de la hipertensión y la hipercolesterolemia.



*BIBLIOGRAFIA*



- 
- <sup>1</sup> World Health Organization. The World Health Report 2003: Shaping the Future. Geneva: World Health Organization; 2003.
- <sup>2</sup> Defunciones según la causa de muerte año 2006. Instituto nacional de estadística (INE) Base de datos INEBase. Disponible en: <http://www.ine.es>.
- <sup>3</sup> Marrugat J., Elosua R., Martí H. Epidemiology of ischaemic heart disease in Spain: estimation of the number of cases and trends from 1997 to 2005. *Rev. Esp. Cardiol.* 2002; 55(4): 337-46.
- <sup>4</sup> Llacer A., Fernández-Cuenca R. Mortalidad en España en 1999 y 2000 (I) y (II). *Bol. Epidemiol. Semanal* 2003; 11: 121-32.
- <sup>5</sup> Ministerio de Sanidad y Consumo, Sociedad Española de Cardiología y Sociedad Española de Arteriosclerosis. Control de la colesterolemia en España, 2000. Un instrumento para la prevención cardiovascular. *Rev. Esp. Salud Pública* 2000; 74(3): 215-53.
- <sup>6</sup> Jeppesen J., Hein H.O., Suadicani P., Gyntelberg F. Triglycerides concentrations and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation* 1998; 97(11): 1029-36.
- <sup>7</sup> Jousilahti P., Tuomilehto J., Vartiainen E., Pekkanen J., Puska P. Body weight, cardiovascular risk factors, and coronary mortality: 15-year follow-up of middle-aged men and women in eastern Finland. *Circulation* 1996; 93(7): 1372-9.
- <sup>8</sup> Sans S., Kesteloot H., Kromhout D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur. Heart J.* 1997; 18(12): 1231-48.
- <sup>9</sup> Tunstall-Pedoe H., Kuulasmaa K., Mahönen M., Tolonen H., Ruokokoski E., Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations. *Lancet* 1999; 353(9164): 1547-57.
- <sup>10</sup> Kuulasmaa K., Tunstall-Pedoe H., Dobson A., Fortmann S., Sans S., Tolonen H., Evans A., Tuomilehto J. Estimating the contribution of changes in classical risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 2000; 355(9205): 675-87.
- <sup>11</sup> Allender S., Scarborough P., Peto V., Rayner M., Leal J., Luengo-Fernández R., Gray A. Economic cost. En: *European Cardiovascular Disease Statistics*. European Heart Network, London 2008; 103-110.
- <sup>12</sup> Leal J., Luengo-Fernández R., Gray A., Petersen S., Rayner M. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur. Heart J.* 2006; 27(13): 1610-9.
- <sup>13</sup> Villar Álvarez F., Banegas J.R., Donado J., Rodríguez Artalejo F. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Sociedad Española de Arteriosclerosis, Madrid 2007.
- <sup>14</sup> Encuesta Nacional de Salud en España 2001. Ministerio de Sanidad y Consumo. Disponible en: <http://www.msc.es>

- <sup>15</sup> Encuesta Nacional de Salud en España 2006. Ministerio de Sanidad y Consumo. Disponible en: <http://www.msc.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2006.htm>
- <sup>16</sup> Riesgo de enfermedad cardiovascular en Castilla y León. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad. 2005. Disponible en: [http://www.sanidad.jcyl.es/sanidad/cm/sanidad/tkContent?pgseed=1205151374330&idContent=20304&locale=es\\_ES&textOnly=false](http://www.sanidad.jcyl.es/sanidad/cm/sanidad/tkContent?pgseed=1205151374330&idContent=20304&locale=es_ES&textOnly=false)
- <sup>17</sup> Yusuf S. Two decades of progress in preventing vascular disease. *Lancet* 2002; 360(9326): 2-3.
- <sup>18</sup> Wald N.J., Law M.R. A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%. *B.M.J.* 2003; 326(7404): 1419-23.
- <sup>19</sup> Banegas J.R., Díez Gañán L., Villar Álvarez F., Rodríguez Artalejo F. La mortalidad atribuible al tabaquismo comienza a descender en España. *Méd. Clin. (Barc)* 2005; 124(20): 769-71.
- <sup>20</sup> Kok F.J., Kromhout D. Atherosclerosis-epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur. J. Nutr.* 2004; 43(suppl 1) 2-5.
- <sup>21</sup> WHO. Prevention of chronic diseases: WHO global strategy on diet, physical activity and health. Ginebra, 2004.
- <sup>22</sup> Aranceta J., Serra-Majem Ll. (eds.). En: Guías alimentarias para la población española. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, 2001.
- <sup>23</sup> Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation* 2002; 106(25): 3143-421.
- <sup>24</sup> European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: fourth joint task force of European society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice. (constituted by representatives of nine societies and by invited experts) *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehab.* 2007; 14(Suppl 2): S1-S113.
- <sup>25</sup> Conroy R.M, Pyörälä K., Fitzgerald A.P, Sans S., Menotti A., De Backer G., et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur. Heart J.* 2003; 24(11): 987-1003.
- <sup>26</sup> European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehab.* 2003; 10(Suppl 1): S1-S78.
- <sup>27</sup> Nofer J.R., Kehrel B., Fobker M. HDL and arteriosclerosis: Beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002; 161(1): 1-16.
- <sup>28</sup> Fredrickson D.S., Levy R.I., Lees R.S. Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders. *N. Engl. J. Med.* 1967; 276: 32-44.
- <sup>29</sup> Tamargo J., Pérez-Vizcaíno F. Fármacos hipolipemiantes. En: Velázquez. Farmacología básica y clínica. (17ª ed.) Editorial Médica Panamericana 2004; 461.



