

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA

EFFECTOS DE LA ASTAXANTINA EN LA FUNCIÓN VASCULAR,
REMODELADO CARDIOVASCULAR Y ESTRÉS OXIDATIVO
ASOCIADOS A LA HIPERTENSIÓN

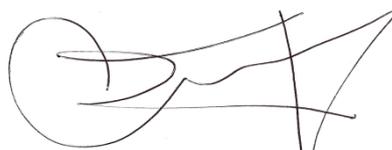
José Monroy Ruíz

2008

EFFECTOS DE LA ASTAXANTINA EN LA FUNCIÓN VASCULAR,
REMODELADO CARDIOVASCULAR Y ESTRÉS OXIDATIVO
ASOCIADOS A LA HIPERTENSIÓN

Memoria que presenta José Monroy
Ruíz para optar al Grado de Doctor

Salamanca, octubre de 2008

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'J' followed by a series of loops and a long horizontal stroke that ends in a sharp point.

Fdo. José Monroy Ruíz.



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

Dña. M^a JOSÉ MONTERO GÓMEZ, Dña. M^a ÁNGELES SEVILLA TORAL y Dña.
ROSALÍA CARRÓN DE LA CALLE, Profesoras de Farmacognosia y Farmacología, del
Departamento de Fisiología y Farmacología, de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "*Efectos de la astaxantina en la función vascular, remodelado cardiovascular y estrés oxidativo asociados a la hipertensión.*", que presenta D. **José Monroy Ruíz** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, 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 asívconste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca, a 23 de octubre de dos mil ocho.

Fdo. M^a José Montero

Fdo. M^a Ángeles Sevilla

Fdo. Rosalía Carrón

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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "*Efectos de la astaxantina en la función vascular, remodelado cardiovascular y estrés oxidativo asociados a la hipertensión.*", presentado por D. **José Monroy Ruíz** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de las Dras. Dña. M^a José Montero Gómez, Dña. M^a Ángeles Sevilla Toral y Dña. Rosalía Carrón De La Calle, 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 30 de octubre de dos mil ocho.



Fdo. Rafael Jiménez Fernández

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con los siguientes proyectos

PROYECTO SAN/1052/SA25/05

“Hipertensión y remodelado cardiovascular. Efectos beneficiosos de la astaxantina”

Financiado por la Junta de Castilla y León

PROYECTO SA047A06

“Estrés oxidativo e hipertensión inducida por angiotensina II: Estudios de antihipertensivos que interfieren con el sistema renina-angiotensina (SRH)” Financiado por la Junta de Castilla y León

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las directoras de este trabajo, las doctoras María José Montero Gómez, María Ángeles Sevilla Toral y Rosalía Carrón de la Calle por haber puesto su interés, sus conocimientos, su paciencia en el desarrollo del mismo y en mi formación académica. Así como por los buenos momentos compartidos en el trabajo.

A Miriam por su solidaridad constante, discreta e invaluable. Por su buena disposición al trabajo en el día a día.

Al doctor Bustelo y al doctor Sauzeau por haberme brindado la posibilidad de trabajar con los ratones *Vav3^{-/-}*.

También quisiera agradecer el apoyo técnico recibido por Teresa.

Al mismo tiempo quiero extender mi agradecimiento a todos los integrantes del Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología.

A los Laboratorios BASF por el suministro de la astaxantina.

Abreviaturas

AC - Adenilato ciclasa	ERN - Especies reactivas de nitrógeno
ACh - Acetilcolina	ERO - Especies reactivas de oxígeno
Ang I - Angiotensina I	ET - Endotelina
Ang II - Angiotensina II	FC - Frecuencia cardiaca
bFGF - Factor de crecimiento fibroblástico básico	FE - Fenilefrina
BH₄ - Tetrahidrobiopterina	sGC - Guanilato ciclasa soluble
Bk - Bradicینina	cGMP - Guanosin 3'-5'-monofosfato cíclico
CAT - Catalasa	GPx - Glutación peroxidasa
CMLV - Células del músculo liso vascular	GSH - Glutación reducido
COX - Ciclooxygenasa	GSSG - Glutación oxidado
CSA_m - Área seccional de la capa media	GTP - Guanosintrifosfato
DAG - Diacilglicerol	•HO[•] - Radical hidroxilo
DHE - Dihidroetidio	H₂O₂ - Peróxido de hidrógeno
ECA - Enzima convertidora de angiotensina	HDL - Lipoproteínas de alta densidad
ECV - Enfermedad cardiovascular	HO₂[•] - Radical perhidroxilo o hidroperóxido
EDHF - Factor hiperpolarizante dependiente del endotelio	HTA - Hipertensión arterial
EDRF - Factor relajante derivado del endotelio	ICAM-1 - Moléculas de adhesión intercelular 1
E_{max} - Efecto máximo	IFNγ - Interferón gamma
eNOS - Óxido nítrico sintasa endotelial	IL - Interleucinas
	iNOS - Óxido nítrico sintasa inducible
	IP₃ - Inositol-1,4,5-trifosfato

Abreviaturas

L - Lumen

LDL - Lipoproteínas de baja densidad

L-NAME - N-nitro-L-arginina metil éster

MDA - Malondialdehído

MLCP - Miosina de cadena ligera

MLKC - Miosina cinasa de cadena ligera

NA - Noradrenalina

NADPH - Nicotinamida adenin-dinucleótido fosfato reducido

NFκB - Factor nuclear o de transcripción kappa B

nNOS - Óxido nítrico sintasa neuronal

NO - Óxido nítrico

NTP - Nitroprusiato sódico

•O₂⁻ - Anión superóxido

ONOO⁻ - Peroxinitritos

PA - Presión arterial

PAD - Presión arterial diastólica

PAM - Presión arterial media

PAS - Presión arterial sistólica

pD₂ - Logaritmo cambiado de signo de la concentración del agonista que provoca el 50% del efecto máximo

PDGF - Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PGH₂ - Prostaglandina H₂

PGI₂ - Prostaciclina

PKC - Proteína cinasa C

Índice

<i>Introducción</i>	1
<i>CAROTENOIDES. REALACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN</i>	3
1. <i>Generalidades</i>	3
2. <i>Astaxantina</i>	7
<i>HIPERTENSIÓN ARTERIAL</i>	17
1. <i>Definición y clasificación</i>	17
2. <i>El sistema renina-angiotensina</i>	22
3. <i>Endotelio vascular y disfunción endotelial</i>	31
<i>Factores derivados del endotelio</i>	32
<i>Disfunción endotelial</i>	40
<i>Especies reactivas de oxígeno</i>	41
<i>Relación entre disfunción endotelial y antioxidantes</i>	56
<i>Objetivos</i>	67
<i>Métodos y Resultados</i>	71
<i>DISEÑO EXPERIMENTAL</i>	73

Índice

<i>MODELO 1. RATAS SHR</i>	<i>77</i>
<i>1. Presión arterial sistólica, frecuencia cardíaca y peso</i>	<i>78</i>
<i>2. Estudios in vitro</i>	<i>85</i>
<i>Estudios de funcionalidad: arteria aorta</i>	<i>85</i>
<i>Estudios de funcionalidad: riñón</i>	<i>98</i>
<i>3. Hipertrofia cardíaca</i>	<i>106</i>
<i>4. Morfometría en arterias</i>	<i>108</i>
<i>5. Producción de anión superóxido</i>	<i>116</i>
<i>Evaluación por quimioluminiscencia</i>	<i>116</i>
<i>Evaluación por fluorescencia</i>	<i>120</i>
<i>MODELO 2. RATONES CON HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II</i>	<i>123</i>
<i>1. Presión arterial sistólica</i>	<i>124</i>
<i>2. Estudios in vitro</i>	<i>127</i>
<i>Estudios de funcionalidad: arteria aorta</i>	<i>127</i>
<i>Estudios de funcionalidad: riñón</i>	<i>140</i>
<i>3. Hipertrofia cardíaca e hipertrofia renal</i>	<i>145</i>
<i>4. Determinación de colágeno</i>	<i>147</i>
<i>5. Producción de anión superóxido</i>	<i>150</i>

	Índice
<i>6. Peroxidación lipídica</i>	152
<i>7. Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes</i>	155
<i>MODELO 3. RATONES Vav3^{-/-}</i>	163
<i>1. Presión arterial sistólica</i>	163
<i>2. Estudios in vitro</i>	167
<i>Estudios de funcionalidad: aorta</i>	167
<i>Estudios de funcionalidad: riñón</i>	175
<i>3. Hipertrofia cardíaca</i>	180
<i>4. Hipertrofia de las glándulas suprarrenales</i>	182
<i>5. Producción de anión superóxido</i>	184
<i>Discusión</i>	187
<i>Conclusiones</i>	221
<i>Bibliografía</i>	225
<i>ANEXO 1: Sustancias utilizadas</i>	259
<i>ANEXO 2: Expresión y análisis estadístico de los resultados</i>	261

Introducción

2 Introducción

CAROTENOIDES. RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN

1. Generalidades

Durante más de cien años los carotenoides han atraído la atención de muchos investigadores en diferentes ámbitos de las ciencias como la química, bioquímica, biología, ciencia y tecnología de alimentos y farmacología, debido a sus propiedades como pigmentos naturales y a que muchos de ellos son precursores de vitamina A.

Los carotenoides se distribuyen ampliamente en la naturaleza y los encontramos como pigmentos responsables de los colores rojos, amarillos y naranjas en frutos, raíces, flores, peces, aves y crustáceos. Además se encuentran en microorganismos como algas, hongos y levaduras.

En general los carotenoides tienen un esqueleto básico con estructura química simétrica lineal de 40 carbonos, construida con ocho isoprenoides de cinco carbonos cada uno. Esta estructura puede estar modificada de diversas maneras ya sea por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, isomerización, etc. Se ha identificado una gran variedad de carotenoides, aquellos que poseen sólo la estructura de la cadena hidrocarbonada se conocen como carotenos, mientras que los que contienen oxígeno se conocen con el nombre de xantofilas. Los grupos sustituyentes más comunes son los grupos hidroxilo (OH) y epoxi (los más comunes 5,6 y 5,8-epoxi).

Los carotenoides, independientemente si son carotenos o xantofilas, pueden ser acíclicos como el fitoflueno o el licopeno, o cíclicos ya sea mono o bicíclicos. La ciclación puede ocurrir en cualquiera de los extremos terminales o en ambos. El γ caroteno es un ejemplo de carotenoide monocíclico, mientras que el α - y β -caroteno son bicíclicos al igual que la zeaxantina y la astaxantina¹.

4 Introducción

En las últimas décadas, los carotenoides presentes en los alimentos se han asociado a procesos biológicos que pueden tener relevancia fisiológica para la salud y enfermedades crónico-degenerativas. Algunas de las acciones biológicas de los carotenoides incluyen la actividad antioxidante, comunicación intercelular, diferenciación celular, estimulación del sistema inmune e inhibición de los procesos de mutagénesis. Diversos estudios en modelos *in vitro* y en modelos animales *in vivo*, han hecho surgir una serie de hipótesis relacionadas con el papel de los carotenoides en la salud y en la enfermedad.

Krinsky² ha clasificado y descrito adecuadamente los efectos biológicos de los carotenoides en términos de funciones, acciones y asociaciones con la salud. La única función biológica universalmente aceptada de los carotenoides en relación con la salud humana es su papel como precursores de vitamina A.

Como es de esperar las funciones biológicas, acciones y asociaciones de los carotenoides están relacionadas con su estructura química y propiedades fisicoquímicas. Un anillo ionona sin sustituir, parte de la estructura química del β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina, otorga a estos carotenoides la capacidad de metabolizarse a vitamina A en los mamíferos. Por otro lado, el sistema conjugado de dobles enlaces es responsable de las propiedades antioxidantes *in vitro*, por lo que se ha atribuido a estos compuestos un papel protector contra del estrés oxidativo asociado a las enfermedades crónico-degenerativas. Sin embargo *in vivo*, resulta difícil identificar un mecanismo de acción específico y su relación con alguna de estas enfermedades, por lo que existen vacíos en el conocimiento de las funciones, acciones y asociaciones con estados patológicos específicos. En este sentido las relaciones entre la estructura y la función podrán ser un punto de partida para nuevas hipótesis y usos potenciales en la salud de estos compuestos.

Se han identificado y aislado más de 600 carotenoides diferentes de fuentes naturales³. Afortunadamente los carotenoides pueden ser considerados como un grupo en términos de su estructura química básica y de sus propiedades físicas.

Los carotenoides se sintetizan por la unión extremo-extremo de moléculas de 20 carbonos de geranio-geranil difosfato, por lo que se produce un esqueleto común de 40 carbonos a partir del cual se derivan las variaciones individuales. En la figura 1 pueden verse dos estructuras que muestran los extremos estructurales y funcionales de este grupo de compuestos.

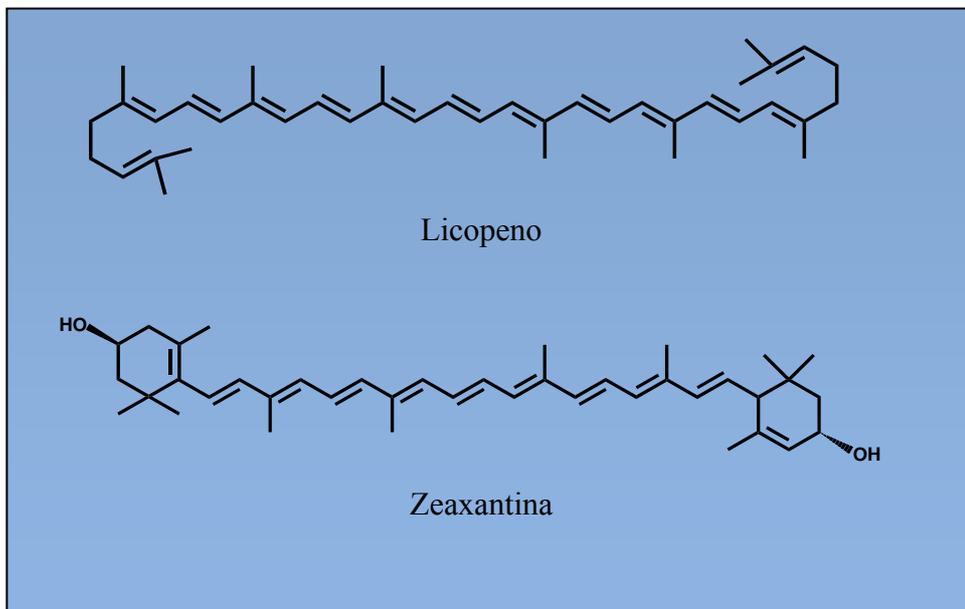


Figura 1.- Estructura química de licopeno, un carotenoide acíclico y de zeaxantina, un carotenoide cíclico.

6 Introducción

Tradicionalmente los carotenoides han recibido nombres triviales, usualmente de las fuentes naturales de las que se aislaron por primera vez. Esto sigue siendo una práctica común sobre todo en la biología aunque la IUPAC ha publicado reglas específicas⁴. A partir de esto se ha desarrollado una forma semisistemática de nomenclatura donde se usa el término caroteno precedido de la letra griega que designa los dos grupos terminales. Debido a que muchos carotenoides tienen actividad óptica, la quiralidad se indica con el sistema convencional R-S. Algunos carotenoides tienen una estructura de menos de 40 átomos de carbono debido a la pérdida del esqueleto original.

Las reacciones químicas de los grupos en los extremos de los carotenoides son importantes para la caracterización, derivación y síntesis. En general, la cadena polieno es la parte más importante en la molécula en cuanto a su reactividad con otros compuestos. Esto es debido a que es un sistema rico en electrones y susceptible de ser atacada por reactivos electrofílicos. En este sentido, se puede decir que es la responsable de la inestabilidad y oxidación de los carotenoides y es la característica más importante en relación a las propiedades antioxidantes.

En los organismos vivos los carotenoides normalmente se localizan en las membranas, donde forman parte integral de éstas. El estudio del comportamiento de estas moléculas en sistemas de membranas ha dado información acerca de la interacción y de la orientación de los carotenoides. Se sabe que esta última depende de las propiedades fisicoquímicas de la molécula. Además, la presencia de carotenoides en las membranas será capaz de modificar las propiedades mecánicas, la fluidez e inclusive la permeabilidad de diferentes tipos de moléculas incluyendo el O₂.

Los carotenoides están fuertemente estabilizados por proteínas, por lo que *in vivo* son mucho más estables que aquellos que son sintetizados en el laboratorio. El transporte y la funcionalidad de los carotenoides en

ambientes hidrófilos dependen de su asociación con los dominios hidrófobos de las proteínas. Las interacciones con proteínas, también modifican las propiedades fisicoquímicas. En la interacción de la astaxantina con proteínas en los crustáceos, para formar caroteno-proteínas como la α -crustacianina, se produce un efecto batocrómico del espectro de absorción de la luz por una modificación en la distribución de la densidad electrónica, cambiando de un máximo de absorción de 480 nm a 632 nm⁵

Muchas de las enfermedades crónico-degenerativas, incluyendo el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, tienen en alguna etapa como factor común procesos de oxidación que son mediados por radicales libres. Para ser un antioxidante efectivo, una molécula debe ser capaz de retirar esos radicales ya sea reaccionando con ellos para dar productos inocuos o frenando las reacciones en cascada de los radicales libres⁶, aspectos que se describen ampliamente para la astaxantina más adelante.

2. Astaxantina

La astaxantina es una xantofila u oxicarotenoide (3,3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4, 4'-diona) responsable de la coloración de los salmones, truchas, langostas, langostinos, flamencos; así como de varias especies de algas y levaduras. Históricamente este pigmento se ha obtenido de fuentes naturales, con el fin de aumentar la pigmentación de salmónidos criados de manera intensiva, ya que la coloración del músculo es uno de los criterios más importantes en la calidad de estos productos que determina su valor en el mercado. Debido a que las fuentes naturales de astaxantina no aseguraban una calidad constante del pigmento, algunas empresas de importancia en el área de la química intentaron la síntesis en el laboratorio. Es a partir de la mitad de la década de los 80 cuando se tiene disponible este producto en el mercado en dos presentaciones: una con el 5% y otra con el 10% de pigmento⁷. A partir del uso en la cría de peces se observan una serie de ventajas en su utilización, que no solamente se refieren a la coloración de los productos, sino al rendimiento de los sistemas de

8 Introducción

producción donde se utilizan, ya que la mortalidad de los animales se reduce, presentan menos estrés fisiológico y les permite un mayor crecimiento⁸.

En la figura 2 se muestra la estructura química de la astaxantina que se puede encontrar en tres isómeros ópticos 3R,3'R; 3R,3'S; 3S,3'S. Estructuralmente está relacionada con el β -caroteno, la luteína y la zeaxantina, sin embargo, tiene características muy particulares debido a la presencia de grupos OH y ceto (C=O) en los dos anillos extremos. Esto le confiere una serie de características únicas como la posibilidad de esterificarse, un poder antioxidante no solamente limitado a sus dobles enlaces conjugados sino a los grupos mencionados en sus dos anillos, y una polaridad alta con respecto a la generalidad de xantofilas⁹.

Se encuentra en forma natural conjugada con proteínas o esterificada con uno o dos ácidos grasos y en forma libre es especialmente susceptible a la oxidación. Debido a su estructura de dobles enlaces conjugados, es capaz de absorber luz en el intervalo de la luz visible por lo que es un cromóforo. Las variaciones en la luz absorbida vienen dadas por la concentración de la astaxantina así como por su asociación con otras moléculas. Es insoluble en agua, soluble en la mayoría de los solventes orgánicos, ya que debido a su mayor polaridad es soluble en solventes donde otros carotenoides no lo son como el etanol y el metanol.

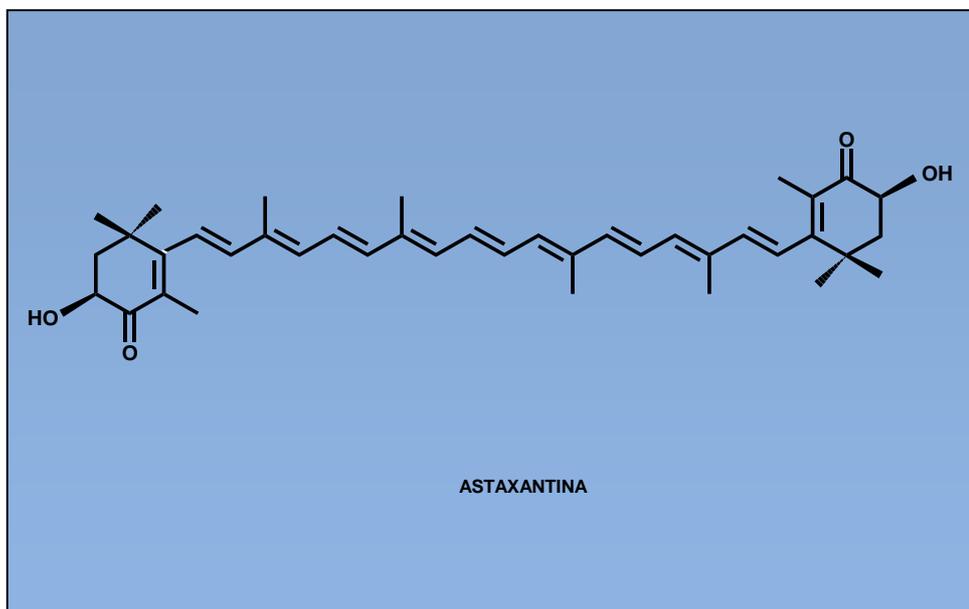


Figura 2.- Estructura química de astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β -caroteno-4, 4'-diona).