- <sup>30</sup> 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J. Hypertens.* 2007; 25(6): 1105-87.
- <sup>31</sup> Prasad K., Kalra J. Experimental atherosclerosis and oxygen free radicals. *Angiology* 1989; 40(9): 835-43.
- <sup>32</sup> Assmann G., Nofer J.R. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins *Annu. Rev. Med.* 2003; 54: 321-41.
- <sup>33</sup> Bersot T.P., Pépin G.M., Mahley R.W. Risk determination of dyslipidemia in populations characterized by low levels of high density lipoprotein cholesterol. *Am. Heart J.* 2003; 146(6): 1052-59.
- <sup>34</sup> Buhler F.R., Tkachuk V.A., Hahn A.W., Resink T.J. Low and high-density lipoproteins as hormonal regulators of platelet, vascular endothelial and smooth muscle cell interactions: relevance to hypertension. *J. Hypertens. Suppl.* 1991; 9(6): S28-36.
- <sup>35</sup> Banegas J.R., Rodriguez-Artalejo F., Ruilope L.M., Graciano A., Luque M., De la Cruz-Troca J.J., et al. Hypertension magnitude and management in the elderly population of Spain. *J. Hypertens.* 2002; 20(11): 2157-64.
- <sup>36</sup> Chobanian A.V., Bakris G.L., Black H.R., Cushman W.C., Green L.A., Izzo J.L. Jr., et al. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension.* 2003; 42(6):1206-1252
- <sup>37</sup> Guías de práctica clínica para el tratamiento de la hipertensión 2007. *Rev. Esp. Cardiol.* 2007; 60(9): 968.e1-968.e94.
- <sup>38</sup> Galley H.F., Webster N.R. Physiology of the endothelium. *Br. J. Anaesth.* 2004; 93(1): 105-13.
- <sup>39</sup> Vanhoutte P.M., Mombouli J.V. Vascular endothelium vasoactive mediators. 1996; 39(3): 229-38.
- <sup>40</sup> Gokce N., Keaney J., Vita J. Endotheliopathies: clinical manifestations of endothelial dysfunction. En: *Thrombosis and hemorrhage.* Loscalzo J., Shafer A.L., (eds.) Baltimore, Williams and Wilkins Publishers 1998; 901-24.
- <sup>41</sup> Endemann D.H., Schiffrin E.L. Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004; 15(8): 1983-92.
- <sup>42</sup> Koppenol W.H., Moreno J.J., Prior W.A., Ischiropoulos H., Beckman J.S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 1992; 5(6): 834-42.
- <sup>43</sup> Ogita H., Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium* 2004; 11(2): 123-32.
- <sup>44</sup> Lahoz C., Mostaza J.M. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev. Esp. Cardiol.* 2007; 60(2): 184-95.

- <sup>45</sup> Davies M.J., Woolf N. Atherosclerosis: what is it and why does it occur? *Br. Heart J.* 1993; 69(1 Suppl): S3-11.
- <sup>46</sup> Millán J., Álvarez-Sala L.A. Génesis de la placa de ateroma. En: *Metabolismo lipídico. Sociedad y colesterol.* 1997; 89-108.
- <sup>47</sup> Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(34): 20963-66.
- <sup>48</sup> Brown M.S., Goldstein J.L. Lipoprotein metabolites in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1983; 52: 223-61.
- <sup>49</sup> Stary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., Glagov S., Insull W. Jr., et al. A definition types of atherosclerotic lesions and a histological classification of Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15(9): 1512-31.
- <sup>50</sup> Mitchinson M.J., Ball R.Y. Macrophages and atherogenesis. *Lancet* 1987; 2(8551): 146-8.
- <sup>51</sup> Jang I.K., Lassila R., Fuster V. Atherogenesis and inflammation. *Eur. Heart J.* 1993; 14(suppl K): 2-6.
- <sup>52</sup> Wight T. The vascular extracellular matrix. En: *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Fuster V., Topol E.J. (eds.) Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers 1996; 421-40.
- <sup>53</sup> Ernst E. The role of fibrinogen as a cardiovascular risk factor. *Atherosclerosis* 1993; 100(1): 1-12.
- <sup>54</sup> Fuster V., Badimon L., Badimon J.J., Chesebro J.H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326: (4)242-50, (5)310-8.
- <sup>55</sup> Fenster B.E., Tsao P.S., Rockson S. Endothelial dysfunction: Clinical strategies for treating oxidant stress. *Am. Heart J.* 2003; 146(2): 218-26.
- <sup>56</sup> Zalba G., Gonzalez A., Beaumont J., San José G., Moreno U., López B., et al. Estrés oxidativo vascular y disfunción endotelial. *Nefrología* 2001; 21(supl. 1): 61-5.
- <sup>57</sup> Barton C.H., Ni Z., Varizi, N.D. Enhanced nitric oxide inactivation in aortic coarctation-induced hypertension. *Kidney International* 2001; 60: 1083-7.
- <sup>58</sup> Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signalling. *Mol. Aspects Med.* 2004; 25(1-2): 17-26.
- <sup>59</sup> Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344(8924): 721-4.
- <sup>60</sup> Ballester M. Anti-oxidants, free radicals and health. A chemical, organic and physical approach. *Med. Clin. (Barc)* 1996; 107(13): 509-15.
- <sup>61</sup> Zalba G., Beaumont F.J., San Jose G., Fortuño A., Fortuño M.A., Etayo J.C., Diez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 35(5): 1055-61.
- <sup>62</sup> Zalba G., Beaumont F.J., San Jose G., Fortuño A., Fortuño M.A., Diez J. Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol. Dial. Transplant* 2001; 16 (Suppl. 1): 2-5.

- <sup>63</sup> Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1993; 90(17): 7915-22.
- <sup>64</sup> Pérez L.M. Estrés oxidativo: La paradoja del oxígeno. *Rev. Cub. Endocrinol.* 2000; 11(3): 139-42.
- <sup>65</sup> Mazurik V.K., Mikhailov V.F. Radiation-induced genomic instability: phenomenon, molecular mechanisms, pathogenetic significance. *Radiats. Biol. Radioecol.* 2001; 41(3): 272-89.
- <sup>66</sup> Valko M., Morris H., Cronin M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12 (10): 1161-208.
- <sup>67</sup> Katusic Z.S., Vanhoutte P.M. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am. J. Physiol.* 1989; 257(1 Pt2): H33-H37.
- <sup>68</sup> Eldor A., Vlodasky I., Hy-am E., Atzmon R., Weksler B.B., Raz A., Fusks Z. Cultured endothelial cells increase their capacity to synthesize prostacyclin following the formation of a contact inhibited cell monolayer. *J. Cell. Physiol.* 1983; 114(2): 179-83.
- <sup>69</sup> Auch-Schwelk W., Katusic Z.S, Vanhoutte P.M. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1989; 13(6 Pt2): 859-64.
- <sup>70</sup> Touyz R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress and redox signaling in hypertension. What is the clinical significance? *Hypertension* 2004; 44(3): 248-52.
- <sup>71</sup> Cai H., Harrison D. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 2000; 87(10): 840-4.
- <sup>72</sup> Inoue M. Protective mechanisms against reactive oxygen species. En: *The liver: biology and pathology.* New York, 1994; 443-59.
- <sup>73</sup> Lu S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB-J.* 1999; 13(10): 1169-83.
- <sup>74</sup> Fattman C.L., Schaefer L.M., Oury T.D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 35(3): 236-56.
- <sup>75</sup> Deisseroth A., Dounce A.L. Catalase: Physical and Chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol. Rev.* 1970; 50: 319-75.
- <sup>76</sup> Lawrence R.A., Burk R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biophys. Res. Commun.* 1976; 71(4): 952-58.
- <sup>77</sup> Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analyt. Biochem.* 1988; 175(2): 408-13.
- <sup>78</sup> Wilce M.C., Parker M. Structure and function de Glutathione S-Transferases. *Biochem. Biophys. Acta* 1994; 1205(1): 1-18.
- <sup>79</sup> American Heart Association Nutrition Committee. Diet and lifestyle recommendations revision 2006. *Circulation* 2006; 114(1): 82-96.
- <sup>80</sup> Keis A. Seven Countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge and London, a Commonwealth Fund Book. Harvard University Press, 1980.