En la figura 3 se muestran resumidas sus propiedades físicas y químicas. Muchas de las actividades biológicas de esta molécula han sido atribuidas a su capacidad antioxidante. Algunos autores han resaltado su capacidad de “desactivar” radicales libres y sobre todo de estabilizar el oxígeno singlete. Otros autores mencionan que esa capacidad antioxidante es debida a sus grupos C=O por lo que al compararlo con el β -caroteno y la zeaxantina resulta interesante esta capacidad especialmente alta⁹. Irónicamente, la misma cadena de polieno y los grupos C=O son la principal causa de su inestabilidad química.

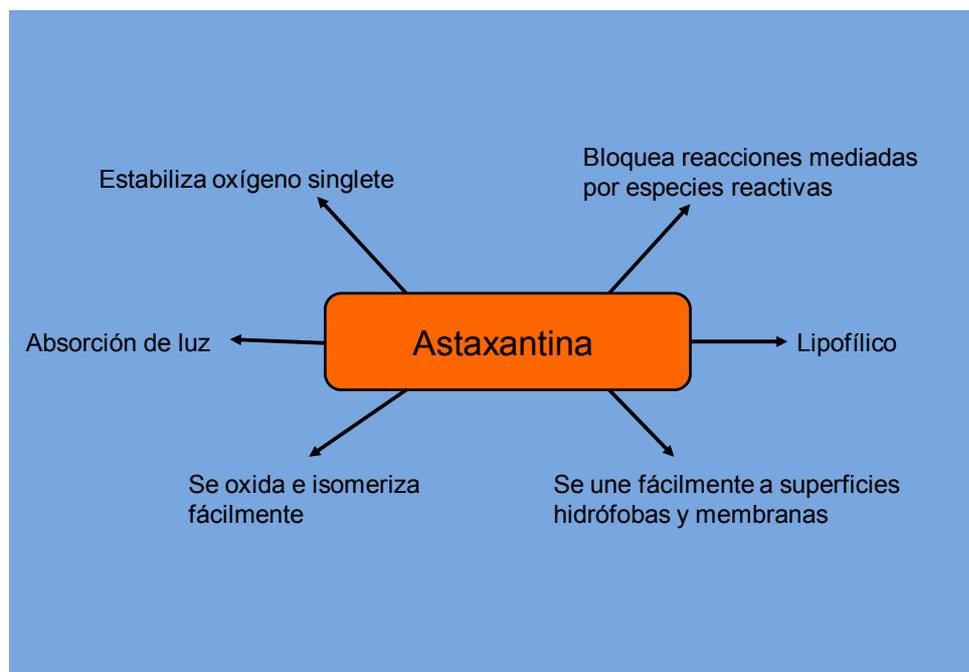


Figura 3.- Principales propiedades fisicoquímicas de la astaxantina.

Debido a su alta capacidad como antioxidante, se le han atribuido diversas propiedades y beneficios para la salud, aspecto que se revisa más adelante.

Se han publicado pocos trabajos acerca de la farmacocinética y de la biodisponibilidad de la astaxantina. Un trabajo reciente demuestra la presencia de isómeros geométricos *Z/E* y ópticos *R/S* de astaxantina sin esterificar en plasma, después de haber administrado una dosis única de astaxantina como mezcla de isómeros 3*R/S*3' de diésteres de ácidos grasos. Los autores muestran que el isómero *Z* se absorbe de manera selectiva alcanzando una concentración plasmática que representa el 32% del total después de 6 a 7,5 horas postprandial y que el isómero *E* se asocia preferentemente a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y a las

proteínas de quilomicrones plasmáticos en comparación con la cantidad encontrada en asociación con las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en las de alta densidad (HDL). Sus resultados sugieren que existe un proceso selectivo para que el isómero Z predomine sobre el E y que este proceso puede estar ligado a una hidrólisis selectiva o diferencial de los ésteres de ácidos grasos de astaxantina durante el proceso de digestión y absorción¹⁰.

También se han reportado datos sobre biodisponibilidad y farmacocinética de astaxantina, se administró oralmente en dosis única de 40 mg en adultos sanos. Se utilizaron tres formulaciones con base lipídica en igual concentración y se comparó con una referencia con base no lipídica (dextrina y gelatina). Cabe resaltar que la biodisponibilidad de las presentaciones con base lipídica fue de 1,7 a 3,7 veces superior a la de referencia, siendo mejor la formulación con polisorbato 80. El área bajo la curva de concentración de astaxantina en plasma frente al tiempo, estuvo entre 1347 y 4960 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{l}$. Se menciona que la cinética sigue un modelo monocompartimental, con una vida media de $15,9 \pm 5,3$ h, con valores de concentración máxima de $55,2 \pm 15,0$ a $191,5 \pm 59,3$ $\mu\text{g}/\text{l}$ ¹¹.

Existen diferentes trabajos sobre los beneficios de la astaxantina para la salud, lo común en estos trabajos es que la capacidad antioxidante tan alta con respecto a otros antioxidantes naturales es la clave de sus diversas propiedades. Así se encuentran datos de sus propiedades como fotoprotector a las cuales se asocia su posible aplicación en la salud de la piel y de los ojos, sus propiedades anti-inflamatorias, anticancerígenas, como inmuno-modulador, su aplicación en enfermedades neurodegenerativas, en la función hepática y desintoxicación y sus beneficios para el sistema cardiovascular. Si bien se han encontrado trabajos sobre otros aspectos como la salud reproductiva y en diabetes, aquí sólo se mencionarán de manera muy general los más importantes haciendo énfasis en la parte que corresponde al sistema cardiovascular.

La astaxantina, como otros carotenoides, tiene un papel en la naturaleza como fotoprotector en contra de los posibles daños causados por la radiación ultravioleta. La exposición de los tejidos a este tipo de radiación produce oxígeno singlete y otros radicales libres, lo que lleva a la posible foto-oxidación de los lípidos de las membranas celulares y por extensión de los tejidos. La capacidad fotoprotectora y antioxidante de la astaxantina puede ser superior a la del β -caroteno y de la luteína¹², por lo que se ha visto la posibilidad de desarrollar fotoprotectores en forma oral¹³.

Entre las principales causas de la disminución de la función visual y de la ceguera se encuentran la degeneración macular relacionada con la edad y la aparición de cataratas en los adultos mayores. Estas a su vez están relacionadas con un proceso de oxidación inducido por la luz, en este sentido no es una sorpresa que a nivel epidemiológico el riesgo de la degeneración macular relacionada con la edad se reduce con el consumo de productos que contienen carotenoides, específicamente luteína y zeaxantina pues éstos se concentran en la mácula. Desde este punto de vista también se piensa que por sus propiedades la astaxantina pudiese derivar en otras aplicaciones en este campo¹⁴.

Es bien sabido que en los procesos inflamatorios, la concentración de fagocitos y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) llevan a un desequilibrio entre las especies pro-oxidantes y los mecanismos celulares de protección contra estas condiciones. Del mismo modo conocemos que los oxidantes que producen los fagocitos, como el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), están directamente relacionados con la estimulación de genes asociados con el proceso inflamatorio en células endoteliales. También se ha demostrado que la astaxantina ayuda a reducir los signos asociados a la inflamación producida a nivel gástrico por *Helicobacter pylori* en ratones¹⁵.

Existen varios trabajos que describen propiedades anticancerígenas de la astaxantina, entre éstos cabe mencionar el de Tanaka y col.,¹⁶ en el que

describen que reduce la incidencia de cáncer producido por un carcinógeno químico en vías urinarias de ratones. En otro estudio donde se alimentan ratas con un carcinógeno y con astaxantina, ésta reduce de manera significativa la incidencia de cáncer en la cavidad bucal de las ratas con resultados superiores a los del β -caroteno¹⁷. Del mismo modo se ha visto una menor incidencia de cáncer de colon en un modelo de ratas¹⁸. En un modelo de cáncer de mama con ratones la administración de astaxantina reduce en más del 50% la incidencia de tumores, los resultados son superiores a los mostrados por el β -caroteno y la cantaxantina¹⁹.

Se ha propuesto el uso de astaxantina en humanos para inhibir la enzima 5- α -reductasa, responsable del crecimiento de la próstata en hiperplasia prostática benigna²⁰. Al parecer el papel de la astaxantina y de otros carotenoides estaría relacionado con la regulación al alza de la conectina 43 y la comunicación intercelular²¹.

Entre las funciones más importantes del hígado destacan la oxidación de lípidos para producir energía, la desintoxicación por eliminación de contaminantes y la destrucción de microorganismos, así como de glóbulos rojos muertos. En todos estos procesos se libera una cantidad significativa de radicales libres y subproductos de la oxidación por lo que un buen balance de mecanismos antioxidantes en las células hepáticas es importante. En este sentido algunos trabajos indican que la astaxantina es más efectiva que la vitamina E en la protección de las mitocondrias de hepatocitos frente a la peroxidación y que induce la actividad de enzimas que metabolizan xenobióticos^{22,23}.

Se ha demostrado en varios ensayos *in vitro* e *in vivo*, usando diferentes modelos animales, que la astaxantina influye significativamente en la función inmune. Por ejemplo en glóbulos rojos de ratón tratados con astaxantina existe una mayor producción de anticuerpos a antígenos T dependientes²⁴. También se ha indicado que es capaz de restablecer la

respuesta inmune en ratones de edad avanzada²⁵. Otras evidencias en el mismo sentido refuerzan un papel inmuno-modulador de la astaxantina^{26,27}.

En cuanto a las enfermedades neurodegenerativas solamente se ha comentado el papel cada vez más relevante del estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades como la de Alzheimer, Huntington, Parkinson y esclerosis amiotrófica lateral^{28,29,30,31}. Debido a las propiedades antioxidantes de la astaxantina, se considera que pudiera ser un buen candidato para evaluar su efecto en los estados patológicos mencionados.

En el sistema cardiovascular, las ERO juegan un papel fisiológico esencial para mantener la integridad del sistema y en la generación de situaciones patológicas como la hipertensión arterial (HTA), diabetes y aterosclerosis. Entre las ERO asociadas a estos estados destacan: el $\bullet\text{O}_2^-$, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\bullet\text{HO}^-$), especies reactivas de nitrógeno (ERN), óxido nítrico (NO) y peroxinitritos (ONOO^-).

En condiciones normales, las ERO se producen en concentraciones bajas, de manera controlada y funcionan como moléculas de señalización en la regulación de la contracción y relajación del tejido muscular liso así como de su crecimiento. Por otro lado, en condiciones patológicas el incremento en las ERO lleva, entre otras cosas, a³²:

- Disfunción endotelial.
- Incremento de la contractilidad.
- Crecimiento y apoptosis de las células del músculo liso vascular.
- Migración de monocitos.
- Peroxidación de lípidos.
- Inflamación.
- Formación de depósitos extracelulares de matrices proteínicas

Existen excelentes revisiones sobre el papel de los antioxidantes en la protección del endotelio y su función³³. Sin embargo cabe destacar que los trabajos de la astaxantina como cardioprotector^{34,35} o regulador de la presión son pocos y muy recientes^{36,37,38}.

En uno de ellos se demuestra un claro efecto antihipertensivo debido a un mecanismo relacionado con la producción de NO. Del mismo modo se considera que la astaxantina tiene un efecto neuroprotector presumiblemente debido a su capacidad antioxidante³⁶. De manera complementaria se menciona que el efecto antihipertensivo también está relacionado con un efecto modulador de la fluidez de la sangre, no relacionado con los cambios de fibrinógeno, ya que éste mantiene sus valores en los grupos experimentales y control. En el mismo estudio no se encontró una mejor relajación dependiente del endotelio por la administración de astaxantina, por lo que los cambios los pueden atribuir a la capacidad de deformación o flexibilidad y de agregación de las células sanguíneas, sin embargo, sugieren profundizar en estos estudios³⁷.

En el último trabajo publicado por este grupo³⁸, se destacan dos aspectos interesantes: uno relacionado con la menor producción de metabolitos de la oxidación de NO en relación a la administración de astaxantina así como una mejora en la morfometría de las arterias coronarias y la aorta, aspectos que se retomarán más adelante. En la figura 4, se representan los posibles mecanismos de acción antihipertensivos de la astaxantina y su relación con las ERO³⁹.

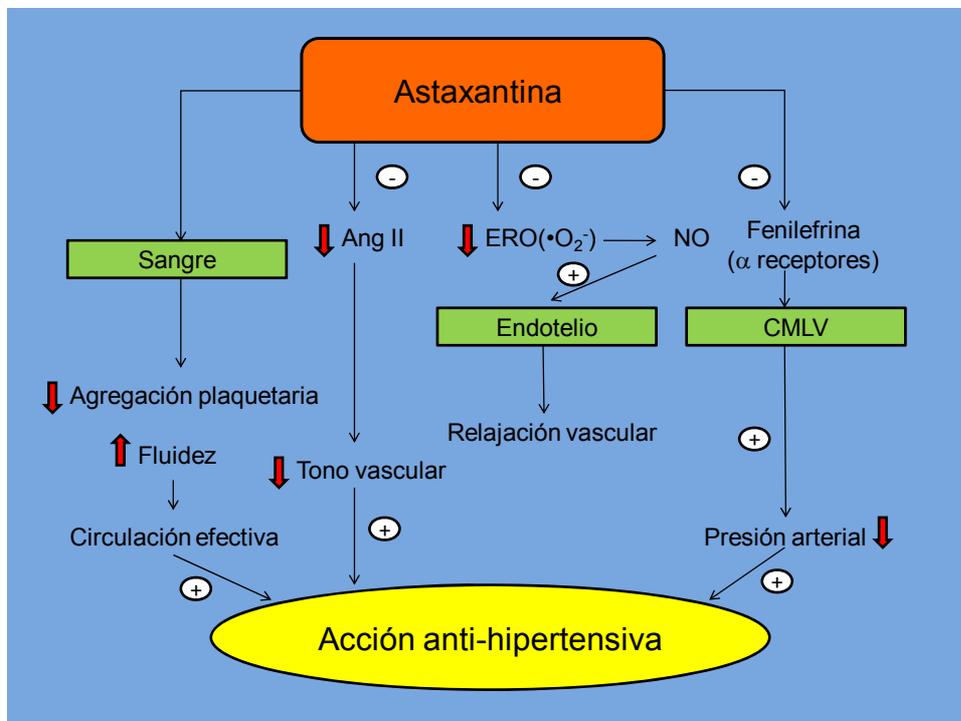


Figura 4.- Mecanismos implicados en la acción antihipertensiva de la astaxantina. Adaptado de Hussein et al³⁹.

HIPERTENSIÓN ARTERIAL

1. Definición y clasificación

La HTA es un estado patológico caracterizado por un aumento crónico de la tensión arterial por encima de los valores normales. No es una enfermedad en el sentido habitual de la palabra, de hecho se la conoce como la “asesina silenciosa”, ya que durante la mayor parte de su historia natural no presenta síntomas y cuando éstos se presentan puede ser demasiado tarde, pues corresponden a graves complicaciones cardiovasculares como son el infarto de miocardio y la enfermedad cerebrovascular, entre otras (Figura 5)⁴⁰.

Unas cifras elevadas de tensión arterial, por sí mismas, no determinan ningún tipo de sintomatología, sin embargo la HTA va produciendo daño en órganos diana como el corazón, los vasos sanguíneos y el riñón. Estos órganos son los elementos más importantes en la regulación de la presión arterial (PA) y quizás por ello son los que sufren de forma más directa el impacto de la hipertensión. En todos ellos se produce un proceso de **remodelado** que inicialmente puede ser adaptativo o reparador, pero si las cifras de PA se mantienen elevadas o su control es ineficaz degenera hacia daños importantes, que predisponen al organismo a ciertas patologías, que a su vez agravan el proceso hipertensivo, creando así un círculo vicioso.

La HTA podría simplemente definirse como una elevación crónica de la PA (sistólica y/o diastólica), pero en la práctica clínica resulta difícil saber qué niveles tensionales deben considerarse normales y cuáles son elevados, puesto que no se trata de unos valores fijos e idénticos para todas las poblaciones y no permanecen inalterables durante toda la vida en el individuo normal. Las cifras de tensión arterial se modifican con la edad, sexo, raza y otros muchos factores, además de modificarse a lo largo del día en cada individuo en relación con diferentes determinantes, como el ejercicio, el frío, la digestión o la carga emocional.

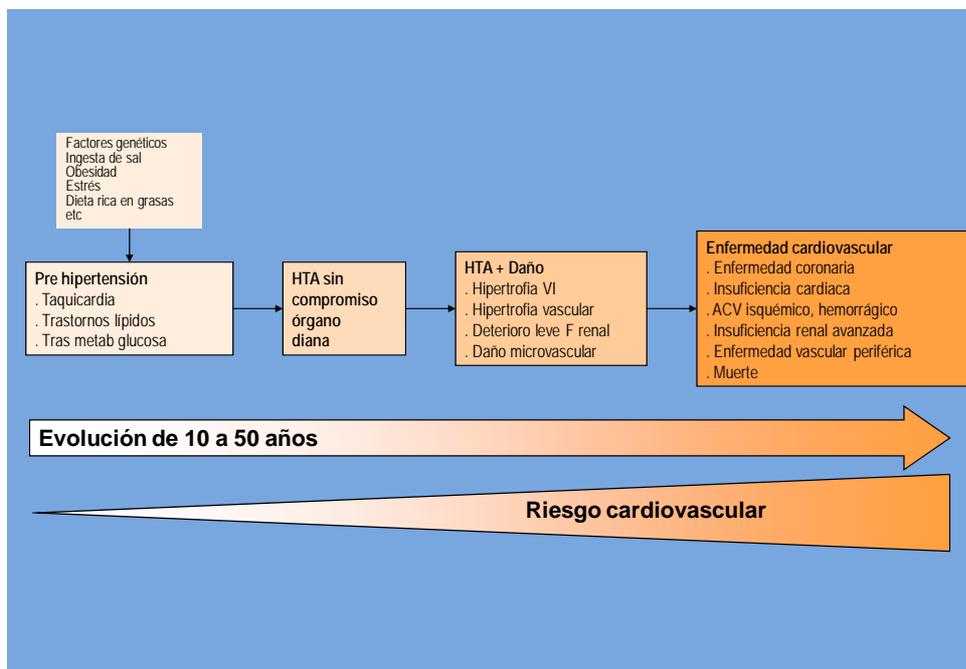


Figura 5.- Evolución de la hipertensión arterial. Adaptado de Williams B.⁴⁰

Dada la dificultad de establecer unas cifras normales de tensión arterial válidas para toda la población, se han establecido unos **valores convencionales**. Por acuerdo entre expertos se consideran **anormales** aquellos valores que con toda seguridad implican un determinante de riesgo cardiovascular (RCV) y, de acuerdo a este criterio, se ha establecido el diagnóstico de HTA cuando tras tres determinaciones separadas, como mínimo por una semana, se obtiene un promedio de presión arterial diastólica (PAD) igual o superior a 90 mmHg y/o una presión arterial sistólica (PAS) igual o superior a 140 mmHg, para un adulto a partir de los 18 años.

No obstante, la progresiva consideración médica de categorías de PA no hipertensivas, y del riesgo absoluto de enfermedad cardiovascular (ECV) en función de los niveles de la PA (y de otros factores de riesgo y trastornos clínicos) podría estar cambiando el paradigma de definición y manejo de la HTA hacia el concepto de caso de **PA para tratar** (en función de sus cifras y el riesgo)⁴¹.

La hipertensión puede clasificarse en categorías en función de los valores de PA. En la tabla 1 se muestra la clasificación de los valores de PA propuesta en las guías conjuntas de la Sociedad Europea de Hipertensión (SEH) y la Sociedad Europea de Cardiología (SEC)⁴² actualizadas en 2007⁴³, asumida por la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA).

Existen algunas discrepancias, no sustanciales, con la clasificación publicada en el año 2003, en el Séptimo Informe del Comité Nacional Conjunto de Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión de EE.UU., conocido por sus siglas en inglés como JNC-7⁴⁴. La clasificación del JNC-7 utiliza el término “prehipertensión” para las categorías de PA con valores de 120-139/80-89 mmHg, con el fin de identificar a aquellos sujetos en los que la intervención temprana con medidas de estilo de vida sano podría reducir la PA y el progreso a HTA con el paso de los años. En cambio, la SEH considera estos niveles dentro de la normalidad ya que desde hace unos años ya no se habla de “hipotensión”, sino de “presión arterial óptima” porque se ha demostrado que cuanto más baja se tenga la PA, mejor es la prevención de la ECV. Esto está basado en el estudio Framingham⁴⁵ en el que se señala que el riesgo de desarrollar HTA es más alto en sujetos con PA normal-alta que en individuos con PA normal.