- <sup>81</sup> De Lorgeril M., Salen P., Martin J.L., Monjaud I., Delaye J., Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction. Final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99(6): 779-85.
- <sup>82</sup> Trichopoulou A., Orfanos P., Norat T., Bueno-de-Mesquina B., Ocke M.C., Peeters P.H., et al. Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *B.M.J.* 2005; 330(7498): 991.
- <sup>83</sup> Visioli F., Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev.* 1998; 56(5 Pt 1): 142-7.
- <sup>84</sup> Trichopoulou A., Vasilopoulou E., Lagiou A. Mediterranean diet and coronary heart disease: are antioxidants critical? *Nutr. Rev.* 1999; 57(8): 253-5.
- <sup>85</sup> Giugliano D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2000; 10(1): 38-44.
- <sup>86</sup> Bazzano L.A., Sordula M.K., Liu S. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2003; 5(6): 492-9.
- <sup>87</sup> Das U.N. Do polyunsaturated fatty acids behave like an endogenous "polypill"? *Med. Hypotheses* 2008; 70(2): 430-34.
- <sup>88</sup> Bang H.O., Dyerberg J. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic west coast Eskimos. *Acta Med. Scand.* 1972; 192 (1-2): 85-94.
- <sup>89</sup> Bang H.O., Dyerberg J., Hjoorne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med. Scand.* 1976; 200(1-2): 69-73.
- <sup>90</sup> Bang H.O., Dyerberg J., Sinclair H.M. The composition of Eskimo food in north western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.* 1980; 33(12): 2657-61.
- <sup>91</sup> Connor W.E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 71(suppl 1): 171-5S.
- <sup>92</sup> Simopoulos A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects. *World Rev. Nutr. Diet.* 2003; 92: 1-22.
- <sup>93</sup> Mohammad A., Graf R., Clavien P.A. Omega 3-Omega 6: What is right for the liver? *J. Hepatology* 2007; 47(5): 718-25.
- <sup>94</sup> Mataix J., Gil A. Libro blanco de los omega-3. 2002. Editor PULEVA Food.
- <sup>95</sup> Cader A.A., Butterfield D.A., Watkins B.A., Chung B.H., Hennig B. Electron spin resonance studies of fatty acid-induced alterations in membrane fluidity in cultured endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1995; 27(7): 665-73.
- <sup>96</sup> Hashimoto M., Hossain S., Yamasaki H., Yazawa K., Masumura S. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on plasma membrane fluidity of aortic endothelial cells. *Lipids* 1999; 34(12): 1297-304.
- <sup>97</sup> Das. U.N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biothechnol. J.* 2006; 1(4): 420-39.
- <sup>98</sup> Caballero R., Gómez R., Núñez L., Vaquero M., Tamargo J., Delpón E. Farmacología de los ácidos grasos omega-3. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.D* 2006; 6: 3D-19D.

- <sup>99</sup> Das U.N. COX-2 inhibitors and metabolism of essential fatty acids. *Med. Sci. Monit.* 2005; 11(7): RA233-7.
- <sup>100</sup> Das U.N. Tumoricidal actions of cis-unsaturated fatty acids and its relationship to free radicals and lipid peroxidation. *Cancer Lett.* 1991; 56(3): 235-43.
- <sup>101</sup> Das U.N. Can perinatal supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids prevent diabetes mellitus? *Eur. J. Clin. Nutr.* 2003; 57(2): 218-26.
- <sup>102</sup> Das U.N. Long-chain polyunsaturated fatty acids interact with nitric oxide, superoxide anion, and transforming growing factor- $\beta$  to prevent human essential hypertension. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004; 58(2): 195-203.
- <sup>103</sup> Mc Veigh G.E., Brennan G.M., Johnson G.D., Mc Dermott B.J., Mc Grath L.T., Henry W.R., et al. Dietary fish oil augments nitric oxide production or release in patients with type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Diab.* 1993; 36(1): 33-38.
- <sup>104</sup> Okuda Y., Kawashima K., Sawada T., Tsurumaru K., Asano M., Suzuki S., et al. Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 232(2): 487-91.
- <sup>105</sup> Kumar K.V., Das U.N. Effect of cis-unsaturated fatty acids, prostaglandins, and free radicals on angiotensin converting enzyme activity in vitro. *Proc. Exp. Biol. Med.* 1997; 214(4): 374-9.
- <sup>106</sup> Das U.N. Beneficial effects of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2000; 63(6): 351-62.
- <sup>107</sup> Nakayama M., Fukuda N., Watanabe Y., Soma M., Hu W.Y., Kishipka H., et al. Low dose of eicosapentaenoic acid inhibits the exaggerated growth factor-beta. *J. Hypertens.* 1999; 17(10): 1421-30.
- <sup>108</sup> Miyazaki M., Takemura N., Watanabe S., Hata N., Misawa Y., Okuyama H. Dietary docosahexaenoic acid ameliorates, but rapeseed oil and safflower oil accelerate renal injury in stroke-prone spontaneously hypertensive rats as compared with soybean oil, which is associated with expression for renal transforming growth factor-beta, fibronectin and rennin. *Biochem. Biophys. Acta.* 2000; 1483(1): 101-10.
- <sup>109</sup> Howe P.R. Dietary fats and hypertension. Focus on fish oil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997; 827: 339-52.
- <sup>110</sup> Morris M.C., Sacks F., Rosner B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation* 1993; 88(2): 523-33.
- <sup>111</sup> Kremer J.M., Lawrence D.A., Jubiz W., Di Giacomo R., Rynes R., Bartholomew L.E., Sherman M. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum.* 1990; 33(6): 810-20.
- <sup>112</sup> Appel L.J., Miller E.R., Seidler A.J., Whelton P.K. Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Arch. Intern. Med.* 1993; 153(12): 1429-38.
- <sup>113</sup> Xu J., Cho H., O'Malley S., Park J.H., Clarke S.D. Dietary polyunsaturated fats regulate rat liver sterol regulatory element binding proteins-1 and -2 in three distinct stages and by different mechanism. *J. Nutr.* 2002; 132(11): 3333-9.

- <sup>114</sup> Sampath H., Ntambi J. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 2005; 25: 317-40.
- <sup>115</sup> Harris W.S. N-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997; 65(5 suppl): 1645S-54S.
- <sup>116</sup> Durrington P.N., Bhatnagar D., Mackness M.I., Morgan J., Julier K., Khan M.A., et al. An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate administered for one year decreased triglycerides in simvastatin treated patients with coronary heart disease and persisting hypertriglyceridemia. *Heart* 2001; 85(5): 544-8.
- <sup>117</sup> Wick G., Knoflach M., Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis, *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 361-403.
- <sup>118</sup> Mullenix P.S., Andersen C.A., Starnes B.W. Atherosclerosis as inflammation. *Ann. Vasc. Surg.* 2005; 19(1): 130-8.
- <sup>119</sup> Ridker P.M., Hennekens C.H., Roitman-Johnson B., Stampfer M.J., Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351(9096): 88-92.
- <sup>120</sup> Schumacher A., Seljeflot I., Sommervoll L., Christensen B., Otterstad J.E., Arnesen H. Increased levels of markers of vascular inflammation in patients with coronary heart disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2002; 62(1): 59-68.
- <sup>121</sup> Das U.N. Free radicals, cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 2000; 215(1-2): 145-52.
- <sup>122</sup> Engler M.B. Effects of omega-3, omega-6 and omega-9 fatty acids on vascular smooth muscle tone. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 215(2-3): 325-8.
- <sup>123</sup> De Caterina R., Libby P. Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids* 1996; 31: S57-S63.
- <sup>124</sup> Eschen O., Christensen J.H., De Caterina R., Schmidt E.B. Soluble adhesion molecules in healthy subjects: a dose response study using n-3 fatty acids. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2004; 14(4): 180-5.
- <sup>125</sup> Von Schacky C. n-3 PUFA in CVD: influence of cytokine polymorphism. *Proc. Nutr. Soc.* 2007; 66(2): 166-70.
- <sup>126</sup> Das U.N. Long-chain polyunsaturated fatty acids, endothelial lipase and atherosclerosis. *Prostaglandins Leukot. Essen. Fatty Acids* 2005; 72(3): 173-9.
- <sup>127</sup> Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de julio de 2003 por la que se modifica la Directiva 86/609/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
- <sup>128</sup> Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
- <sup>129</sup> Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789): 373-6.

- <sup>130</sup> Fulton R.M., Hutchinson E.C., Morgan-Jones A. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br. Heart J.* 1952; 14(3): 413-20.
- <sup>131</sup> Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S.G., Richmond W., Fu P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 1974; 20(4): 470-5.
- <sup>132</sup> Bocolo G., David H. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin. Chem.* 1973; 19(5): 476-82.
- <sup>133</sup> Warnick G.R., Nauk M., Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugación to homogeneous assays. *Clin. Chem.* 2001; 47(9): 1579-96.
- <sup>134</sup> Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18(6): 499-502.
- <sup>135</sup> Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226(1): 497-509.
- <sup>136</sup> Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95(2): 351-8.
- <sup>137</sup> Zingarelli B., Szabó C., Salzman A.L. Blockade of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits neutrophil recruitment, oxidant generation and mucosal injury in murine colitis. *Gastroenterology* 1999; 116(2): 335-45.
- <sup>138</sup> Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 1969; 27(3): 502-22.
- <sup>139</sup> Griffith O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 1980; 106(1): 207-12.
- <sup>140</sup> Guzik T.J., West N.E., Black E., Mc Donald D., Ratnatunga C., Pillai R., Channon K.M. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.* 2000; 86(9): E85–E90.
- <sup>141</sup> Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-54.
- <sup>142</sup> Peskin A.V., Winterbourn C.C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin. Chim. Acta* 2000; 293(1-2): 157-66.
- <sup>143</sup> Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-Transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974; 249(22): 7130-9.
- <sup>144</sup> Hwang J.M., Wang C.J., Chou F.P., Tseng T.H., Hsieh Y.S., Hsu J.D., Chu C.Y. Protective effect of baicalin on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Arch. Toxicol.* 2005; 79(2): 102-9.
- <sup>145</sup> Molander D.W., Wroblewski F., La Due J.S. Transaminase compared with cholinesterase and alkaline phosphatase an index of hepatocellular integrity. *Clin. Res.* 1955; Proc. 3: 20-4.