Tabla 1.- Clasificación de la presión arterial propuesta por la Sociedad Europea de Hipertensión (SEH) y la Sociedad Europea de Cardiología (SEC)⁴².

CATEGORÍA	SISTÓLICA (mmHg)	DIASTÓLICA (mmHg)
ÓPTIMA	< 120	y < 80
NORMAL	120-129	y/o 80-84
NORMAL-ALTA	130-139	y/o 85-89
HTA GRADO 1	140-159	y/o 90-99
HTA GRADO 2	160-179	y/o 100-109
HTA GRADO 3	≥ 180	y ≥110
HTA SISTÓLICA AISLADA	>140	y <90

La SEH ha decidido no utilizar el término prehipertensión por varias razones:

- Hay poca razón para juntar los dos grupos, pues incluso en el estudio Framingham el riesgo de desarrollar HTA es más alto en los individuos con PA normal-alta.
- El término prehipertensión puede crear ansiedad y solicitar visitas médicas innecesarias en muchos sujetos.
- Aunque la guía americana recomienda cambios en el estilo de vida para todos los prehipertensos y esto es una estrategia positiva, en la práctica nos encontramos tanto con individuos que no necesitan

ninguna intervención (personas mayores con PA normal) como con individuos con un perfil de RCV alto o muy alto (personas con diabetes) en los que se requiere tratamiento.

En definitiva, que el umbral para considerar HTA debe ser flexible, siendo más alto o más bajo en función del RCV total de cada individuo. Por otro lado, se considera que la HTA es el resultado de una interacción compleja entre factores genéticos y factores ambientales. Esto determina cambios en factores y sistemas efectores que conducen a las alteraciones de las dos variables fisiológicas de las que depende la PA: el gasto cardiaco (GC) y las resistencias vasculares periféricas (RVP).

$$PA = GC \times RVP$$

El aumento de estas variables lleva a la elevación de la PA y finalmente, a través de cambios funcionales y estructurales, al establecimiento de la HTA. Con el conocimiento actual no es posible proponer de manera concluyente el origen de la HTA y, en este sentido, se considera la existencia de una variedad de factores que participan en el desarrollo y mantenimiento de la HTA⁴⁶.

Además del GC y las RVP contribuyen otros dos factores directos como la impedancia y el volumen arterial diastólico. El GC depende del volumen sistólico y de la frecuencia cardiaca (FC). A su vez, el volumen sistólico varía según la contractilidad cardiaca y el retorno venoso. Por su parte, las RVP están reguladas por factores nerviosos, humorales y locales⁴⁷.

Sobre estos factores directos intervienen los denominados indirectos como: la actividad nerviosa central y periférica autónoma, la reserva corporal de sodio y líquido extracelular, el sistema renina-angiotensina (SRA) y hormonas locales como prostaglandinas, cininas, factor natriurético auricular y otros péptidos.

El sistema nervioso autónomo, especialmente el sistema simpático (SNS), juega un papel importante en el control circulatorio por mecanismos reflejos o actuando sobre el tono vascular. En situaciones normales el reflejo neural sirve para aumentar la PA cuando baja y reducirla cuando sube.

Los mecanismos que regulan la PA a largo plazo están relacionados con la excreción de sodio y el líquido extracelular que es un factor hemodinámicamente importante. El riñón juega un papel esencial en la regulación de la PA y del balance de agua y de electrolitos. Los niveles de sodio están influenciados tanto por la ingesta como por la capacidad de excreción renal⁴⁸.

El SRA participa en la regulación de todo el sistema, se activa cuando se reduce el volumen minuto lo que conduce a la formación de angiotensina II (Ang II)⁴⁹. Debido a la importancia de este sistema, a la interacción de la Ang II con otras moléculas que se producen en los vasos sanguíneos y a que uno de los modelos de HTA utilizados en esta tesis fue mediante la infusión de Ang II en ratones Swiss Albino-CD1; a continuación se detalla un poco más de las características del SRA.

2. El sistema renina-angiotensina

La llamada cascada del SRA se inicia con la renina, una enzima proteolítica que procede de una molécula mayor, la preprorenina. La transformación de prorenina en renina tiene lugar mediante la acción de diversas peptidasas, como la plasmina, la tonina, la calicreína, la elastasa, el activador tisular del plasminógeno, la catepsina G y la enzima activadora de la renina derivada del endotelio. La renina actúa sobre su sustrato, el angiotensinógeno, una α -2 globulina de origen hepático, generando un decapeptido inactivo, la angiotensina I (Ang I). A su vez, la Ang I sirve de sustrato a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para dar lugar al octapeptido Ang II, que es el factor biológicamente más activo del sistema

y su principal efector. La Ang II, por acción de la aminopeptidasa A, origina la angiotensina III o angiotensina (2-8), con acciones similares a la anterior aunque de menor potencia. Asimismo, la acción de la aminopeptidasa B sobre la Ang II da lugar a la angiotensina IV, cuyo papel fisiológico aún se sigue investigando. Mediante la acción de una endopeptidasa sobre la Ang I o sobre la Ang II se produce la angiotensina (1-7) cuyas acciones parecen ser dependientes de las prostaglandinas y del NO y opuestas a las de la Ang II⁵⁰.

Recientemente se ha destacado la existencia de vías enzimáticas de síntesis de la Ang II distintas del SRA que tienen la capacidad de generar Ang II directamente a partir del angiotensinógeno, como la catepsina G, la tonina y el activador tisular del plasminógeno. Además de la ECA, se ha demostrado que la catepsina G, la quimasa y la enzima generadora de Ang II sensible a la quimoestatina también tienen capacidad de producir Ang II a partir de Ang I. Aunque la importancia fisiológica o fisiopatológica de estas vías de síntesis de Ang II permanece todavía por esclarecer, recientemente se ha sugerido que la vía de la quimasa en el corazón y en la pared vascular podría tener importancia tanto en el aspecto funcional como en las alteraciones estructurales que la Ang II produce en estos órganos^{51,52}.

Tradicionalmente se ha considerado la existencia de un SRA circulante. Sin embargo, no es el único SRA, ya que se ha detectado la presencia de todos los componentes del SRA y de su ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en diferentes tejidos, como el cerebro, las glándulas suprarrenales, el corazón, los vasos sanguíneos y los órganos reproductores. Se ha propuesto que el SRA circulante tiene una acción fundamentalmente endocrina, mientras que los SRA tisulares tienen acciones autocrinas y paracrinas. Aunque se acepta este esquema actualmente, cada vez parece más difícil establecer una frontera clara entre el SRA circulante o sistémico y los tisulares. Ello es debido a que algunos

componentes circulantes, como el angiotensinógeno o la renina, podrían ser captados por los tejidos y participar en la producción tisular de Ang II; asimismo, la Ang II producida localmente podría pasar a la circulación y formar parte del SRA circulante. Como consecuencia de esto, la visión más actual propugna la existencia de un SRA que englobaría al circulante y a los tisulares, y que realizaría tanto funciones endocrinas como paracrinas, autocrinas e intracrinas⁵³.

La ECA se ha encontrado en la capa adventicia, en las células de músculo liso y en el endotelio⁵⁴. En este sentido tanto el angiotensinógeno como su ARNm se han detectado en las células vasculares de músculo liso, en el endotelio y en la grasa perivascular. Debido a que presumiblemente la renina no está presente en los vasos, la generación local de Ang II estaría regulada por la ECA tisular que a su vez sería dependiente de la renina en circulación; se piensa que la Ang II producida localmente es más importante en la vasoconstricción que la Ang II circulante. El componente sistémico participa en la homeostasis circulatoria a corto y medio plazo, mientras que a nivel tisular contribuye a la regulación de la función cardiovascular y puede dar lugar a cambios estructurales, en los cuales la Ang II puede actuar como factor de crecimiento^{55,56}.

La Ang II ejerce sus acciones a través de su unión a receptores específicos. Se han descrito varios tipos de receptores para la Ang II, pero los más conocidos en la actualidad son los AT₁ y los AT₂. Los receptores AT₁ se localizan principalmente en los vasos, el riñón, el corazón, el cerebro, el útero, los adipocitos, el ovario, el bazo y el pulmón. Los receptores AT₂ se han detectado fundamentalmente en tejidos embrionarios o en crecimiento, y en individuos adultos se han encontrado en la pared vascular, las glándulas suprarrenales, el sistema nervioso central, el miometrio y en los folículos ováricos atrésicos.

El receptor AT₁ pertenece a la familia de receptores acoplados a las proteínas G o proteínas fijadoras de guanosa trifosfato (GTP), con siete

dominios transmembrana. La unión de la Ang II a este receptor activa la fosfolipasa C, que a su vez hidroliza el fosfatidil-4,5-bifosfato, formándose inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ actúa sobre receptores específicos localizados en la membrana del retículo sarcoplásmico y facilita la liberación del calcio y la posterior entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio. El resultado final es un aumento de la concentración intracelular de este ión. A su vez, el DAG activa y transloca la proteína cinasa C (PKC) hacia la membrana celular, donde estimula la fosforilación de diversas proteínas, activa el intercambiador Na⁺/H⁺ y la fosfolipasa A₂ y conduce finalmente a la activación de canales de calcio voltaje-dependientes.

El receptor AT₂ presenta también una estructura con siete dominios transmembrana. Tiene poca homología (34%) con el receptor AT₁, y la transducción de la señal no parece estar asociada a la activación de los fosfoinositoles ni a incrementos de la concentración intracelular de calcio. La unión de la Ang II a su receptor AT₂ conduce a la activación de la enzima tirosina fosfatasa que inhibe la fosforilación de diversas proteínas^{57,58,59}.

La mayoría de las acciones bien conocidas de la Ang II, es decir, aquellas que ejerce sobre órganos diana como el riñón, el corazón, las arterias, los sistemas nerviosos central y periférico, y las glándulas suprarrenales, tienen lugar mediante la interacción con receptores AT₁. Dichas acciones, de una manera directa o indirecta, afectan a la homeostasis cardiovascular y renal y como consecuencia participan en el desarrollo y mantenimiento de trastornos tales como la HTA, la insuficiencia renal, la nefropatía diabética, etc⁶⁰.

Aunque se desconoce en gran medida el papel funcional de los receptores AT₂, la marcada expresión de los receptores AT₂ en tejidos embrionarios ha llevado a suponer que éstos desempeñan un papel importante en el crecimiento y desarrollo celular, particularmente durante el período fetal, y que podría sobreexpresarse en ciertas situaciones patológicas. Mediante la

utilización de antagonistas específicos de los receptores AT₂ se ha atribuido a estos receptores acciones opuestas a las de los AT₁ sobre el tono y el crecimiento de las células vasculares de músculo liso y sobre la función renal⁶¹. En la tabla 2 se presentan las características farmacológicas de los receptores de Ang II⁶².

En el sistema nervioso central la Ang II participa en procesos tan diversos como los relacionados con la memoria, la atención, el comportamiento, la regulación vasomotora, la secreción de vasopresina, el mecanismo de la sed, la ingestión de sal y la secreción de la hormona adrenocorticotrópica. A nivel periférico, la Ang II, a través de los receptores AT₁, amplifica o facilita la actividad del SNS, por lo que este mecanismo contribuye a la acción vasoconstrictora de la Ang II⁶³. Esta acción facilitadora actúa a nivel presináptico, mediante un aumento de la liberación y de la síntesis de catecolaminas en las terminales nerviosas, así como mediante una reducción de su recaptación. A nivel postsináptico, la Ang II potencia el efecto contráctil de la noradrenalina mediante la sensibilización de los receptores de ésta.

La Ang II participa en la regulación del tono vascular mediante su acción vasoconstrictora del músculo liso vascular y a través de su acción facilitadora de la transmisión adrenérgica. Asimismo, la Ang II participa en el crecimiento vascular, al estimular la proliferación de células vasculares de músculo liso (CMLV), células endoteliales o fibroblastos, así como la acción y la producción de diversos factores mitogénicos. Ello posibilita la angiogénesis, pero también el engrosamiento patológico de la pared vascular. Las modificaciones estructurales de la pared arterial pueden ser debidas a tres procesos distintos: la hipertrofia, la hiperplasia y el remodelado de los componentes de la pared vascular⁶⁴. Esta modificación de la estructura de los vasos arteriales tiene importantes repercusiones no sólo morfológicas, sino también funcionales para diversos órganos como el corazón, el sistema nervioso central y el riñón.

Tabla 2.- Características farmacológicas de los receptores de angiotensina II

RECEPTOR	
AT ₁	AT ₂
Vasoconstricción (\downarrow NO, \uparrow Ca _i ⁺⁺ intracelular y \uparrow •O ₂ ⁻) y \uparrow PA	Desarrollo de tejido fetal
Inflamación (\uparrow factor de transcripción o nuclear kappa (NF-kB))	Vasodilatación (\uparrow de bradicinina (Bk) y NO), así como \downarrow de PA
Crecimiento y proliferación celular (vía <i>c-fos</i> , <i>c-myc</i> , <i>c-jun</i>)	Inflamación (\uparrow NF-kB)
Antinatriuresis	Mejora de la función cardíaca y \downarrow del efecto cronotrópico
Incremento de aterogenicidad (\uparrow Ox LDL)	Diferenciación de células vasculares
Modulación de la actividad del SNS	Inhibición de crecimiento (\downarrow cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAP cinasas))
\downarrow Flujo sanguíneo renal	
\uparrow Contracción del miocardio, \uparrow Actividad simpática	
\uparrow Arritmias, \uparrow inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1)	
\uparrow Liberación de endotelina	

La Ang II, a través de los receptores AT₁, ejerce en el corazón un efecto inotrópico y cronotrópico positivo que conduce a un aumento del volumen minuto. Es importante destacar que estos efectos tienen lugar con cantidades de Ang II que carecen de efecto vasoconstrictor. Además de estas acciones directamente relacionadas con la función miocárdica, la Ang II participa en la regulación del flujo coronario mediante un efecto vasoconstrictor similar al descrito para las arterias en general. La Ang II ejerce también una función trófica sobre los cardiomiocitos.

Tiene una acción vasoconstrictora selectiva sobre la arteriola eferente. Ello no implica que no se produzca vasoconstricción aferente, ni que no existan receptores a este nivel, sino que la acción vasoconstrictora de la Ang II se encuentra compensada por factores vasodilatadores como la prostaciclina (PGI₂) y el NO.

La Ang II participa además en el proceso de autorregulación renal, es decir, en el mantenimiento del flujo sanguíneo renal (FSR) y de la tasa de filtración glomerular (TFG) cuando se modifica la presión de perfusión renal. Cuando se produce una reducción de la presión arterial y por lo tanto de la presión de perfusión renal, disminuye la presión hidrostática glomerular y con ella la filtración glomerular. Como consecuencia, la concentración de sodio y cloro que alcanza la mácula densa se reduce; ello conduce a la activación de la secreción de renina y al consiguiente aumento de la generación de Ang II; ésta aumenta la vasoconstricción eferente, que eleva la presión hidrostática glomerular y ayuda a mantener la TFG, a costa de una disminución del FSR.

La Ang II es uno de los factores con mayor efecto antinatriurético, ya que es capaz de disminuir la excreción urinaria de sodio a niveles casi indetectables. Además de los efectos hemodinámicos, con consecuencias para la función excretora renal anteriormente citados, la Ang II aumenta de forma directa la reabsorción de sodio en varias porciones de la nefrona, como el túbulo proximal y el segmento ascendente del asa de Henle.

Asimismo, la Ang II parece ser responsable de algunos mecanismos que desencadenan lesiones glomerulares que se producen durante el envejecimiento, la HTA, la diabetes, etc., y que participan en el desarrollo de la insuficiencia renal. La mayoría de estas acciones dependen de las acciones de la Ang II sobre la arteriola eferente, el túbulo y las células mesangiales⁶⁵.

La Ang II es uno de los principales estímulos para la síntesis y liberación de la aldosterona en la zona glomerular de la corteza suprarrenal. Sin embargo, la participación de la aldosterona en la acción antinatriurética de la Ang II en condiciones normales parece ser secundaria, aunque hay que destacar que la aldosterona contribuye a evitar una pérdida excesiva de sodio en situaciones de una ingesta baja en sal.

La regulación de la síntesis y liberación de la renina es un factor decisivo para la formación de Ang I y por tanto de Ang II, ya que la cantidad de angiotensinógeno disponible, que es sintetizado por el hígado, es prácticamente constante y la reacción renina-angiotensinógeno depende casi exclusivamente de la tasa de secreción de la enzima. Por ello, el control de la secreción de renina a través de diferentes mecanismos, es el principal punto de regulación del SRA.

La estrecha asociación anatómica que se observa entre la mácula densa y las células yuxtglomerulares hizo pensar en la existencia de una relación funcional y no sólo anatómica entre ambos tipos de células. Las células de la mácula densa detectan las variaciones en el flujo y en la concentración de NaCl en el túbulo distal, modificando consecuentemente la liberación de renina por parte de las células yuxtglomerulares. Por tanto, una disminución de la cantidad de NaCl que llega al túbulo distal induce un aumento de la secreción de renina. No se conoce muy bien el mecanismo a través del cual la mácula densa media los cambios en la secreción de renina, aunque se han sugerido como posibles mediadores las prostaglandinas y la adenosina.

Las variaciones en la PA y en la presión de perfusión renal también modifican la secreción de renina, ya que un aumento de las mismas reduce la secreción de esta enzima. Estos cambios son detectados por la mácula densa, y podrían ser mediadores el NO o el calcio.

El SNS desempeña un importante papel regulando la secreción de renina en situaciones que requieren una respuesta inmediata, como el ejercicio, el cambio postural o la pérdida de volumen. Se ha observado que la innervación de las células yuxtaglomerulares es predominantemente simpática y, en general, un incremento de esta actividad determina un aumento de la liberación de renina. El aumento de la secreción de renina producido por la estimulación nerviosa simpática se bloquea con un antagonista de los receptores β -adrenérgicos, como el propranolol, lo que sugiere que estos receptores están implicados en dicha acción.

El principal mecanismo hormonal regulador de la secreción de renina es el efecto inhibitorio de la Ang II sobre ésta. Este mecanismo de retroalimentación negativa supone un autocontrol del sistema, ya que si se produce un aumento de la secreción de renina y consiguientemente de la producción de Ang II, ésta va a ser capaz de autorregular su síntesis actuando sobre la secreción de renina.

La Ang II y el NO presentan acciones opuestas en muchos órganos, de forma que el mantenimiento de un equilibrio entre las acciones de ambos parece tener una especial relevancia para la homeostasis cardiovascular y renal; en concreto, la Ang II y el NO interaccionan modulando la actividad glomerular y tubular. Asimismo, el NO inhibe la secreción de la renina⁶⁶.

Las interrelaciones entre la Ang II y la endotelina 1 (ET-1) son también conocidas⁶⁷. La Ang II aumenta la producción de ET-1 en las células endoteliales vasculares y en las células mesangiales de los glomérulos renales, mediante la estimulación de la enzima convertidora de endotelina.

Asimismo, la Ang II aumenta la secreción del tromboxano A₂ (TXA₂), que podría mediar parte sus efectos biológicos.

El péptido natriurético auricular (PNA) antagoniza casi todos los efectos fisiológicos del SRA⁶⁸. En estudios realizados en células yuxtglomerulares aisladas se ha demostrado que el PNA inhibe la secreción de renina, efecto mediado por un aumento del guanosin 3'5' monofosfato cíclico (cGMP) en dichas células. Asimismo, el PNA se opone a las acciones de la Ang II: reduce el efecto presor de la Ang II y su efecto constrictor de las células mesangiales, antagoniza los efectos de la Ang II sobre la hemodinámica renal y la reabsorción proximal de sodio, e incluso inhibe la liberación de aldosterona inducida por la Ang II.

Aunque se mencionó anteriormente, un aspecto que debe señalarse es que los datos actuales apuntan a destacar cada vez más los sistemas SRA tisulares y sus funciones tanto paracrinas como autocrinas. Ahora se sabe que el endotelio vascular tiene una importante participación en la regulación de la vasoconstricción por vía de la Ang II local además de la vasodilatación conocida por la vía del NO. Muchos de estos factores están interrelacionados en circuitos de autorregulación consiguiendo mantener la PA en unos límites estrechos.

3. Endotelio vascular y disfunción endotelial

El endotelio vascular está situado en una posición anatómica estratégica entre la sangre y la pared vascular que le permite actuar como transmisor y receptor de señales. Las células endoteliales son capaces de registrar cambios hemodinámicos de la sangre, como la presión y las fuerzas de cizallamiento, cambios en sus interacciones con las plaquetas, los leucocitos, modificaciones de los mensajeros químicos circulantes o procedentes de células vecinas por lo que responden a dichos cambios mediante la liberación de numerosos factores vasoactivos. Por esta razón, el concepto de endotelio vascular considerado clásicamente como una

simple barrera de separación entre la sangre y la pared vascular ha cambiado de forma sustancial.

El endotelio vascular es considerado como el principal órgano de regulación vascular con acciones exocrina, paracrina y autocrina, que está implicado en diversos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunitarios⁶⁹. Entre los factores biológicamente activos sintetizados y liberados por las células endoteliales cabe destacar la PGI₂, el NO, el factor hiperpolarizante dependiente del endotelio (EDHF), la ET, la prostaglandina H₂ (PGH₂), el TXA₂, el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el activador tisular del plasminógeno (t-PA), el PAI-1, ERO, interleucinas, quimocinas, moléculas de adhesión vascular e intercelular (VCAM-1, ICAM-1) y otros^{70,71,72}.