- <sup>146</sup> Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico, Comisión de Enzimas. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la alanina aminotransferasa en suero sanguíneo humano. *Quim. Clin.* 1987; 6: 241-4.
- <sup>147</sup> Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico, Comisión de Enzimas. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de la aspartato aminotransferasa en suero humano. *Quim. Clin.* 1987; 6: 235-9.
- <sup>148</sup> Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico, Comisión de Enzimas. Método recomendado para la determinación en rutina de la concentración catalítica de lactato deshidrogenasa en suero sanguíneo humano. *Quim. Clin.* 1989; 8: 57-61.
- <sup>149</sup> Prisco D., Paniccia R., Bandelli B., Filippini M., Francalanci I., Giusti B., et al. Effect of medium-term supplementation with a moderate dose of n-3 polyunsaturated fatty acids on blood pressure in mild hypertensive patients. *Tromb. Res.* 1998; 91(3): 105-12.
- <sup>150</sup> Mori T.A., Bao D.Q, Burke V., Puddey I.B., Beilin L.J. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension* 1999; 34(2): 253-60.
- <sup>151</sup> Abeywardena M.Y., Head R.J. Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovascular research* 2001; 52(3): 361-71.
- <sup>152</sup> Frenoux J.M., Prost E.D., Belleville J.L., Prost J.L. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 2001; 131(1): 39-45.
- <sup>153</sup> Watanabe M.I., Umekawa H., Takahashi T., Furuichi Y. Effects of dietary alpha- or gamma-linoleic acid on levels and fatty acid compositions of serum and hepatic lipids, and activity and mRNA abundance of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in rats. *Com. Biochem. And Physiol.* 1999; 122(2): 213-20.
- <sup>154</sup> Ruiz-Gutierrez V., Vázquez C.M., Santa-Maria C. Liver Lipid Composition and Antioxidant Enzyme Activities of Spontaneously Hypertensive Rats after Ingestion of Dietary Fats (Fish, Olive and High-Oleic Sunflower Oils). *Biosci. Rep.* 2001; 21(3): 271-85.
- <sup>155</sup> Mori H., Ishiguro K., Okuama H. Hypertension in rats does not potentiate hypercholesterolemia and aortic cholesterol deposition induced by a hypercholesterolemic diet. *Lipids* 1993; 28(2): 109-13.
- <sup>156</sup> Erdiñçler D.S., Seven A., Inci F., Beger T., Candan G. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental animals: Effects of aging and hypercholesterolemic diet. *Clin. Chim. Acta* 1997; 265(1): 77-84.
- <sup>157</sup> Chowieńczyk P.J., Watts G.F., Cockcroft J.R., Ritter J.M. Impaired endothelium-dependent vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolaemia. *Lancet* 1992; 340(8833): 1430-2.
- <sup>158</sup> Chin J.P., Dart A.M. Therapeutic restoration of endothelial function in hypercholesterolaemic subjects: effect of fish oils. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1994; 21(10): 749-55.
- <sup>159</sup> Lorkowska B., Bartus M., Franczyk M., Kostogryś R.B., Jawien J., Pisulewski P.M., Cholewicki S. Hypercholesterolemia does not alter endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 317(3): 1019-26.



- <sup>160</sup> Bartus M., Lomnicka M., Lorskowska B., Franczyk M., Kostogrys R.B., Pisulewski P.M., Cholpicki S. Hypertriglyceridemia but not hypercholesterolemia induces endothelial dysfunction in the rat. *Pharmacol. Rep.* 2005; 57 Suppl: 127-37.
- <sup>161</sup> Vecera R., Skottova N., Vana P., Kazdova L., Chmela Z., Svagera Z., et al. Antioxidant status, lipoprotein profile and liver lipids in rat fed on high-cholesterol diet containing currant oil rich in n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Physiol. Res.* 2003; 52(2): 177-87.
- <sup>162</sup> Berrougui H., Alvarez de Sotomayor M., Pérez-Guerrero C., Ettaib A., Hmamouchi M., Marhuenda E., Herrera M.D. Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.* 2004; 92(6): 921-9.
- <sup>163</sup> Grimsgaard S., Bonna K.H., Jacobsen B.K., Bjerve K.S. Plasma saturated and linoleic fatty acids are independently associated with blood pressure. *Hypertension* 1999; 34(3): 478-83.
- <sup>164</sup> Engler M.M., Schambelan M., Engler M.B., Ball D., Goodfriend T.L. Effects of dietary gamma-linolenic acid on blood pressure and adrenal angiotensin receptors in hypertensive rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1998; 218(3): 234-7.
- <sup>165</sup> Goode G.K., Garcia S., Heagerty A.M. Dietary supplementation with marine fish oil improves in vitro small artery endothelial function in hypercholesterolemic patients. A double-blind placebo-controlled study. *Circulation* 1997; 96(9): 2802-7.
- <sup>166</sup> Vizioli E.O., Spadin M.D., Correa F.M.A., Viaro F., Evora P.R.B., Chies A.B. Acetylcholine-induced aortic relaxation studied in salbutamol treated rats. *J. Smooth Muscle Res.* 2005; 41(5): 271-81.
- <sup>167</sup> Chin J.P.F., Gust A.P., Dart A.M. How do the fish oils affect vascular function? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1995; 22(2): 71-81.
- <sup>168</sup> Ulker S., Mc Master D., Mc Keown P.P., Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovascular Res.* 2003; 59(2): 488-500.
- <sup>169</sup> Cohen R.A. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1995; 38(2): 105-28.
- <sup>170</sup> Lerman L.O., Rodríguez-Porcel M. Functional assessment of circulation of the single kidney. *Hypertension* 2001; 38(3 Pt 2): 625-9.
- <sup>171</sup> Vanhoutte P.M. Endothelium and control of vascular function. State of the art lecture *Hypertension* 1989; 13(6 Pt 2): 658-67.
- <sup>172</sup> Sawada Y., Sakamaki T., Nakamura T., Sato K., Ono Z., Murata K. Release of nitric oxide in response to acetylcholine is unaltered in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 1994; 12(7): 745-50.
- <sup>173</sup> Cuzzocrea S., Mazzon E., Dugo L., Di Paola R., Caputi A.P., Salvemini D. Superoxide: a key player in hypertension. *FASEB J.* 2004; 18(1): 94-101.
- <sup>174</sup> García-Cohen E.C., Marin J., Diez-Picazo L.D., Baena A.B., Salaices M., Rodríguez-Martinez M.A. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction

in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J. Pharmacol. Experim. Therap.* 2000; 293(1): 75-81.

<sup>175</sup> López D., Caballero C., Sanchez J., Puig-Parellada P., Mitjavilla T. Free radical production in aortic rings from rats fed a fish oil-rich diet. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 280(6): H2929-35.

<sup>176</sup> Christon R., Marette A., Badeau M., Bourgoïn F., Mélançon S., Bachelard H. Fatty acid-induced changes in vascular reactivity in healthy adult rats. *Metab. Clin. and Experimental* 2005; 54(12): 1600-9.

<sup>177</sup> Kris-Etherton P.M. for the Nutrition Committee. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 1999; 100(11): 1253-8.

<sup>178</sup> Thomsen C., Rasmussen O., Christiansen C., Pedersen E., Vesterlund M., Storm H., et al. Comparison of the effects of a monounsaturated fat diet and a high carbohydrate diet on cardiovascular risk factors in first degree relatives to type-2 diabetic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1999; 53(10): 818-23.

<sup>179</sup> Yuan Y.V., Kitts D.D., Godin D.V. Variations in dietary fat and cholesterol intakes modify antioxidant status of SHR and WKY rats. *J. Nutr.* 1998; 128(10): 1620-30.

<sup>180</sup> Yuan Y.V., Kitts D.D. Dietary fat source and cholesterol interactions alter plasma lipids and tissue susceptibility to oxidation in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive wistar kyoto (WKY) rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2002; 232(1-2): 33-47.

<sup>181</sup> Perona J.S., Ruiz-Gutierrez V. Effect of two high-oleic oils on liver lipid composition of spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences* 2000; 66(6): 521-31.

<sup>182</sup> Cintra D.E., Costa. A.V., Peluzio MdoC.G., Matta S.L., Silva M.T., Costa N.M. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. *Nutrition* 2006; 22(2): 197-205.

<sup>183</sup> Buettner R., Parhofer K.G., Woenckhaus M., Wrede C.E., Kunz-Schughart L.A., Schölmerich J., Bollheimer L.C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J. Mol. Endocrinol.* 2006; 36(3): 485-501.

<sup>184</sup> Nishimura H, Kubota J, Okabe M, Ueyama M, Kawamura K. Effects of lisinopril upon cardiac hypertrophy, central and peripheral hemodynamics and neurohumoral factors in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1992; 10(5):431-6.

<sup>185</sup> Guerrero E., Voces F., Ardanaz N., Montero M.J., Arévalo M., Sevilla M.A. Long-term treatment with nebivolol improves arterial reactivity and reduces ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2003; 42(3): 348-55.

<sup>186</sup> Sevilla M.A., Voces F., Carrón R., Guerrero E.I., Ardanaz N., San Román L., et al. Amlodipine decreases fibrosis and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: persistent effects after withdrawal. *Life Sci.* 2004; 75(7):881-91.

<sup>187</sup> Guerrero E.I., Ardanaz N., Sevilla M.A., Arévalo M.A., Montero M.J. Cardiovascular effects of nebivolol in spontaneously hypertensive rats persist after treatment withdrawal. *J. Hypertens.* 2006; 24(1):151-8.