Factores derivados del endotelio

- Prostaciclina

La PGI₂ fue el primer factor relajante derivado del endotelio aislado e identificado, se sintetiza por la vía de las ciclooxigenasas (COX1 y COX2). Sus principales acciones son: inhibición de la agregación plaquetaria y relajación de las CMLV, sin embargo, su acción sobre el control de la PA no es tan relevante en condiciones normales. Su mecanismo de acción depende de la activación de la adenilato ciclasa (AC), tiene una semivida muy corta y se inactiva mediante su degradación a 6-ceto-1 α -prostaglandina que se elimina por la orina.

Los principales factores capaces de estimular la síntesis y la liberación de la PGI₂ son la Ang II, la acetilcolina (ACh) o la Bk, así como productos liberados de las plaquetas como la serotonina y el PDGF. La capacidad de sintetizar PGI₂ disminuye con la edad, la arterioesclerosis y la diabetes

mellitus, lo que sugiere una relación entre estos estados patológicos y los niveles de la PGI₂⁷³.

- Óxido nítrico

Furchgott y Zawadzki demostraron en 1980 en aortas de conejo, que la ACh y agentes muscarínicos relacionados con ella relajaban el tejido vascular previamente contraído sólo cuando su endotelio estaba intacto⁷⁴, atribuyendo este fenómeno a la presencia de un factor humoral producido *in situ* al que denominaron “factor relajante derivado del endotelio” o EDRF por sus siglas en inglés. También señalaron que el EDRF es un potente inhibidor de la adhesividad y agregación plaquetaria, y activador de la guanilato ciclasa soluble (sGC) provocando aumento de cGMP en las CMLV o en las plaquetas, con la consecuente inhibición de la contracción vascular. Años después Palmer y col.⁷⁵, comprobaron que este EDRF era NO.

La formación de NO tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina dando como producto NO. La NOS presenta tres isoformas (Tabla 3), la neuronal (nNOS, tipo I) y la endotelial (eNOS, tipo III) se expresan constitutivamente y su actividad está regulada por la concentración intracelular de calcio⁷⁶. La forma inducible (iNOS, tipo II) la expresan los macrófagos cuando son estimulados por citocinas, lipopolisacáridos u otras sustancias inmunológicas y su expresión está regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, por factores de transcripción sensibles al estado redox como el NF-kB o las MAP cinasas⁷⁷. Actualmente se sabe que los genes de estas tres isoformas se localizan en locus y genes diferentes⁷⁸.

Como se puede observar, el NO juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos. Entre otros, actúa como regulador del flujo sanguíneo local, inhibidor de la agregación plaquetaria, se produce por los

macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria y también actúa como neurotransmisor, siendo el cerebro el órgano con mayor actividad NOS⁷⁶.

Tabla 3.- Características de las isoformas conocidas de NOS.

Nombre	Nombre común	Peso molecular	Cromosoma	Función principal del NO producido
NOS I	nNOS	161 kDa	12	Neurotransmisor, plasticidad sináptica y modulación de la respuesta a glutamato
NOS II	iNOS	131 kDa	17	Respuesta inmune a microorganismos, elemento de la respuesta inflamatoria
NOS III	eNOS	133 kDa	7	Regulación del flujo y presión sanguínea e inhibición de la activación de plaquetas

A nivel vascular, el NO es un vasodilatador poderoso que actúa de manera sinérgica con la PGI₂, y además inhibe el crecimiento de las CMLV. En términos generales este proceso de vasodilatación producido por el NO en el músculo liso vascular es debido a una cascada de señales. La formación de cGMP, por parte de la sGC que es estimulada por el NO, conduce a la activación de la proteína cinasa G (PKG), que produce la fosforilación de los residuos de serina y de treonina de una proteína pequeña, Rho A, la

cual es inactiva en su forma fosforilada (Rho A-P) lo que conlleva la inactivación de Rho A cinasa⁷⁶.

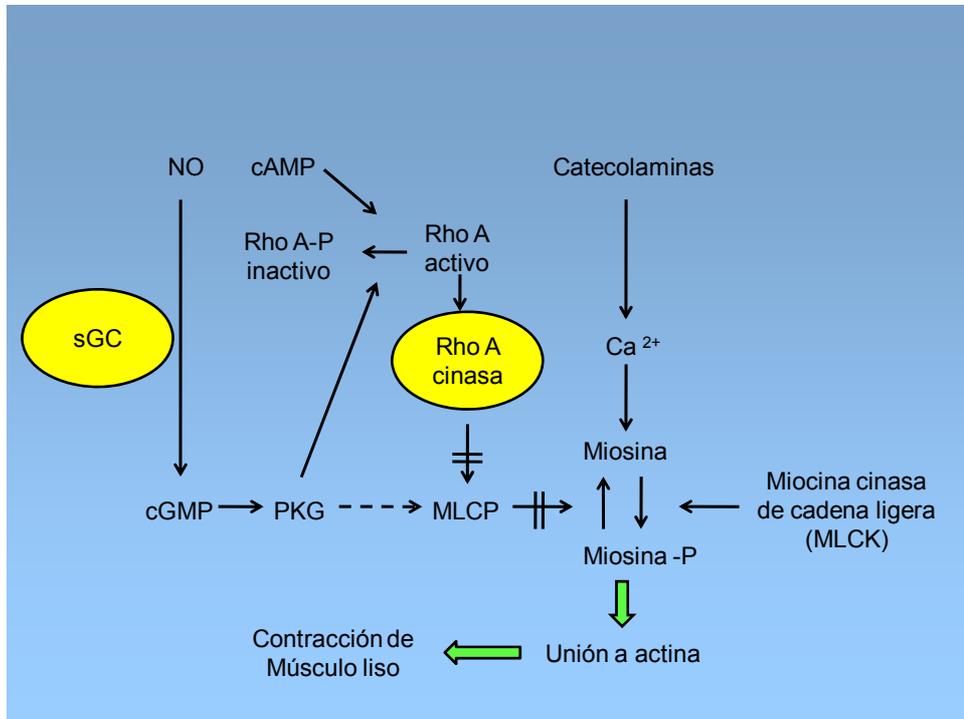


Figura 6.- Rutas de señalización del NO y catecolaminas y su relación con la vasodilatación y vasoconstricción en células de músculo liso vascular.

Además de la función ya descrita, el NO participa en la inhibición de la adhesión de plaquetas, monocitos y neutrófilos. Cuando se activa el sistema de factores de coagulación, se produce trombina que formará fibrina a partir de fibrinógeno, causando vasodilatación e inhibiendo las plaquetas por medio de un mecanismo dependiente del endotelio.

Otro efecto del NO reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales. El NO inactiva la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo, además, puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del ADN, y también puede producir necrosis, entre otras cosas.

El NO posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio. Para entender este doble efecto, se piensa que los efectos reguladores y antiinflamatorios del NO ocurren con concentraciones bajas, en tanto que los efectos adversos se producen con concentraciones altas, como en situaciones de inflamación donde puede reaccionar con el oxígeno o el $\bullet\text{O}_2^-$. Así pues, un exceso de NO es citotóxico, es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas e interferir con la señalización celular por nitración de residuos de tirosina en proteínas. El NO genera ONOO^- al reaccionar con el $\bullet\text{O}_2^-$ de acuerdo a:



El ONOO^- está en equilibrio con su ácido conjugado (ONOOH). En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de oxidar grupos tioles o tioéteres, capaz de nitrar residuos de tirosina, de nitrar y oxidar guanosina, de degradar carbohidratos, de iniciar peroxidación lipídica y de fragmentar el ADN⁷⁹.

Como sabemos, la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ y NO es diferente tanto en su fuente como en las condiciones en que se lleva a cabo. Sin embargo, la producción de ONOO^- ocurre siempre cuando se rompe el equilibrio por la formación excesiva de uno o de otro. Algunos autores establecen que tanto las reacciones de oxidación como de nitración mediadas por el ONOO^- están influenciadas en gran medida por el flujo de producción relativo de $\bullet\text{O}_2^-$ y NO ⁸⁰. Dichos autores establecen que las tasas más altas de oxidación se producen con exceso de NO, produciéndose la oxidación a través del

•OH y del •NO₂ formados a partir del ONOO⁻. Sin embargo, la reacción del ONOO⁻ con el CO₂ es la vía más importante por la que se descompone el ONOO⁻, formando al final N₂O₃, que es un potente agente nitrante⁸¹.

Además de las reacciones de oxidación, el ONOO⁻ tiene la capacidad para nitrar compuestos fenólicos en condiciones fisiológicas, como los anillos de tirosina. Los residuos de tirosina son oxidados por los radicales derivados del ONOO⁻ formando el radical tirosilo, que a su vez reacciona con el •NO para formar 3-nitrotirosina^{82,83}.

- Factor hiperpolarizante dependiente del endotelio

Además de los factores mencionados anteriormente, el endotelio libera otro factor que produce relajación en el músculo liso vascular al inducir hiperpolarización de las membranas celulares en las CMLV, que se conoce como el EDHF. En la actualidad no se conoce bien su naturaleza, aunque se sabe que se libera *in vitro* por la acción de concentraciones elevadas de ACh y Bk por lo que es de suponer que actúa como un mediador en la acción vasorrelajante de estos agentes. Mientras que la relajación dependiente de NO es sostenida, la hiperpolarización es transitoria. La hiperpolarización y la relajación inducidas por el EDHF parecen ser debidas a un incremento en la conductancia del K⁺ a través de canales activados por calcio y ATP dependientes en el músculo liso vascular, ya que la ouabaína, un inhibidor de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa, inhibe su acción^{84,85,86}. Se ha sugerido la posibilidad de que este factor sea un metabolito lábil de la ruta del ácido araquidónico en la cual parece estar implicada la vía del citocromo P450, aunque también se ha sugerido la posibilidad de otra vía relacionada con la superóxido dismutasa (SOD) como se mencionará más adelante. Respecto a su papel fisiológico o fisiopatológico, parece ser un mediador muy importante en la relajación dependiente del endotelio en las arterias mesentéricas de resistencia.

- Endotelina

La ET es una proteína de 21 aminoácidos de la que se han encontrado tres tipos diferentes, ET-1, ET-2 y ET-3, que sólo se diferencian en algún aminoácido en su secuencia. Los tres tipos tienen actividad biológica y sólo cambian sus características farmacológicas. La ET-2 es la de mayor potencia vasoconstrictora en tanto que la ET-3 es la de menor. Las células endoteliales sintetizan ET-1 a partir de la pre-proendotelina, que por medio de una endopeptidasa da lugar a un péptido de 38 a 39 aminoácidos que se denomina “gran endotelina”. La acción de la endopeptidasa llamada enzima convertidora de endotelina da finalmente lugar a la ET-1. Esta conversión es necesaria para que se induzca su actividad biológica, ésta se produce por estímulo mecánico, químico y humoral como sucede con otros mediadores. El estímulo más importante para la producción de ET *in vitro* es el ionóforo de calcio A23187, lo que demuestra que un aumento del calcio intracelular en las células endoteliales es crucial para la producción de ET. La hipoxia es otro estímulo importante para la producción de ET en tejido vascular aislado así como en individuos sanos expuestos a presiones menores de oxígeno como sucede en las grandes altitudes. La PGI₂ y el NO reducen la liberación de la ET en tanto que la Ang II, la adrenalina, los ésteres de forbol y la interleucina-1 (IL-1) estimulan su producción.

La ET actúa mediante receptores específicos, de los que se han descrito dos tipos, los ET_A y los ET_B. Los ET_A se encuentran en las CMLV y median la contracción inducida por ET-1 y la proliferación de éstas. Los receptores ET_B se encuentran también en dichas células, pero principalmente en las células endoteliales y median la liberación de PGI₂ y NO inducida por ET-1 y ET-3, produciendo por tanto relajación vascular, que podría modular su acción vasoconstrictora⁸⁷.

Además de su acción vasoconstrictora y secretora a corto plazo, la ET-1 induce a largo plazo acciones mitogénicas en diversos tipos de células como las células endoteliales, las CMLV, fibroblastos, células gliales y

células mesangiales. Esta acción sugiere un posible papel de este péptido en procesos de crecimiento cardiovascular y renal, como el remodelado vascular, la hipertrofia ventricular y las alteraciones glomerulares proliferativas. Esta estimulación de crecimiento celular se produce mediante el incremento de la expresión de varios protooncogenes que se han implicado en la regulación de la transcripción del ADN, incluyendo *c-myc*, *c-fos* y *c-jun*. Aunque la ET-1 es por sí misma débilmente mitogénica, ésta puede estimular la proliferación de músculo liso de forma indirecta facilitando la producción local de otro potente mitógeno como la Ang II; además se ha descrito que la ET-1 potencia la actividad mitogénica de otros factores de crecimiento⁸⁸.

- Citocinas

Son moléculas peptídicas que actúan aisladamente o en combinación para promover la síntesis de proteínas y el crecimiento celular, de manera autocrina y paracrina. Estas moléculas se acoplan a receptores específicos de la membrana celular y activan sistemas de señales intracelulares, que inducirán la síntesis proteica regulada por protooncogenes. La síntesis de estos precursores está regulada, como se mencionó, por factores de transcripción, siendo uno de los más importantes el NF- κ B⁸⁹.

Dentro de las citocinas se distinguen las interleucinas, que se nombran por las siglas IL, seguidas de un número (IL-1, IL-6, etc), y otras moléculas vinculadas a su efecto preponderante, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Las citocinas pertenecen a una familia de péptidos dentro de los cuales se encuentran factores de crecimiento, prolactina, eritropoyetina, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) y citocinas proinflamatorias. Estos péptidos tienen la capacidad de activar sistemas de transducción de señales que regulan síntesis de proteínas y expresión de genes, así como apoptosis⁹⁰.

Las IL son citocinas que estimulan las actividades vinculadas con el crecimiento de los leucocitos y otros tipos de células. Incrementan la proliferación y diferenciación celular, síntesis de ADN, secreción de otras moléculas biológicamente activas y respuestas a estímulos inmunológicos y/o inflamatorios.

Como se ha observado a través de esta sección, el endotelio vascular posee funciones tan diversas como ser barrera selectiva, actuar en la regulación de la homeostasis y la trombosis, la regulación de las interacciones de los leucocitos con la pared vascular, la regulación del tono vasomotor y el crecimiento de la mayoría de los grupos celulares relacionados con el sistema cardiovascular. Sin embargo, en condiciones particulares el endotelio vascular puede modificar su fenotipo facilitando la vasoconstricción, inflamación y eventos relacionados con la trombogénesis. Estas respuestas anormales se manifiestan en condiciones tales como hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes mellitus, sin que en las primeras etapas de tales condiciones se produzca un cambio morfológico⁹¹. Por otro lado, no hay que perder de vista las evidencias que existen de que estos cambios son precursores de aterosclerosis y predictores de futuros eventos vasculares⁹².

Disfunción endotelial

La etiología de la **disfunción endotelial** es multifactorial, y los mecanismos subyacentes son complejos y no han sido completamente dilucidados. Entre esos factores destacan los cambios en la señalización de receptores por cambios en la membrana, alteraciones en la expresión y actividad de la eNOS, disminución de la disponibilidad de tetrahidrobiopterina (BH₄) e incremento de la producción de •O₂⁻⁹³. Sin embargo, el mecanismo más comúnmente propuesto como el causante de la disfunción endotelial es la producción excesiva de ERO. Éstas disminuyen la biodisponibilidad de NO y exacerbaban el estrés oxidativo local, reaccionando directamente con el NO para formar ONOO⁻ el cual, a

su vez, produce daño al endotelio⁹⁴. Si la hipótesis de un desequilibrio entre la formación de ERO y la capacidad del endotelio para destruir esas ERO es la causa de la disfunción endotelial, las moléculas denominadas antioxidantes que sean capaces de eliminar esas ERO, deberían revertir o prevenir dicha disfunción. Esto es, que cualquier intervención con antioxidantes podría proteger el endotelio por medio de la eliminación de esas ERO y restablecer la biodisponibilidad de NO.

En términos generales, la disfunción endotelial se define como la menor capacidad del endotelio vascular para producir vasodilatación. Si bien el tono vascular está determinado por el balance entre los agentes vasoconstrictores y vasodilatadores, la disfunción endotelial es debida en forma primaria a una reducción en la biodisponibilidad de NO. El NO, como se mencionó en los párrafos anteriores, es el principal responsable de la vasodilatación arterial además de regular la agregación de plaquetas. La biodisponibilidad de NO se modifica por diversos mecanismos entre los que destacan la baja actividad de la eNOS o la degradación misma del NO por un incremento en el estrés oxidativo, aspecto que se detalla más adelante.

Por otro lado, aunque la eNOS es una enzima constitutiva, diferentes factores patológicos pueden regular su expresión. Uno de los más importantes es el incremento de estrés oxidativo, el cual a su vez es definido como la ruptura en el balance de la producción de agentes antioxidantes y pro-oxidantes.

Especies reactivas de oxígeno

Como se ha visto, las ERO y su función en el sistema vascular son de suma importancia para lograr un equilibrio en los mecanismos de comunicación celular, de este modo el término estrés oxidativo tiene una acepción muy amplia, sin embargo en la literatura se usa comúnmente para referirse a condiciones en las que las células están expuestas a niveles excesivos de

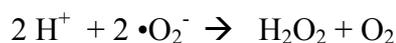
ERO. En este sentido, es importante discriminar las ERO más importantes no solamente por el posible daño que pueden causar, sino también desde un punto de vista de las vías de señalización que son relevantes en los procesos celulares.

En las décadas pasadas la investigación de las ERO en el sistema cardiovascular ha sido objeto de mucho interés. Éstas constituyen un conjunto de moléculas que, además de las propiedades fisicoquímicas particulares, tienen una gama amplia de funciones a nivel celular. Debido a su importancia a continuación se hará una descripción breve de aquellas ERO que son relevantes en los cambios patológicos asociados a la hipertensión y posteriormente los mecanismos de comunicación que se han encontrado.

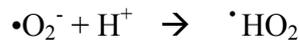
- Anión superóxido

El $\bullet\text{O}_2^-$ procede de la reducción univalente del oxígeno molecular. A diferencia de otros radicales libres, caracterizados por su gran reactividad, el $\bullet\text{O}_2^-$ sólo es capaz de reaccionar eficazmente con un grupo reducido de moléculas. Puede iniciar y propagar la oxidación por radicales libres de catecolaminas, BH_4 y otros compuestos relacionados, de ahí su importancia en el desacoplamiento de la eNOS. No ataca de manera significativa a los ácidos grasos insaturados o al ADN. Sin embargo es muy importante en fisiopatología porque se genera en gran cantidad y fácilmente sufre una conversión hacia otras especies derivadas del oxígeno que son muy reactivas y dañinas, tales como el $\bullet\text{OH}$ ⁹⁵.

El $\bullet\text{O}_2^-$ se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno a través de una dismutación:



Por otro lado, el $\bullet\text{O}_2^-$ puede captar un electrón y dar lugar al radical hidropéroxido ($\dot{\text{H}}\text{O}_2$), mucho más reactivo que el $\bullet\text{O}_2^-$. No obstante, a pH fisiológico menos del 1% del $\bullet\text{O}_2^-$ estará en forma de hidropéroxido:



La enzima más importante en cuanto a la cantidad de $\bullet\text{O}_2^-$ que produce es la NAD(P)H oxidasa, sin embargo, la NOS, en cualquiera de sus tres isoformas, también lo puede producir en condiciones de deficiencia, ya sea de L-arginina o su cofactor la BH_4 . Además, existen otros sistemas enzimáticos capaces de generar ERO en los vasos, tales como la xantina oxidasa (XO), citocromo P450, las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial y la mieloperoxidasa derivada de fagocitos³². Más adelante se hará una descripción completa de la formación de $\bullet\text{O}_2^-$ por parte de la NAD(P)H oxidasa.

- Peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 no es un radical libre como tal, pues no posee electrones desapareados en su capa de valencia. Es la forma menos reactiva de las ERO. Su importancia recae en el hecho de que participa en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de radicales libres y sobre todo a que está involucrado en mecanismos de señalización celular.

La fuente más importante de H_2O_2 es la dismutación de $\bullet\text{O}_2^-$ por las diferentes isoformas de SOD. Sin embargo, existen otros sistemas enzimáticos capaces de producir H_2O_2 como es el caso de la NAD(P)H oxidasa que contiene la sub-unidad NOX_4 ⁹⁶. En los últimos tiempos se han incrementado las evidencias de que el H_2O_2 tiene un papel muy importante en la biología vascular. Las propiedades fisicoquímicas de esta molécula le proporcionan características interesantes desde muchos puntos de vista como su mayor estabilidad en comparación con el $\bullet\text{O}_2^-$, así como su permeabilidad en las membranas celulares vía la utilización de

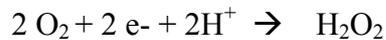
aquaporinas⁹⁷. El efecto de esta ERO en los vasos sanguíneos a corto y largo plazo se está estudiando de manera intensiva. Se sabe que el H₂O₂ produce relajación en muchos vasos sanguíneos, pero puede producir vasoconstricción dependiendo de la sección de los vasos donde se ubique y de su concentración^{98,99}. La vasorelajación mediada por el H₂O₂ puede realizarse indirectamente por vía dependiente e independiente del endotelio^{100,101}. El H₂O₂ puede mediar respuestas vasculares a diversos estímulos como agonistas endotelio dependientes, estímulos modulados por el flujo sanguíneo y al ácido araquidónico^{102,103}. Esta ERO también puede facilitar la formación de otros vasodilatadores de los comúnmente conocidos como EDHF además de modificar la permeabilidad del endotelio^{104,105,106}.

Si se analizan los efectos a más largo plazo, el H₂O₂ tiene la capacidad potencial de alterar la expresión de algunos genes que son fundamentales en la biología cardiovascular. El H₂O₂ activa factores de transcripción incluyendo NF-kB, estimula la expresión de eNOS e iNOS y componentes de la NAD(P)H oxidasa^{107,108,109}. Por otro lado, existen evidencias sustanciales de que el H₂O₂ funciona como un mediador del crecimiento vascular contribuyendo de esta manera a la hipertrofia vascular producida en la hipertensión y a la progresión de la aterosclerosis^{110,114}.

Estudios recientes sugieren otro mecanismo mediante el cual el H₂O₂ puede alterar negativamente la función endotelial. Thengchaisri y col.¹¹¹, mencionan que la aplicación de H₂O₂ exógeno, incrementa tanto la expresión de arginasa I como la disminución selectiva de la respuesta endotelio dependiente mediada por el NO en arteriolas coronarias. Las arginasas metabolizan la L-arginina a urea y L-ornitina, por lo que un incremento en la actividad de esta vía reduce la disponibilidad de L-arginina necesaria para la producción de NO¹¹².

El H₂O₂ se puede originar a partir de diversas fuentes:

- Por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones.



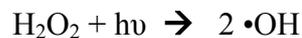
- Por dismutación del $\cdot\text{O}_2^-$, como se indicó anteriormente.
- Como producto de algunas enzimas como glucosa oxidasa, uricasa, etc.
- Por reacciones químicas de autooxidación.

La detoxificación del H₂O₂ se lleva a cabo por acción de la catalasa (CAT) y de la glutatión peroxidasa (GPx), con la consecuente formación de agua.

- Radical hidroxilo

Se obtiene cuando el oxígeno molecular es reducido por tres electrones. Es la especie derivada de oxígeno más reactiva. Su vida media estimada es muy corta, apenas de alrededor de 10^{-9} s, de modo que reacciona muy cerca de su lugar de formación con la mayoría de las biomoléculas¹¹³. Este radical se genera por:

1. La ruptura del agua o del H₂O₂ por acción de las radiaciones ionizantes.



De este modo, puede formarse *in vivo* a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar rotura del agua corporal de acuerdo a la primera reacción. Si bien la luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el H₂O₂ en 2 moléculas de $\cdot\text{OH}$ como en la segunda reacción.

2. Debido a la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición. El proceso más importante en la formación del $\bullet\text{OH}$ es la llamada reacción de Fenton en la que intervienen compuestos metálicos.



3. Es posible que se genere también a partir de H_2O_2 y de $\bullet\text{O}_2^-$ por la reacción de Haber-Weiss.



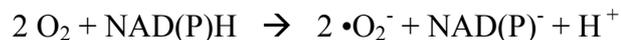
Producción de ERO en el sistema vascular y fuentes enzimáticas de ERO en los tejidos vasculares

Las ERO se forman como intermediarios en los procesos celulares de óxido-reducción que llevan a la producción de H_2O a partir de O_2 . La reducción univalente de oxígeno en presencia de un electrón libre forma $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 y $\bullet\text{HO}$. El $\bullet\text{O}_2^-$ tiene un electrón desapareado de ahí su alta reactividad y vida media corta. Es soluble en agua, sin embargo puede utilizar los canales aniónicos para traspasar las membranas celulares, actúa como agente oxidante cuando se reduce a H_2O_2 , o como agente reductor cuando él se oxida formando ONOO^- a partir de NO . En condiciones fisiológicas, soluciones acuosas y pH neutro, se favorece la dismutación de $\bullet\text{O}_2^-$ a H_2O_2 . Sin embargo, la formación excesiva de $\bullet\text{O}_2^-$ nos lleva a la formación de ONOO^- con el consecuente déficit de NO en las concentraciones fisiológicamente adecuadas tan importantes para el mantenimiento de la relajación vascular.

El H_2O_2 se produce de manera espontánea a partir de la dismutación del $\bullet\text{O}_2^-$ o puede formarse de manera catalizada por la enzima SOD. Esta reacción se favorece en concentraciones bajas de $\bullet\text{O}_2^-$ y altas de SOD.

En los tejidos vasculares, todas estas ERO se forman en diferentes concentraciones dependiendo de las condiciones que la misma homeostasis requiere y al mismo tiempo son reguladas por la SOD, CAT, tiorreductasa y el conjunto de vitaminas antioxidantes. En condiciones normales la velocidad de formación de ERO está en equilibrio con su velocidad de eliminación, sin embargo, un fallo en este equilibrio llevará a un incremento en la biodisponibilidad de las ERO y así, a un estado de estrés oxidativo.

Las ERO se producen en el endotelio, capa adventicia, y en el músculo liso. Derivan principalmente de la NAD(P)H oxidasa que es una enzima de múltiples subunidades que cataliza la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ mediante la reducción de O_2 con un electrón usando el NAD(P)H como donador de éste:



La NAD(P)H oxidasa vascular muestra cierta similitud, pero también notables diferencias con la NAD(P)H oxidasa de los fagocitos. Las enzimas vasculares tienen una velocidad y una actividad diferente a la de los fagocitos, ya que en éstos la actividad es intermitente y violenta, propia del sistema inmunológico mientras que en las células vasculares la velocidad es menor pero con una actividad más sostenida.

De hecho, la NAD(P)H oxidasa en el sistema vascular es estructuralmente diversa, ya que la estructura de las sub-unidades que la componen varía de acuerdo a su ubicación, ya sea en las células del músculo liso o células endoteliales como se verá a continuación.

- Estructura y función de la NAD(P)H oxidasa

La NAD(P)H oxidasa que está mejor caracterizada y que es prototipo de estudios, como se mencionó anteriormente, es la NAD(P)H oxidasa de

fagocitos, de ahí el nombre de las subunidades que la forman. La NAD(P)H oxidasa de fagocitos, tiene al menos cinco componentes: p47phox, p67phox, p40phox, p22phox y gp91phox. Como algunos componentes adicionales se incluyen algunas proteínas G de tamaño medio a pequeño Rac2 (Rac1 en algunas células) y Rap1A.

En células sin estimular p40phox, p47phox y p67phox existen como unidades citosólicas, mientras que gp91phox y p22phox se encuentran en las membranas como una flavoproteína dimérica, citocromo b558. Cuando se fosforila se estimula el componente p47phox, las unidades citosólicas forman un complejo que migra hacia la membrana donde se asocia con el citocromo b558 para formar la enzima activa y de este modo poder transferir el electrón del NAD(P)H al sustrato que es el oxígeno molecular para formar el $\bullet\text{O}_2^{-114}$ (Figura 7). La fosforilación de p47phox y p67phox es esencial para la activación de la enzima, en contraste con p40phox que es un regulador negativo.

La NAD(P)H oxidasa de los fagocitos, se activa sólo con una estimulación y reacciona de manera intermitente y violenta, con producción de $\bullet\text{O}_2^-$ extracelular, mientras que en el sistema vascular la enzima es constitutivamente activa, preensamblada y produce $\bullet\text{O}_2^-$ con efecto en el interior de las mismas células, esta producción es lenta y sostenida, sirviendo como moléculas de señalización intracelular (Tabla 4).

Todas las subunidades de esta enzima caracterizadas en los fagocitos se expresan en los vasos. Las subunidades p47phox, p67phox, p22phox y gp91phox se expresan en las células del endotelio y de la capa adventicia, sin embargo, en las células del músculo liso, sólo se expresan consistentemente p22phox y p47phox. Por ejemplo, en las células del músculo liso de aorta de rata se expresan p22phox y p47phox pero no gp91phox. Mientras que en las mismas células de músculo liso, pero de aortas humanas, se expresan todas las subunidades mayores incluyendo gp91phox. Estudios recientes han demostrado la existencia de homólogos

de gp91phox (Nox1, Nox4 y Nox5) en el sistema vascular. En el músculo liso de aortas de rata, la expresión del ARNm de Nox1 parece apoyar el hecho de que ésta es un sustituto de gp91phox¹¹⁵.

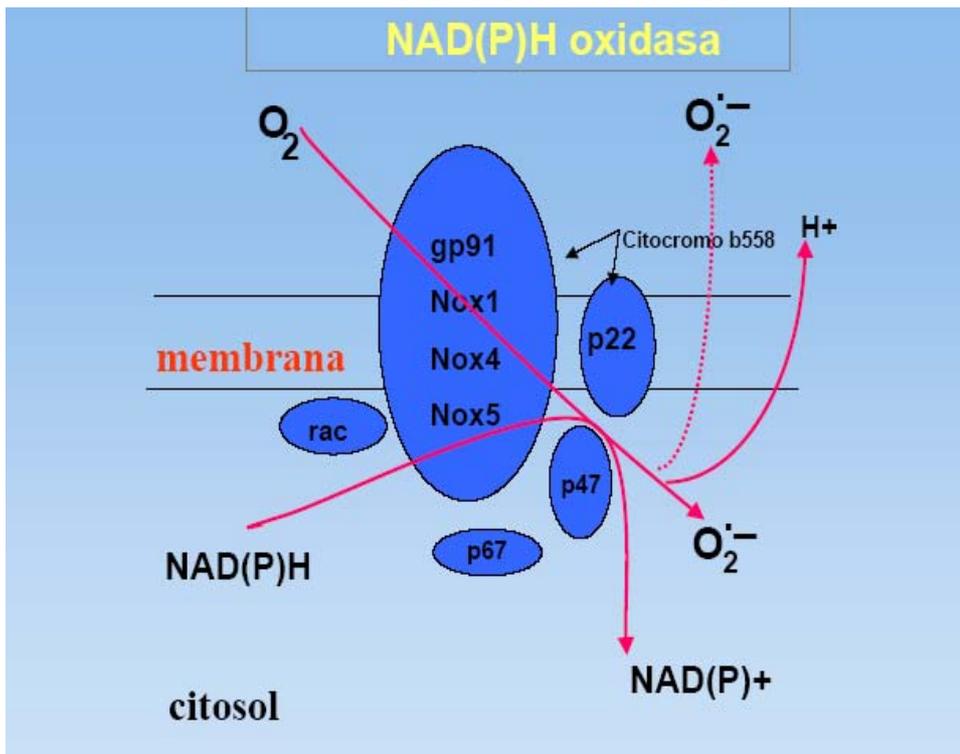


Figura 7.- Representación de la estructura y función de la NAD(P)H oxidasa.

Tabla 4.- Características de NAD(P)H oxidasa en fagocitos y en células vasculares.

Característica	Neutrófilos	Vascular
Actividad en estado basal	Inactiva	Activa
Inducida por:	Citocinas y patógenos	Agentes vasoactivos, factores de crecimiento, citocinas
Nox2 homólogos	Nox2	Nox1/Nox2/Nox4/Nox5
Cinética de liberación $\bullet\text{O}_2^-$	Intermitente y violenta	Lenta y sostenida
Concentración de $\bullet\text{O}_2^-$	Alta	Baja
Sitio de generación $\bullet\text{O}_2^-$	Extracelular	Intracelular
Sustrato	NAD(P)H	NADH/NAD(P)H
Proteína G	Rac 2	Rac 1

La NAD(P)H oxidasa vascular estaría regulada por varios factores humorales, incluyendo citocinas, factores de crecimiento, agentes vasoactivos y factores como la tensión de cizalladura y la velocidad de deformación.

De particular importancia con respecto a la hipertensión es la Ang II, que estimula la activación de la NAD(P)H oxidasa, aumenta la expresión de las subunidades de la enzima e induce la formación de ERO en las CMLV, células endoteliales y fibroblastos en la capa adventicia. Los mecanismos de comunicación Ang II/AT₁ y NAD(P)H oxidasa no han sido totalmente dilucidados, sin embargo se sabe que, por ejemplo, la PKC, fosfolipasa A (PLA) y Rac, están asociados en la señalización de AT₁ a NAD(P)H oxidasa. Del mismo modo que el PDGF y el TGF- β , el TNF- α y la

trombina, activan la NAD(P)H oxidasa de las CMLV, la ET-1 lo hace en las células endoteliales¹¹⁶.

En el sentido contrario, las estatinas y los antihipertensivos como los β bloqueantes, los bloqueantes de canales de calcio, inhibidores de la ECA y los bloqueantes de los receptores AT₁, regulan negativamente la expresión de las diferentes subunidades y la actividad de la enzima.

- Otras fuentes enzimáticas de ERO en el sistema vascular

La NOS que es la enzima responsable de la producción de NO también puede generar $\bullet\text{O}_2^-$ en deficiencia de concentraciones de sustrato, es decir, bajas concentraciones de L-arginina, y/o de su cofactor BH₄. Esto nos lleva al concepto de eNOS desacoplada, que a su vez produce una concentración deficiente de NO, y a la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ asociada a la misma enzima. La eNOS desacoplada está altamente correlacionada con la aterosclerosis, diabetes, hiperhomocisteinemia e hipertensión^{117,118,119,120}.

En la hipertensión, la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ por parte de la NAD(P)H oxidasa, aumenta la biodisponibilidad de ERO con la consecuente oxidación de BH₄ a BH₃, el desacoplamiento de la eNOS y una producción de ERO añadida a la que ya existe. Llama la atención que la transferencia del gen de la GTP ciclohidrolasa, enzima responsable de la regeneración de BH₄, restablece la actividad enzimática arterial, el incremento de los niveles de BH₄, reduce la producción de ERO y mejora la relajación dependiente del endotelio en ratas hipertensas.

En definitiva, en los últimos años se han descrito una serie de asociaciones entre diferentes patologías como la hipertensión y la hipercolesterolemia con una mayor producción de ERO, en particular de $\bullet\text{O}_2^-$, por parte de la NAD(P)H oxidasa¹²¹.

Moléculas diana y efectos vasculares de las ERO

A pesar de que las ERO han sido identificadas como transductores de señales en muchas vías celulares, las moléculas diana no han sido perfectamente definidas. Las ERO exógenas activan las MAPquinas que son importantes en el crecimiento celular, inflamación, apoptosis y diferenciación celular. Sin embargo, las moléculas diana de las ERO mejor identificadas son las tirosín-fosfatasa y sus factores de transcripción. La oxidación de un residuo de cisteína por H_2O_2 produce el estado inactivado de la tirosín-fosfatasa. De este modo las ERO inhiben la actividad de estas enzimas, se produce un incremento en la fosforilación de tirosina que conlleva la activación del receptor de la proteína tirosín-cinasa inducido por estrés oxidativo.

Además de estos procesos asociados al crecimiento celular y a la inflamación las ERO modulan la concentración intracelular de Ca^{++} libre, que es un elemento importante en la contracción-relajación vascular.

Se puede considerar que los efectos vasculares de las ERO se dividen en dos grandes áreas: el crecimiento e inflamación vascular y los efectos en la contracción-dilatación. Las ERO estimulan los factores de crecimiento y multiplicación celulares tales como la fosforilación de las MAPquinas, la tirosin-cinasa activadora de la síntesis de ADN e incrementan la expresión de protooncogenes¹²². Las ERO también regulan la estructura vascular en la hipertensión, mediante el incremento en la formación de matrices proteicas extracelulares de fibronectina y colágeno. El $\bullet O_2^-$ y el H_2O_2 promueven la degradación de la elastina. Este proceso, sensible a los cambios redox, es inflamatorio e incluye la expresión de otras moléculas como la IL-6, VCAM-1, ICAM-1 y la peroxidación de lípidos. Aspectos, que sumados, contribuyen al remodelado vascular en la hipertensión¹²³.

Producción de ERO en el desarrollo de hipertensión arterial

Las ERO tienen un papel primordial en la fisiopatología de la HTA. Esto se ha puesto en evidencia debido a que las diversas maneras de medir el estrés oxidativo han demostrado que éste se encuentra aumentado en la HTA y a que el tratamiento con diferentes agentes antioxidantes o con inhibidores de la NAD(P)H oxidasa reducen el estrés oxidativo, la PA e inclusive pueden prevenir el incremento de la misma en modelos animales de hipertensión.

En ratas genéticamente hipertensas (SHR) o ratas genéticamente hipertensas “Stroke Prone” (SHR-SP) se manifiesta un incremento en la generación de $\bullet\text{O}_2^-$ mediado por la NAD(P)H oxidasa en arterias de resistencia, vasos de conductancia y en riñón^{124,125}. Estos procesos están asociados a un aumento en la expresión de algunas sub-unidades de la NAD(P)H oxidasa, particularmente p22phox y p47phox, así como un incremento en la actividad propia de la enzima. De la misma manera, los marcadores de daño en el ADN generado por el estrés oxidativo como la 8'-hidroxi-2'-desoxiguanosina y la carbonilación de proteínas, marcador del estado de oxidación de proteínas, están incrementados en la aorta, corazón y riñón de ratas SHR y SHR-SP en comparación con los animales normotensos Wistar Kyoto. También se ha observado un aumento en la expresión de p47 phox en el lecho vascular renal y mácula densa de ratas SHR jóvenes, sugiriendo una regulación al alza de la NAD(P)H oxidasa a nivel renal que precede al desarrollo de la HTA¹²⁶. La importancia de p47phox ha sido demostrada mediante ratones que no codifican para esta proteína ($p47^{phox-/-}$) en los cuales el desarrollo de hipertensión producida por la infusión de Ang II falla¹²⁷. Además, la disminución de la biodisponibilidad de NO como consecuencia del aumento en la generación de $\bullet\text{O}_2^-$ vascular puede también contribuir al estrés oxidativo en modelos SHR y SHR-SP. Tratamientos con vitaminas antioxidantes, inhibidores de la NAD(P)H oxidasa, BH_4 y bloqueantes del receptor AT_1 disminuyen la

producción vascular de $\bullet\text{O}_2^-$ y atenúan en diferentes grados el desarrollo de la HTA en esos modelos animales. Tratamientos muy prolongados o de por vida en modelos SHR pueden inclusive prevenir el desarrollo de la HTA¹²⁸.

En modelos experimentales donde se provoca la HTA: infusión de Ang II, inducción por sal en ratas sensibles Dahl, HTA inducida por mineralocorticoides, etc, también se ha observado que el incremento de la presión arterial, se asocia a una mayor actividad de la NAD(P)H oxidasa, XO y a un desacoplamiento de la eNOS como ya se ha mencionado. La inhibición de la producción de ERO con alopurinol o apocinina y la eliminación de radicales libres con antioxidantes disminuyen la presión arterial y previenen el desarrollo de la HTA en esos mismos modelos¹²⁹. Esas mejoras, van acompañadas con cambios positivos en la disfunción endotelial, con regresión en la hipertrofia vascular, así como con una menor inflamación vascular¹³⁰. Es importante mencionar que la inducción de HTA por norepinefrina no se asocia a un aumento en el estrés oxidativo vascular y que la SOD no previene el aumento en la PA, lo que sugiere que la PA, por sí misma, no es la causa primaria del estrés oxidativo en la HTA¹³¹.

Estudios clínicos indican que los pacientes con HTA esencial producen una cantidad excesiva de ERO y tienen disminuida su capacidad antioxidante¹³². En la mayoría de los estudios, los pacientes hipertensos son sensibles a la sal y presentan algún grado de disfunción renal¹³³. De la misma manera, se ha demostrado que existe estrés oxidativo en otras patologías como la hipertensión maligna y la pre-eclampsia^{134,135}.

La disminución de la actividad antioxidante y niveles reducidos de antioxidantes y “scavengers” de ERO, como vitamina E, glutatión, SOD y una actividad mayor de la NAD(P)H oxidasa, contribuyen al estrés oxidativo en pacientes con HTA. La puesta en marcha del sistema renina-angiotensina se ha propuesto como el mediador más importante en la activación de la NAD(P)H oxidasa y la producción de ERO en hipertensos¹³⁶. De hecho, algunos de los efectos de la disminución de la PA de los bloqueantes del receptor AT₁ y de los inhibidores de la enzima convertidora de Ang II, se atribuyen a una menor actividad de la NAD(P)H oxidasa y por lo tanto una menor producción de ERO¹³⁷.

Basados en las evidencias experimentales y clínicas, se sabe que el estrés oxidativo tiene un papel importante en el daño vascular por lo que ha habido gran interés en el desarrollo de estrategias que tienen como objetivo las ERO para el tratamiento de la HTA y otras enfermedades cardiovasculares. Algunas aproximaciones terapéuticas han considerado incluir mecanismos para incrementar la disponibilidad de antioxidantes por medio de la dieta o por medio de suplementación, con el fin de reducir la cantidad de ERO¹³⁸.