- <sup>188</sup> Mc Lennan P., Owen A.J., Slee E.L., Theiss M.L. Myocardial function, ischemia and n-3 polyunsaturated fatty acids: a membrane basis. *J. Cardiovasc. Med.* 2007; 8(suppl1): S15-S18.
- <sup>189</sup> Rousseau D., Héliès-Toussaint C., Raederstorff D., Moreau D., Grynberg A. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids affect the development of renovascular hypertension in rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2001; 225(1): 109-19.
- <sup>190</sup> Mitasíková M., Smidová S., Macsaliová A., Knezl V., Dlugosová K., Okruhlicová L., et al. Aged Male and Female Spontaneously Hypertensive Rats Benefit from n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Supplementation. *Physiol. Res.* 2008; 57(Suppl. 2): S39-S48.
- <sup>191</sup> Schiffrin E.L. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am. J. Hypertens.* 2004; 17: 1192-200.
- <sup>192</sup> Terano T., Tanaka T., Tamura Y., Kitagawa M., Higashi H., Saito Y., Hirai A. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by inhibiting phosphorylation of Cdk2-cyclinE complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 254(2): 502-6.
- <sup>193</sup> Diep Q.N., Touyz M., Schiffrin E.L. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferators-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 2000; 36(5): 851-5.
- <sup>194</sup> Mulvany M.J. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med. Bio. Eng. Comput.* 2008; 46(5): 461-7.
- <sup>195</sup> Wu R., Millette E., Wu L., De Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2001; 19(4): 741-8.
- <sup>196</sup> Ohara Y., Peterson T.E., Harrison D.G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 1993; 91(6): 2546-51
- <sup>197</sup> Hink U., Li H., Mollnau H., Oelze M., Matheis E., Hartmann M., et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.* 2001; 88(2): E14-E22.
- <sup>198</sup> Dotan Y., Lichtenberg D., Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* 2004; 43(3): 200-27.
- <sup>199</sup> Brandsch C., Ringseis R., Eder K. High dietary iron concentrations enhance the formation of cholesterol oxidation products in the liver of adult rats fed salmon oil with minimal effects on antioxidant status. *J. Nutr.* 2002; 132(8): 2263-9.
- <sup>200</sup> Meister A. Biosynthesis and functions of glutathione, an essential biofactor. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1992; Spec No: 1-6.
- <sup>201</sup> Piemonte F., Pastore A., Tosí G., Tagliacozzi D., Santorelli F.M., Carrozzo R., et al. Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Eur. J. Clin. Invest.* 2001; 31(11): 1007-11.
- <sup>202</sup> Spolarics Z., Meyenhofer M. Augmented resistance to oxidative stress in fatty rat livers induced by a short term sucrose-rich diet. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1487(2-3): 190-200.
- <sup>203</sup> Valencia E., Marin A., Hardy G. Glutathione nutritional and pharmacological viewpoints: Part II. *Nutrition* 2001; 17(6): 485-6.

- <sup>204</sup> Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G. Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism* 1995; 44(3): 363-8.
- <sup>205</sup> Kimoto S., Nishida S., Funaskaka K., Nakano T., Teramoto K., Tomura T.T. Regional distribution of superoxide dismutase in the brain and the miocardium of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1995; 22: S160-1.
- <sup>206</sup> Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* 1990; 51(3): 283-97.
- <sup>207</sup> Yuan Y.V., Kitts D.D. Dietary (n-3) fat and cholesterol alter tissue antioxidant enzymes and susceptibility to oxidation in SHR and WKY rats. *J. Nutr.* 2003; 133(3): 679-88.
- <sup>208</sup> Rush G.F., Gorski J.R., Ripple M., Sowinski J., Bugelski P., Hewitt W. R. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1985; 78(3): 473-83.
- <sup>209</sup> Jewell S.A, Di Monte D., Richelmi P., Bellomo G., Orrenius S. tert-Butyl hydroperoxide-induced toxicity in isolated hepatocytes: contribution of thiol oxidation and lipid peroxidation. *J. Biochem. Toxicol.* 1986; 1(3): 13-22.
- <sup>210</sup> Hwang J.M., Wang C.J., Chou F.P., Tseng T.H., Hsieh Y.S., Lin W.L., Chu C.Y. Inhibitory effect of berberine on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. *Arch. Toxicol.* 2002; 76(11): 664-70.
- <sup>211</sup> Hogberg J., Orrenius S., O'Brien P. Further studies on lipid-peroxide formation in isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 1975; 59(2): 449-55.
- <sup>212</sup> Husain S.R., Cillard J., Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 1987; 26: 2489-91.
- <sup>213</sup> Valentão P., Carvalho M., Carvalho F., Fernandes E., das Neves R.P., Pereira M.L., Andrade P.B., Reabra R.M., Bastos M.L. Hypericum androsaemum infusion increases tert-butyl hydroperoxide-induced mice hepatotoxicity in vivo. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 94(2-3): 345-51.
- <sup>214</sup> Cogger V.C., Muller M., Fraser R., Mc Lean A.J., Khan J., Le Couteur D.G. The effects of oxidative stress on the liver sieve. *J. Hepatol.* 2004; 41(3): 370-6.
- <sup>215</sup> Reed D.J. En: Evaluation of chemical-induced oxidative stress as a mechanism of hepatocyte death. Laa G.L., Hewitt W.R. (eds.). Taylor and Francis, Washintong, 1998.