En la tabla 5 se resumen las formas clínicas y experimentales de hipertensión y su relación con el estrés oxidativo.

Tabla 5.- Diferentes formas experimentales y clínicas de HTA y su relación con el estrés oxidativo. Adaptada de Touyz y Schiffrin 2004³³.

Tipo de hipertensión	Biodisponibilidad de ERO
HTA Humana:	
- Moderada	Sin cambio
- Severa	Incrementa
- Sensible a la sal	Incrementa
- Maligna	Incrementa
- Renovascular	Incrementa
- Pre-eclampsia	Incrementa
Formas genéticas de HTA:	
- SHR	Incrementa
- SHR-SP	Incrementa
HTA inducida experimentalmente	
- Infusión de Ang II	Incrementa
- Infusión de Norepinefrina	Sin cambio
- Dahl sensible a sal	Incrementa
- Asociada a obesidad	Incrementa
HTA postmenopausia	Incrementa
HTA mineralocorticoide	Incrementa

Relación entre disfunción endotelial y antioxidantes

Todas las células aeróbicas están sujetas a la presencia de ERO, que tienen un papel muy importante desde el punto de vista fisiológico, específicamente en la señalización. Sin embargo, cuando se pierde el balance sugerido en la figura 8 aparece el estrés oxidativo y con él la cascada de reacciones no deseadas como aquellas que se asocian a las vías metabólicas del NO¹³⁹.

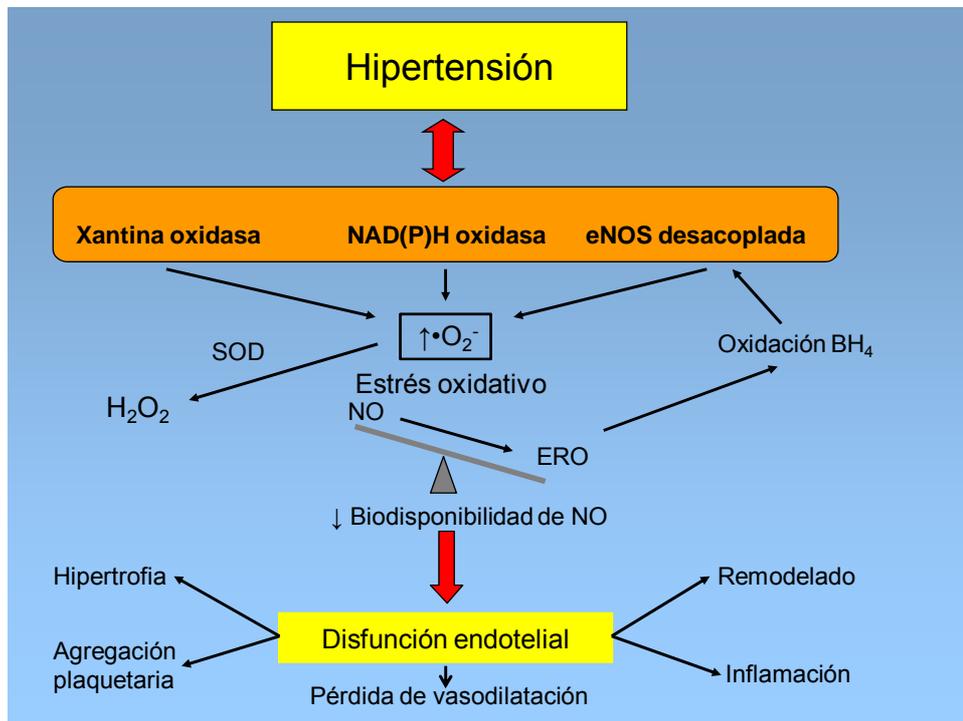


Figura 8.- Relación entre disfunción endotelial, estrés oxidativo y fuentes enzimáticas de especies reactivas de oxígeno. Adaptado de Cai⁹⁸.

Así, el organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres¹⁴⁰.

Los antioxidantes pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de ERO.
- Interceptando el ataque de ERO.
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ERO.
- Facilitando la reparación del daño causado por ERO.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

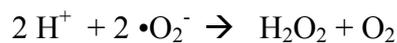
Desde el punto de vista de la fisiología celular, los antioxidantes se clasifican en: antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los **antioxidantes primarios** previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Actúan eliminando los radicales libres o especies que sirven como sustrato o coadyuvantes para generarlos convirtiéndolos en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación. Dentro de este grupo se incluye a la SOD, la GPx, la CAT y las proteínas ligadoras de metales como la ferritina. Los **antioxidantes secundarios** son protectores no enzimáticos que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se comportan como tal el glutatión, la vitamina E, la vitamina C, el ácido úrico, la bilirrubina, la albúmina y toda la gama de carotenoides y xantofilas. En última instancia, los **antioxidantes terciarios** ejercen su defensa mediante la reparación de biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando proteínas oxidadas, evitando de este modo su acumulación. También podemos destacar las enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

Debido a su importancia en los mecanismos asociados a la HTA a continuación se describen las principales características de las tres enzimas consideradas como antioxidantes primarios.

Superóxido dismutasa

Existen tres isoformas de SOD, que proceden de diferentes genes, pero catalizan la misma reacción:



Las tres isoformas de SOD son: la citosólica o cobre-zinc SOD (Cu-ZnSOD o SOD-1), la manganeso SOD (MnSOD o SOD-2) situada en las mitocondrias y una forma extracelular de Cu-ZnSOD (EC-SOD o SOD-3). Sólo en los últimos tiempos se ha puesto énfasis en la importancia de estas tres isoformas de SOD en los vasos sanguíneos, su expresión y actividad presumiblemente tiene un importante efecto en la respuesta de las células vasculares al estrés oxidativo agudo y crónico. La compartimentalización de varias ERO tiene una relación directa sobre la actividad y características de las SOD¹⁴¹.

Como se mencionó la SOD dismuta el $\cdot\text{O}_2^-$ en H_2O_2 y O_2 . Existen varias consecuencias funcionales de esta actividad. Primero la SOD protege contra la citotoxicidad mediada por $\cdot\text{O}_2^-$ que implica la inactivación de proteínas mitocondriales que contienen hierro y azufre como la fumarasa y la aconitasa. Esta protección es de vital importancia, ya que el daño a esos complejos proteínicos produce hierro libre con la subsecuente formación de $\cdot\text{OH}$.

Además, el NO reacciona con el $\cdot\text{O}_2^-$ a una velocidad tres veces mayor que la dismutación del $\cdot\text{O}_2^-$ por la SOD^{79,142}. Debido a la alta eficiencia de la primera reacción, la concentración local de SOD es una clave fundamental en la biodisponibilidad del NO. Por ello, otra función importante de la

SOD es proteger el NO, aumentar su biodisponibilidad y, en consecuencia, las vías de señalización donde éste está involucrado como la vasorrelajación. Por otro lado, se sabe que la reacción del NO con el $\bullet\text{O}_2^-$ produce ONOO⁻ un oxidante muy potente que puede producir citotoxicidad¹³³. Cada vez se acumulan más evidencias de que el ONOO⁻ puede tener diversos efectos negativos:

- Nitración selectiva de los residuos de tirosina en proteínas como prostaciclina sintasa y MnSOD¹⁴³.
- Activación de poli ADP-ribosa polimerasa y la expresión de la iNOS ambos mediadores importantes en la disfunción vascular en estados patológicos^{144,145}.
- Oxidación de BH₄¹⁴⁶.
- Oxidación del complejo zinc-tiolato en la eNOS.

Estos dos últimos efectos, producen el desacoplamiento de la eNOS con la subsecuente formación de más $\bullet\text{O}_2^-$ ¹⁴⁷.

Una tercera consecuencia funcional de la actividad de la SOD es la formación de H₂O₂. Como se ha mencionado, el H₂O₂ es relativamente estable y puede difundir incluso a través de las membranas celulares, por lo que se considera otra molécula de señalización como el NO. Por ejemplo, el H₂O₂ participa en la expresión de los genes relacionados con el crecimiento de músculo liso vascular y por ende en la hipertrofia vascular¹⁴⁸. También puede activar factores de transcripción específicos y participar como EDHF en algunos tipos de vasos^{100,149,150,151}.

- Cu-ZnSOD

Se sabe que esta isoforma de SOD es la que se expresa en mayor cantidad en todas las células, incluidos los vasos sanguíneos. Este patrón se ha observado en modelos animales como ratones y en seres humanos. Sin embargo, la importancia funcional de esta isoforma no ha sido sencilla de

evaluar, ya que sus inhibidores no son específicos¹⁵². Mediante ratones modificados genéticamente, se ha observado que la deficiencia en Cu-Zn SOD conlleva un incremento en los niveles de $\bullet\text{O}_2^-$ y de ONOO^- , incremento en el tono biogénico, respuesta vasoconstrictora aumentada y deficiencia en la respuesta relajante endotelio dependiente mediada por el NO tanto en arterias como en microvasos^{153,154,155}. Las alteraciones en la expresión de esta isoforma pueden modificar la estructura vascular produciendo, por ejemplo, hipertrofia en arteriolas cerebrales. Estos hechos son las primeras evidencias directas de que la Cu-ZnSOD está involucrada en la inhibición de la hipertrofia vascular y en el concepto, cada vez más importante, del papel de las ERO en el mismo proceso¹⁵⁶. Diversos estudios con modelos animales donde se ha sobre-expresado la Cu-ZnSOD han servido para dilucidar la importancia de ésta en la homeostasis y en los mecanismos de señalización^{157,158,159}. De hecho, en la medida que se compruebe el papel del H_2O_2 como EDHF, se estaría pensando en la Cu-Zn SOD como una verdadera EDHF-sintasa¹⁶¹.

- MnSOD

En condiciones normales, la cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones mitocondrial es la fuente más importante de producción de $\bullet\text{O}_2^-$ convirtiendo aproximadamente el 5% del O_2 en $\bullet\text{O}_2^-$ ¹⁶⁰. Debido a su localización subcelular, la MnSOD es considerada como la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo. Esta afirmación ha sido respaldada por el hecho de que ratones deficientes en MnSOD mueren en apenas unas semanas después de su nacimiento o presentan una serie de fenotipos anormales: daño neurodegenerativo, anormalidades cardíacas y daño mitocondrial extensivo. En términos generales los niveles de MnSOD en los vasos sanguíneos son bajos comparados con Cu-ZnSOD y EC-SOD. Sin embargo, a nivel del endotelio se expresan niveles altos de MnSOD¹⁶¹. Además se ha comprobado que existe una expresión diferencial de la MnSOD en los vasos sanguíneos dependiendo de la región

anatomofisiológica de que se trate^{162,163}. Tanto la actividad como la expresión de MnSOD pueden modificarse por condiciones fisiológicas severas o condiciones patológicas. La MnSOD se regula al alza por estrés oxidativo, el gen que codifica para este enzima, contiene factores de iniciación que son sensibles a factores de transcripción que, a su vez, son dependientes del estado redox como la AP-1 y el NF- κ B¹⁵². La sobre-expresión de la MnSOD mediante la transferencia de genes ha producido efectos beneficiosos en varios modelos de patologías vasculares reduciendo la concentración de \bullet O₂ y mejorando la función endotelial en hipercolesterolemia, diabetes e hipertensión^{164,165}.

- EC-SOD

La EC-SOD es la única forma de SOD que se expresa a nivel extracelular, se une a los tejidos mediante un dominio de heparina que le da afinidad por el sulfato de heparina de los péptidoglicanos presentes en la superficie celular, en las membranas basales y en la matriz extracelular. La EC-SOD se localiza en toda la pared de los vasos, particularmente entre el endotelio y las células de músculo liso^{166,167}. La fuente más importante de EC-SOD está en las células musculares, pues al parecer el endotelio no la produce¹⁶⁸.

Excepto para algunos tejidos como en el cerebro, la EC-SOD representa la mayor proporción de actividad SOD. La actividad de la EC-SOD en los vasos puede alterarse en respuesta a varios estímulos como el ejercicio, factores de crecimiento, citocinas, Ang II, NO y estados patológicos como hipertensión, diabetes y aterosclerosis^{169,170}. Con base a su localización extracelular, se han hecho hipótesis de que al menos uno de los principales papeles de la EC-SOD es proteger al NO en su difusión del endotelio a las CMLV¹⁷¹. Con el fin de dilucidar el papel de la EC-SOD en los vasos sanguíneos, se han realizado diversos experimentos en modelos animales modificados genéticamente. En aorta de ratones deficientes en EC-SOD se ha encontrado incremento en \bullet O₂, deficiencia en la actividad basal del NO

y pérdida de la relajación endotelio dependiente^{172,173,174}. Por otro lado, estudios con estrategias de sobre-expresión de EC-SOD han revelado efectos protectores reduciendo los niveles de PA en ratas SHR¹⁷⁵.

Como se mencionó con anterioridad, se ha sugerido que la EC-SOD es determinante en la biodisponibilidad del NO en los vasos¹⁶⁸. Su función es proteger el NO durante todo el trayecto desde su lugar de producción en el endotelio hasta el músculo liso. Desde este punto de vista es notable que la deficiencia de EC-SOD y de Cu-ZnSOD sobre la función endotelial es muy parecida y la expresión normal de estas dos isoformas será esencial en la homeostasis.

Catalasa

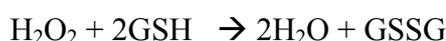
La CAT es una enzima que se encuentra normalmente en los peroxisomas de las células de los mamíferos. Es una enzima que tiene una estructura tetramérica que contiene cuatro subunidades idénticas de 60 KDa dispuestas de manera tetraédrica. Cada una de estas subunidades tiene un centro activo con un grupo hemo y NAD(P)H. Se puede considerar en general que este grupo de enzimas tiene dos actividades que dependen de la concentración de H₂O₂. Por un lado, si la concentración de H₂O₂ es alta, esta enzima cataliza su conversión a O₂ y H₂O. Sin embargo, a bajas concentraciones de H₂O₂ y en presencia de un donador asequible de hidrógeno, como etanol, metanol, fenoles u otro, la CAT actúa produciendo peroxidación, eliminando el H₂O₂ pero oxidando su sustrato.

Es un hecho que el estrés oxidativo participa en diversas enfermedades vasculares en los seres humanos, por lo que también se ha utilizado en modelos animales para discernir su papel en las patologías mencionadas. Sin embargo, dada la complejidad de las interacciones de las ERO en los vasos sanguíneos y debido a su compartimentalización, ha sido difícil definir completamente el papel de cada ERO. Actualmente existe gran

interés en el papel del H₂O₂ en la biología vascular tanto como molécula de señalización como por su relación con diversas patologías.

Glutathion peroxidasa

La GPx es en realidad un conjunto de isozimas ampliamente distribuidas en los tejidos de los vertebrados, que promueven la degradación de H₂O₂ mediante el uso de glutatión reducido (GSH) a H₂O y glutatión oxidado (GSSG) de acuerdo a:



Como se mencionó, se distribuye ampliamente en los tejidos y puede tener actividad sobre otros peróxidos diferentes al H₂O₂ lo que la hace relevante para la homeostasis en los vasos. Cataliza la reducción GSH dependiente de cualquier lipoperóxido (LOOH) a su correspondiente alcohol (LOH).



Esta conversión representa un mecanismo de defensa antioxidante muy importante. Las enzimas de este grupo son tetraméricas y requieren de selenio para su actividad. Este selenio participa en la reacción catalítica y es la base de la importancia que se le da al consumo de selenio como micronutriente. Investigaciones sobre la estructura y el mecanismo catalítico de la GPx han revelado que un residuo selenocisteína presente en el sitio activo es fundamental para su actividad. En el ciclo catalítico, el selenol en el residuo selenocisteína reducido es oxidado por el hidroperóxido para producir ácido selénico, el cual es posteriormente convertido a selenio sulfuro por ataque nucleofílico de GSH. Posteriormente el selenio sulfuro reacciona con un segundo equivalente de GSH para regenerar el estado reducido¹⁷⁶. La mayoría de las GPx actúan sobre el H₂O₂ e hidroperóxidos de ácidos grasos y de colesterol, pero no sobre lípidos esterificados como los presentes en las lipoproteínas, sin

embargo, otras isoformas pueden actuar sobre estos últimos. Como se ha observado, el GSH tiene un papel fundamental en la actividad de esta enzima, pero también está involucrado en otras vías antioxidantes incluyendo la eliminación directa de oxidantes, el metabolismo del ascorbato, el mantenimiento de los grupos SH de las proteínas y la detoxificación de xenobióticos mediante las enzimas glutathione S-transferasas. En los últimos años, se han incrementado los esfuerzos para evaluar el papel de diferentes antioxidantes en la hipertensión, en la disfunción endotelial asociada, en la hipertrofia cardíaca y el remodelado vascular^{125,177,178,179,180}.

Objetivos

Cada vez existen más evidencias de que la hipertensión está asociada con el estrés oxidativo, que es un evento precoz en el desarrollo de la disfunción endotelial y la subsecuente enfermedad cardiovascular. La etiología de la disfunción endotelial es multifactorial, en la que destacan los cambios en la señalización de receptores, alteraciones en la expresión y actividad de la eNOS, disminución de la disponibilidad de BH₄ e incremento de la producción de •O₂⁻. El mecanismo más comúnmente propuesto como causante de la disfunción endotelial es la producción excesiva de ERO. Si la hipótesis de un desequilibrio entre la formación de ERO y la capacidad del endotelio para destruirlas, es la causa de la disfunción endotelial, entonces las moléculas que sean capaces de “limpiar” esas ERO deberían revertir o prevenir dicha disfunción. Previsiblemente la intervención con antioxidantes podría ejercer este efecto, proteger el endotelio y restablecer la biodisponibilidad de NO. Teniendo en cuenta la relación existente entre la HTA y el balance redox nos planteamos el presente estudio con astaxantina, un carotenoide de origen natural con elevado poder antioxidante, para lo cual nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto antihipertensivo que tiene la administración de astaxantina, un antioxidante de naturaleza oxicarotenoide, en diferentes modelos animales de hipertensión.
2. Estudiar el efecto de astaxantina sobre las alteraciones funcionales y estructurales provocadas por la hipertensión en los órganos diana.
3. Evaluar el efecto de la astaxantina sobre la producción de especies reactivas de oxígeno y su relación con los cambios funcionales y estructurales.

Métodos y Resultados

DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el fin de determinar el efecto antihipertensivo de la astaxantina, se utilizaron dos modelos de hipertensión genética (modelos 1 y 3) y un modelo de hipertensión inducida (modelo 2):

Modelo 1. Ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Este es un modelo de hipertensión desarrollado en 1963, a partir de ratas Wistar-Kyoto, por medio de la selección y cruce de machos de hipertensión moderada y hembras con hipertensión establecida y se considera un modelo de hipertensión donde se ha seleccionado el fenotipo. Los animales tienen la PA elevada y presentan fenotipo de daño en órganos similares a los observados en la hipertensión esencial en humanos incluyendo hipertrofia del ventrículo izquierdo, ataque al corazón y fallo renal¹⁸¹.

Modelo 2. Ratones Swiss Albino-CD1 con hipertensión inducida. Ratones macho Swiss Albino pertenecientes a la cepa CD1 (Swiss Albino-CD1).

La hipertensión se desarrolló mediante la infusión, durante 14 días, de 1000 ng/kg/min de Ang II, utilizando minibombas osmóticas (Alzet mini-osmotic pump, model 1002, EE.UU.) que se insertaron en la zona dorsal de los animales.

Modelo 3. Ratones modificados genéticamente para las proteínas Vav3. Estas proteínas son factores de intercambio GDP-GTP que estimulan las GTPasas *Rho* y *Rac*, que a su vez son esenciales en la regulación de la homeostasis del sistema cardiovascular. Los ratones que no expresan Vav3 (*Vav3*^{-/-}) constituyen un nuevo modelo en la investigación cardiovascular, ya que muestran taquicardia, hipertensión arterial sistémica y un remodelado cardiovascular extensivo. Estas disfunciones están asociadas, entre otras cosas, a una hiperactividad de neuronas simpáticas desde el nacimiento. Los altos niveles de

catecolaminas relacionados con esta condición conllevan la activación del SRA, el incremento en los niveles de hormonas relacionadas con el riñón y la pérdida progresiva de la homeostasis cardiovascular y renal¹⁸².

En los tres modelos, la astaxantina se incorporó a una dieta estándar preparada por nosotros, de acuerdo a las recomendaciones para estudios de nutrición del Instituto Americano de Nutrición¹⁸³ (Tabla 6).

La astaxantina utilizada (Lucatin Pink astaxantina 10% en polvo) fue suministrada por BASF.

Los experimentos se han realizado teniendo en cuenta las disposiciones legales existentes referidas a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos:

- a) Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se modifica la Directiva 86/609/CEE (Diario oficial de la Unión Europea).
- b) Real Decreto 1201/2005. BOE 21 de octubre de 2005.

Los animales se mantienen en el estabulario del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (USAL) (Registro N° P.A.E.-SA001), alojados en jaulas a una temperatura constante de 22 °C, con una humedad ambiental del 60% y con un tiempo de luz regulado con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se distribuyen en un máximo de tres por jaula con acceso libre a comida y bebida.

Tabla 6.- Composición del pienso elaborado para el estudio de acuerdo al Instituto Americano de Nutrición.

Ingrediente	Pienso control (g/kg pienso)
Caseína ¹	225
Almidón ²	358,5
Sacarosa ⁶	248
Celulosa ¹	31
D/L metionina ¹	1
Minerales ⁴	14
Vitaminas ⁵	11
Aceite de maíz ⁷	110
Colato de sodio ³	2,5
Astaxantina*	-

¹Sigma Aldrich, ²Panreac, ³Fluka, ⁴MP Biomedicals, ⁵ICN Biomedicals, ⁶Azucarera Ebro, ⁷USUA. * La astaxantina se adicionó en los grupos tratados en csp.

MODELO 1. RATAS SHR

Utilizamos ratas SHR machos pertenecientes a la cepa SHR/Kyo@Rj, procedentes de los laboratorios Janvier en Francia.

Los animales se adquirieron con una edad de 10 semanas, y tras dos semanas de aclimatación en el Servicio de Experimentación Animal de la USAL, cuando los animales llegaron a las 12 semanas de edad, se inició el tratamiento que tuvo una duración de 8 semanas.

Previamente se pesaron y se midió la presión arterial sistólica (PAS) para distribuir aleatoriamente a los animales en los siguientes grupos:

SHR-Control: ratas SHR

SHR-Axt 200: ratas SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina

SHR-Axt 75: ratas SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina

El pienso y el agua consumidos se midieron cada tres días. Semanalmente se pesaron los animales con el objeto de ajustar la dosis de astaxantina a la cantidad correspondiente de acuerdo a los cambios en el peso corporal. Periódicamente se midieron la PAS y la FC.

1. Presión arterial sistólica, frecuencia cardíaca y peso

Metodología

La PAS se midió en la arteria caudal, mediante un método incruento, con un equipo NIPREM 546 (Cibertec S.A., España). El fundamento de la medida consiste en comprimir el tejido alrededor de la arteria de la cola mediante una banda neumática, hasta la oclusión completa de la arteria, un detector de radiación infrarroja colocado en la cola transforma la señal térmica en eléctrica que se registra por medio de un ordenador. Según se observa en la figura 9, la desaparición de la señal **(a)** permite afirmar que se ha producido la oclusión de la arteria. La disminución controlada de la presión en la banda neumática 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 FC, en pulsaciones por minuto (ppm), a partir de este registro **(d)**.

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, para lo cual es importante comentar que, en todos los casos, la presión se midió al menos una semana antes del inicio de los tratamientos con el fin de que los animales reconocieran el manejo a que son sometidos y siempre en un lugar con temperatura, ruido y limpieza adecuados para su bienestar¹⁸⁴.

Las determinaciones se realizaron en animales despiertos situándolos en un cepo que deja la cola en libertad. Para captar mejor la señal se procedió primero a la dilatación de la arteria caudal, colocando los animales en un entorno con una temperatura entre 36-38 °C durante un periodo aproximado de 10 minutos. A continuación se coloca el transductor y la banda neumática 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 y con señales claras de FC y pulso.

En todos los casos se determinó el valor de la PAS, así como la FC antes de comenzar el tratamiento y a las 1, 2, 3, 4, 6 y 8 semanas después del inicio del estudio.

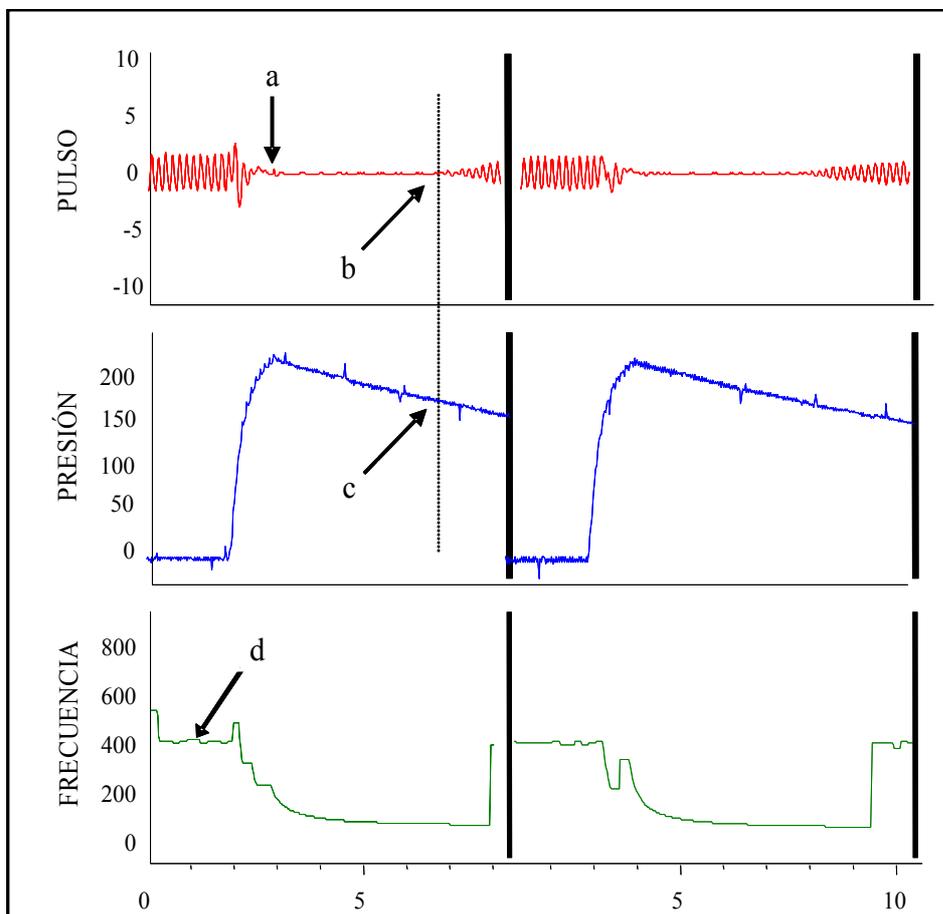


Figura 9.- Ejemplo de registro de presión arterial sistólica (mmHg) y frecuencia cardiaca (ppm).

Resultados

Todos los resultados se expresan como media aritmética \pm el error estándar de la media (EEM) de un mínimo de 10 experimentos, el análisis estadístico se realizó de acuerdo al apartado 2 del anexo 2. Los valores de PAS al inicio y final del estudio se muestran en la tabla 7, donde se pueden observar también los valores de la FC y del peso corporal. Como se puede ver, al inicio del experimento no existió diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los parámetros entre los grupos SHR-Control, SHR-Axt 75 y SHR-Axt 200.

Como se observa, al final del estudio el tratamiento con astaxantina disminuyó de manera significativa la PAS mientras que en los valores de FC y peso corporal no existió diferencia significativa. Por otro lado, al comparar los dos tratamientos de astaxantina entre sí, se destacan algunos aspectos: en ambos casos disminuyó la PAS y conforme avanzó el experimento se observó un efecto dosis respuesta, quedando por abajo la PAS del grupo SHR-Axt 200 con una diferencia significativa con el grupo SHR-Axt 75 al final del experimento. La disminución en la PAS producida por la astaxantina fue de 18 ± 3 y 8 ± 2 mmHg en las dos dosis usadas con respecto a sus propios valores iniciales y mayor con respecto al grupo SHR-Control si se tiene en cuenta que la PAS de éste subió a lo largo del estudio (Figura 10). Se puede observar que a partir de la primera semana de experimentación se hizo evidente la diferencia en la PAS entre el grupo control y los dos grupos tratados con astaxantina, de hecho a partir de ese momento se presentó una diferencia significativa que se mantuvo hasta el final del experimento.

En lo concerniente a los valores de frecuencia cardiaca, no existió diferencia entre los tres grupos de estudio.

En cuanto a los valores de peso corporal no hubo diferencia significativa al inicio del experimento aunque los animales del grupo experimental SHR-

Axt 75 tienen un peso un poco mayor pues corresponden a un lote de animales diferente aunque de la misma edad (Tabla 7). Las diferencias que se observaron en los valores posteriores, sólo se asocian al mismo hecho.

Este hecho es importante, ya que revela que el tratamiento con astaxantina no influyó de manera negativa en el crecimiento y el desarrollo normal de los animales. En este sentido cabe además comentar que este comportamiento, ofrece validez a los parámetros de hipertrofia cardíaca ya que los valores que se obtuvieron en este índice no fueron alterados o sesgados por diferencias en la velocidad de crecimiento de los grupos experimentales.

Tabla 7.- Valores de presión arterial sistólica (PAS), frecuencia cardiaca (FC) y peso en ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). ** $p < 0,01$ frente al grupo SHR-Control * $p < 0,05$ frente al grupo SHR-Axt 75.

Parámetro		Inicio del estudio	Fin del estudio
PAS (mmHg)	SHR-Control	167 ± 3	176 ± 1
	SHR-Axt 200	169 ± 2	150 ± 1** *
	SHR-Axt 75	163 ± 2	156 ± 1**
FC (ppm)	SHR-Control	382 ± 3	394 ± 5
	SHR-Axt 200	383 ± 3	386 ± 5
	SHR-Axt 75	378 ± 5	383 ± 6
Peso corporal (g)	SHR-Control	255 ± 7	312 ± 5
	SHR-Axt 200	264 ± 7	319 ± 5
	SHR-Axt 75	279 ± 5	334 ± 3

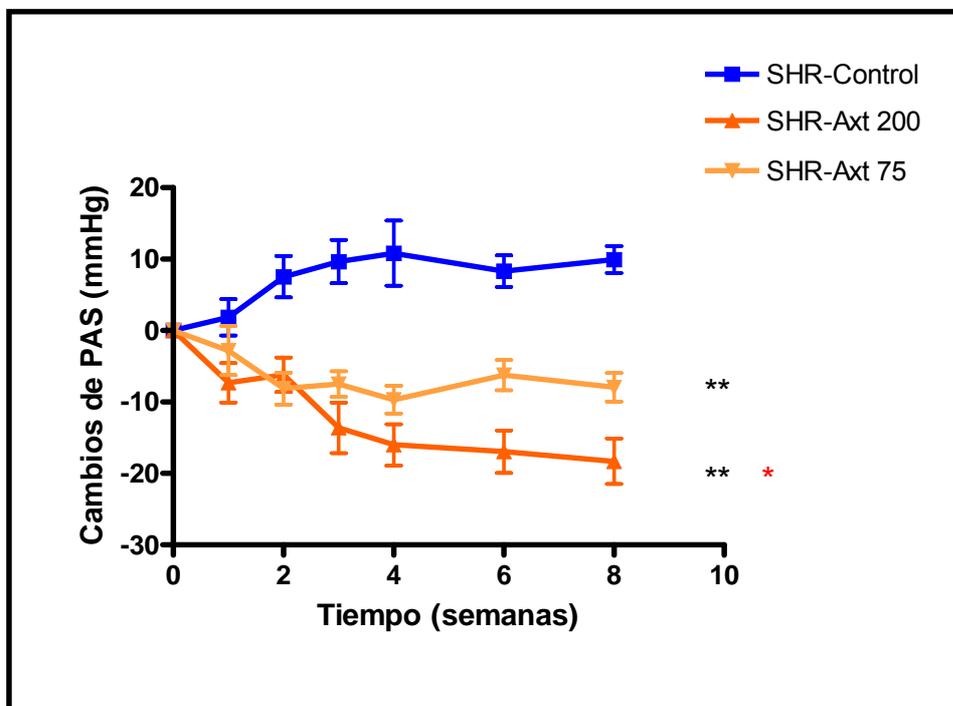


Figura 10.- Cambios de la presión arterial sistólica (PAS) en ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). ** $p < 0,01$ frente al grupo SHR-Control y * $p < 0,05$ frente al grupo SHR-Axt 75.

2. Estudios *in vitro*

Finalizados los tratamientos, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p). A continuación se canuló la arteria carótida con un catéter ($\varnothing = 0,96$ mm), por la que se perfundieron los tejidos con solución Krebs. Mediante una incisión en la arteria femoral se permitió el drenaje de la sangre y el líquido de perfusión, posteriormente se realizó una laparotomía y se procedió a la extracción de aorta y riñón para estudios de funcionalidad, histológicos y relacionados con el estrés oxidativo, y corazón para determinar la hipertrofia cardiaca. Parte de las muestras se congelaron a -80 °C para otras determinaciones.

2.1. Estudios de funcionalidad: arteria aorta

Metodología

Se utilizaron baños para órgano aislado, como el que se presenta en la figura 11, que 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 mantenida a una temperatura constante de 37 °C, mediante una bomba termostática (TECTRON 4373200 Selecta, España), que actúa al mismo tiempo como bomba, elemento calefactor y termostato. La parte inferior del baño tiene un orificio a través del cual se hace llegar de manera controlada la cantidad deseada de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂, Air Liquide, España). El interior del baño contiene una cantidad conocida de líquido nutritivo que asegura la inmersión completa del tejido. Este líquido se elimina por una salida situada en la parte inferior de la copa, inmediatamente se rellena con solución nutritiva nueva a 37° C, de forma que los cambios de temperatura sean mínimos.

Transductores de fuerza isométricos (modelo UF-1 Harvard Apparatus Inc., EE.UU.), conectados a un sistema computarizado PowerLab/800 para Windows (AD Instruments, Reino Unido), constituyen el sistema de detección, registro y cuantificación.

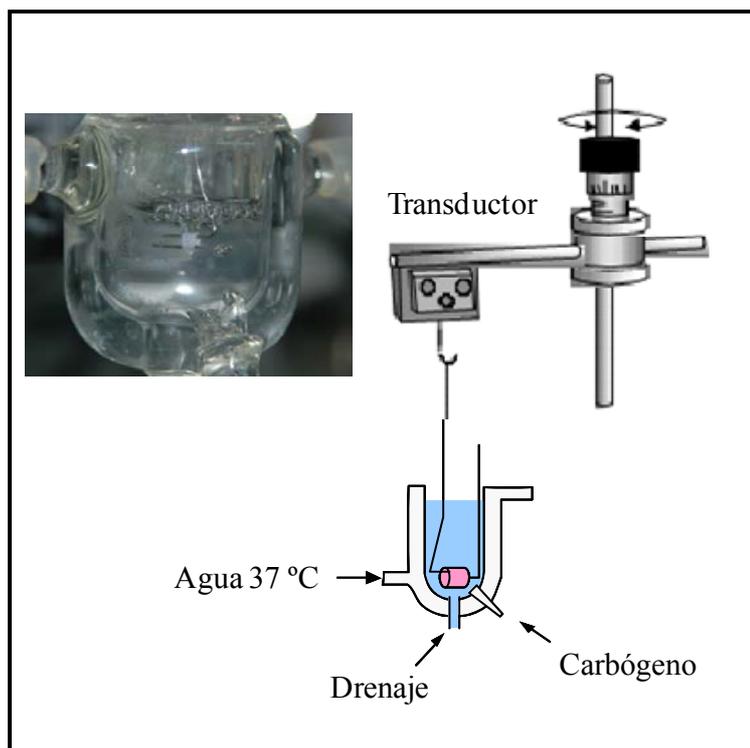


Figura 11.- Baño de órganos y transductor isométrico para los estudios de funcionalidad en anillos de arteria aorta.

Después de extraer la arteria aorta se procede a la eliminación del tejido conectivo y grasa que la rodea, posteriormente se corta en anillos de 3 mm mediante un conjunto de cuchillas acopladas y dispuestas en paralelo e igualmente espaciadas. 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. Los anillos se colocan en los baños de órganos, ajustando la tensión basal a 2 g. La preparación se deja estabilizar durante 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, 1×10^{-6} M), una vez alcanzada una meseta de contracción se añade ACh (1×10^{-6} M) cuya respuesta relajante nos indica el estado funcional del endotelio. A continuación se lavan repetidamente los anillos, se deja estabilizar durante 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 dejan 30 minutos más de estabilización. A partir de este momento se procede a la realización, en anillos diferentes, de los siguientes protocolos:

- Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes

Previa contracción de los anillos con una concentración de FE 1×10^{-6} M y una vez alcanzada una meseta de contracción estable, como se ha mencionado previamente, se realizaron curvas acumulativas concentración-respuesta de los siguientes agentes relajantes: ACh (1×10^{-8} - 3×10^{-4} M), cuya acción relajante es endotelio dependiente y nitroprusiato sódico (NTP, 1×10^{-9} - 3×10^{-5} M), cuya acción relajante es endotelio independiente (Figura 12).

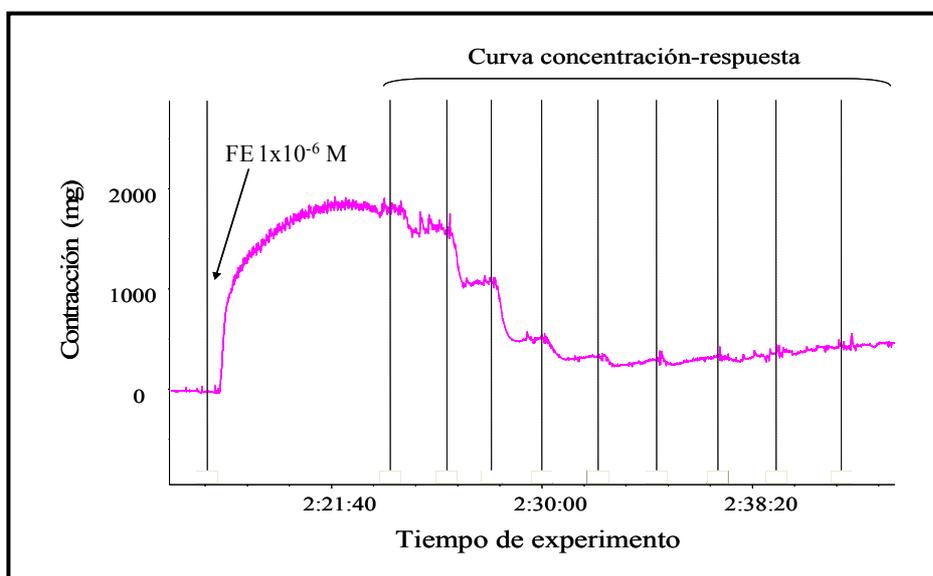


Figura 12.- Registro típico de una curva de relajación en aorta de rata.

Las curvas a ACh se repiten después de la incubación durante 30 minutos con indometacina (5×10^{-6} M), para estudiar la participación de mediadores producidos por la COX en la respuesta relajante o con nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 1×10^{-4} M), un inhibidor de la eNOS. La relación entre la respuesta contracturante obtenida con FE antes y después de la incubación con L-NAME nos indica la biodisponibilidad de NO. Los detalles de las sustancias utilizadas se pueden encontrar en el anexo 1.

Resultados

El efecto provocado por ACh y NTP se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE. Los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 10 experimentos. El análisis estadístico de los resultados se realizó como se describe en los apartados 2 y 3 del anexo 2.

- Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes: acetilcolina

Como se puede ver en las curvas concentración-respuesta, la relajación endotelio dependiente en anillos de aorta no mejoró con la administración de astaxantina. Nótese en la figura 13, que las curvas del grupo control y de los dos grupos tratados se superponen casi por completo.

No existen diferencias significativas en los valores del efecto máximo (E_{max}) y de pD_2 (logaritmo cambiado de signo de la concentración del agonista que provoca el 50% del efecto máximo) entre los tres grupos (Tabla 8).

La incubación con indometacina acentuó la relajación tanto en el grupo tratado con 200 mg/kg/día de astaxantina como con 75 mg/kg/día. Tanto en el grupo control como en el grupo SHR-Axt 200 la inhibición de la COX determinó un incremento en la respuesta relajante a ACh del orden de un 32% y una reducción significativa del valor de pD_2 (Figura 14, Tabla 8).

Este mismo comportamiento se obtuvo al comparar las curvas concentración-respuesta a ACh del grupo SHR-Control y SHR-Axt 75 en ausencia y en presencia de indometacina. En este caso el incremento en la relajación fue de aproximadamente el 40% y también una reducción significativa en el valor de pD_2 (Figura 15, Tabla 8). Tampoco se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo tratado.

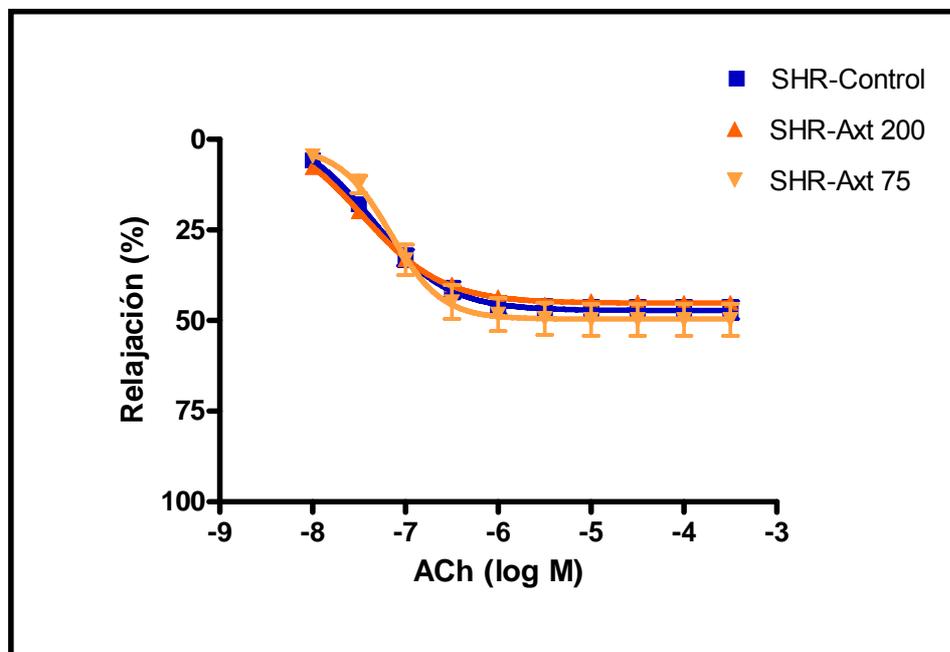


Figura 13.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-4} M) en aortas, precontraídas con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75).

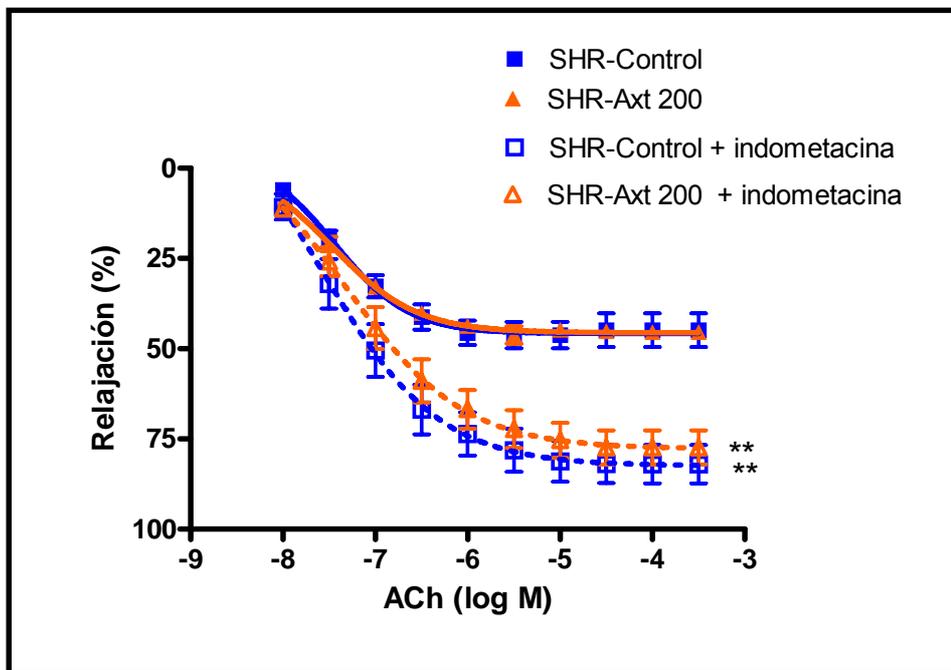


Figura 14.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-4} M) en aortas, precontraídas con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control) y SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) e incubadas con indometacina (5×10^{-6} M) cuando así se indica. ** $p < 0,01$ frente a curva sin incubarse con indometacina.

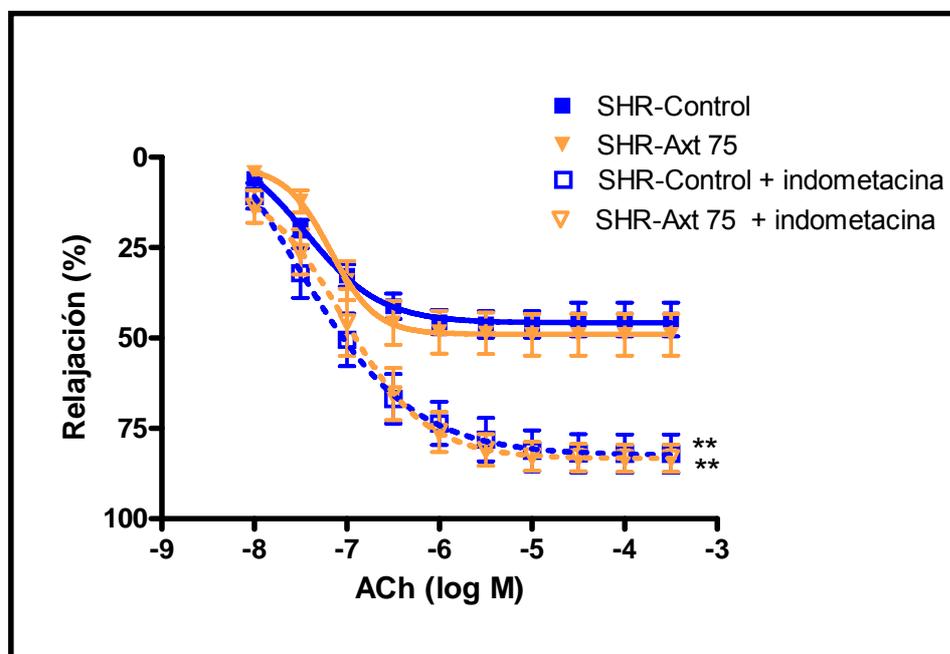


Figura 15.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-4} M) en aortas, precontraídas con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75) e incubadas con indometacina (5×10^{-6} M) cuando así se indica. ** $p < 0,01$ frente a curva sin incubarse con indometacina.

Tabla 8.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-4} M) en aortas de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200), SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75) e incubadas con indometacina (5×10^{-6} M) cuando así se indica. ** $p < 0,01$ frente a curva de acetilcolina sin incubar con indometacina.

ACETILCOLINA				
Curva	Parámetro	SHR-Control	SHR-Axt 200	SHR-Axt 75
Acetilcolina	E_{max} (%)	$45,9 \pm 1,6$	$45,6 \pm 0,9$	$49,0 \pm 2,1$
	pD_2	$7,3 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,1$
Acetilcolina + Indometacina	E_{max} (%)	$82,6 \pm 3,5^{**}$	$77,8 \pm 3,1^{**}$	$83,4 \pm 2,7^{**}$
	pD_2	$7,6 \pm 0,7^{**}$	$7,3 \pm 0,5^{**}$	$7,0 \pm 0,2^{**}$

Como se mencionó en la sección de métodos, se realizaron también curvas concentración-respuesta a ACh después de la incubación durante 30 minutos con L-NAME para valorar si el tratamiento modifica la participación del NO en la respuesta relajante. En la figura 16 se puede observar que la relajación a ACh se perdió por completo en estas condiciones. Este efecto se observó tanto en el grupo SHR-Control como

en el SHR-Axt 200. De hecho, se puede observar que se produjo una ligera contracción que no fue superior a un 15% con una superposición de las respuestas en ambos grupos experimentales. Sin embargo, los anillos de aorta del grupo SHR-Axt 75 tuvieron una contracción menor pero no significativamente diferente al grupo control, como se observa en la figura 17.

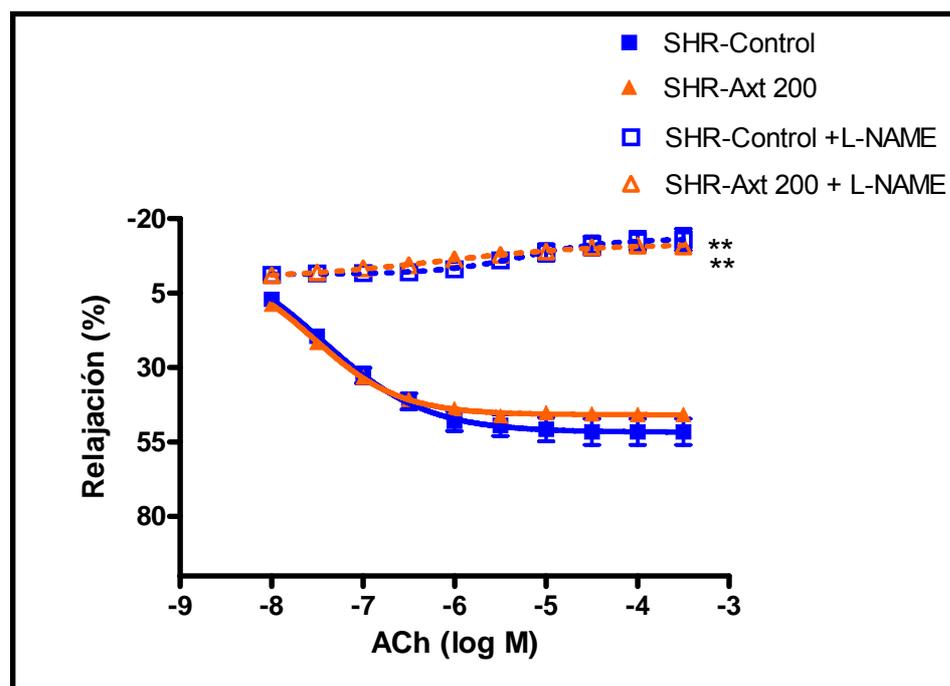


Figura 16.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-4} M) en aortas, precontraídas con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control) y SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) e incubadas con L-NAME (1×10^{-4} M) cuando así se indica. ** $p < 0,01$ frente a curva sin incubar con L-NAME.

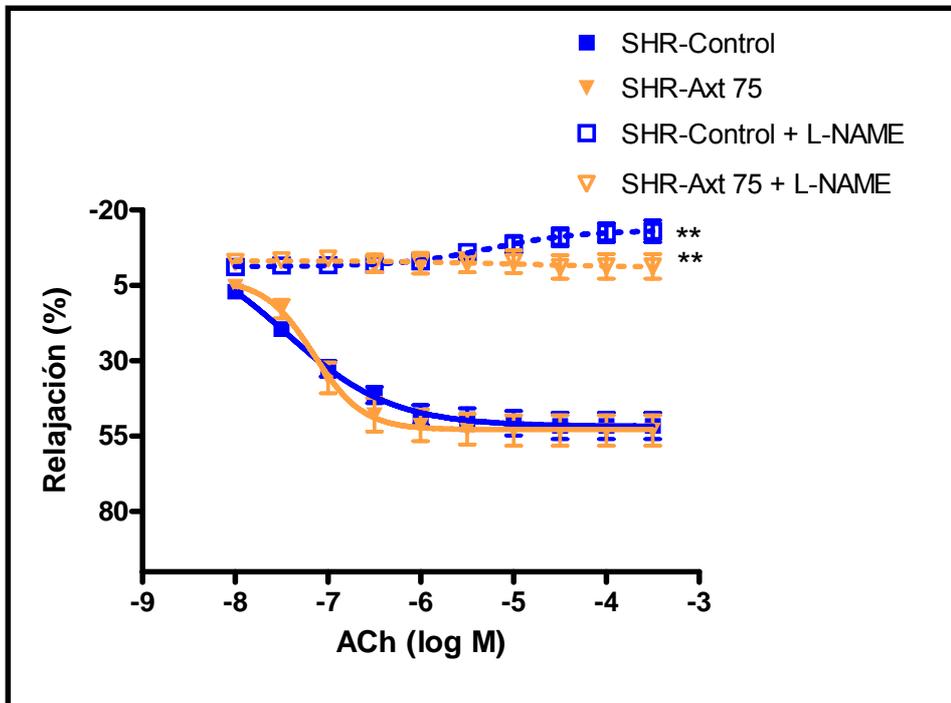


Figura 17.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-4} M) en aortas, precontraídas con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75) e incubadas con L-NAME (1×10^{-4} M) cuando así se indica. ** $p < 0,01$ frente a curva sin incubar con L-NAME.

La biodisponibilidad del NO que se determinó al comparar la respuesta contracturante a FE antes y después de la incubación con L-NAME no cambió significativamente entre los tres grupos experimentales. Los valores fueron: $173,9 \pm 11,5\%$ en el grupo SHR-Control, $157,7 \pm 10,0\%$ en el grupo SHR-Axt 200 y $147,0 \pm 12,9\%$ en el grupo SHR-Axt 75. Como se puede ver el tratamiento con astaxantina en las dos dosis utilizadas no mejoró la producción basal de NO.

- Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes: nitroprusiato sódico

En la figura 18 se muestran las curvas de relajación independiente del endotelio. El perfil de las curvas es semejante en los tres grupos de estudio e igualmente se puede ver que los parámetros que caracterizan estas curvas son similares en los tres grupos experimentales (Tabla 9).

Tabla 9.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (1×10^{-9} - 3×10^{-5} M) en aortas de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75).

NITROPRUSIATO SÓDICO			
Parámetro	SHR-Control	SHR-Axt 200	SHR-Axt 75
E_{\max} (%)	$79,7 \pm 4,7$	$77,6 \pm 3,9$	$75,5 \pm 3,4$
pD_2	$7,7 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,2$

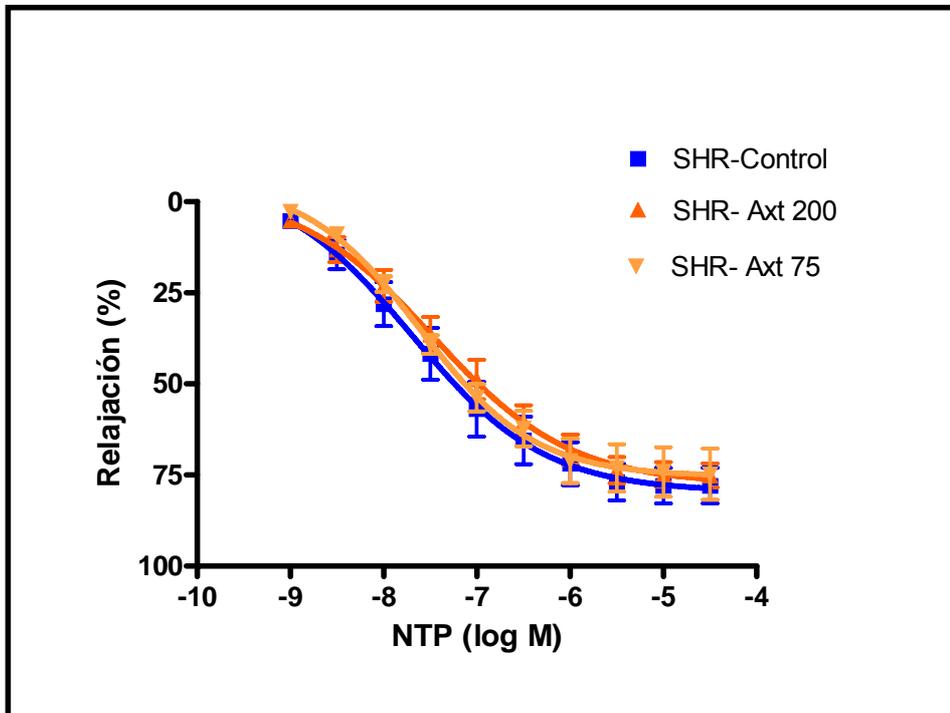


Figura 18.- Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (1×10^{-9} - 3×10^{-5} M) en aortas, precontraídas con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75).

2.2. Estudios de funcionalidad: riñón

Metodología

Una vez sacrificado el animal, el riñón izquierdo se canula cuidadosamente por la unión entre la arteria renal y la aorta abdominal con un catéter ($\varnothing = 0,96$ mm), se separa cuidadosamente y mediante el mismo catéter se conecta simultáneamente, por una llave de tres vías, con el transductor de presión y el sistema de perfusión (Figura 19). 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 mediante una bomba de perfusión (Masterflex L/S, Cole-Palmer, EE.UU.). Los cambios de presión detectados por el transductor se registran con un sistema computarizado PowerLab/800 para Windows.



Figura 19.- Sistema de perfusión para evaluar la funcionalidad del lecho vascular renal.

Después de 15 min de estabilización, se comprobó la funcionalidad del tejido con KCl (40 mM) en el líquido de perfusión hasta alcanzar una meseta de contracción estable. En ese momento se retira el agonista del líquido de perfusión para recuperar la presión basal.

Las curvas concentración-respuesta a ACh (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M) se realizaron previa contracción con FE (1×10^{-6} M). Cuando se conseguía una meseta de contracción estable se perfundían las soluciones con concentraciones crecientes de ACh, esperando una respuesta estable antes de incorporar la siguiente concentración. Después de un periodo de estabilización de 30 minutos se repetía el mismo protocolo para realizar una curva concentración-respuesta a NTP (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M).

En algunos experimentos, correspondientes a los grupos SHR-Control y SHR-Axt 200, se repitió la curva concentración-respuesta de ACh en presencia de L-NAME (1×10^{-4} M) con el fin de determinar la participación de la síntesis de NO en la respuesta relajante. La biodisponibilidad de NO se determinó, como en el caso de las aortas, comparando las respuestas de FE antes y después de la incubación con L-NAME. Los detalles sobre las sustancias utilizadas se pueden encontrar en el anexo 1.

Resultados

La presión de perfusión basal y la respuesta a KCl se expresan en mmHg. La relajación provocada por ACh se expresa como % de relajación frente a la respuesta de contracción obtenida con FE 1×10^{-6} M. Los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 10 experimentos. El análisis estadístico de los resultados se realizó como se describe en los apartados 2 y 3 del anexo 2.

No existió diferencia significativa en la presión de perfusión basal entre los tres grupos experimentales: $39,6 \pm 5,2$ mmHg en el grupo SHR-Control, $43,6 \pm 2,2$ mmHg en el grupo SHR-Axt 200 y $50,3 \pm 4,6$ mmHg en el

grupo SHR-Axt 75. En la respuesta a KCl (40 mM) tampoco hubo diferencia; los resultados en el mismo orden fueron: $103,2 \pm 17,8$ mmHg, $113,9 \pm 14,1$ mmHg y $138,1 \pm 12$ mmHg.

En la figura 20 se presentan las curvas concentración-respuesta a ACh en riñón. El perfil de estas curvas es similar en los tres grupos experimentales aunque con un desplazamiento a la izquierda de las curvas correspondientes a los dos grupos tratados con astaxantina. Se observan diferencias altamente significativas en la respuesta máxima y un ligero incremento en los valores de pD_2 , aunque estos últimos no llegaron a ser significativos (Tabla 10). Con los datos obtenidos, podemos decir que la astaxantina mejora la relajación endotelio dependiente en el lecho vascular renal mejorando los valores de pD_2 e incrementando entre un 15 a un 18% el valor del E_{max} con respecto al grupo SHR-Control.

La perfusión con L-NAME incrementó la respuesta contracturante a FE. Los valores de biodisponibilidad de NO reflejan que el tratamiento con astaxantina 200 mg/kg/día incrementó este parámetro de forma significativa (Figura 21).

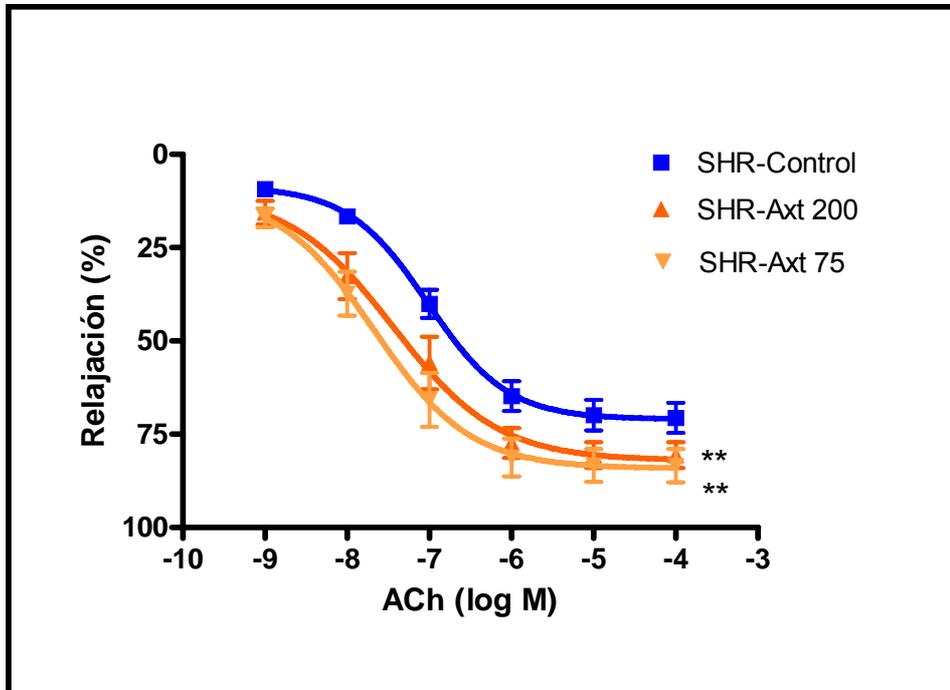


Figura 20.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M) en riñón, perfundido y precontraído con fenilefrina (10^{-6} M), de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). ** $p < 0,01$ frente a la curva del grupo SHR-Control.

Tabla 10.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M) en riñón de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente a la curva del grupo SHR-Control.

ACETILCOLINA			
Parámetro	SHR-Control	SHR-Axt 200	SHR-Axt 75
E_{\max} (%)	71,1 \pm 2,9	82,1 \pm 3,8**	84,2 \pm 3,8**
pD ₂	7,0 \pm 0,1	7,4 \pm 0,3*	7,7 \pm 0,3*

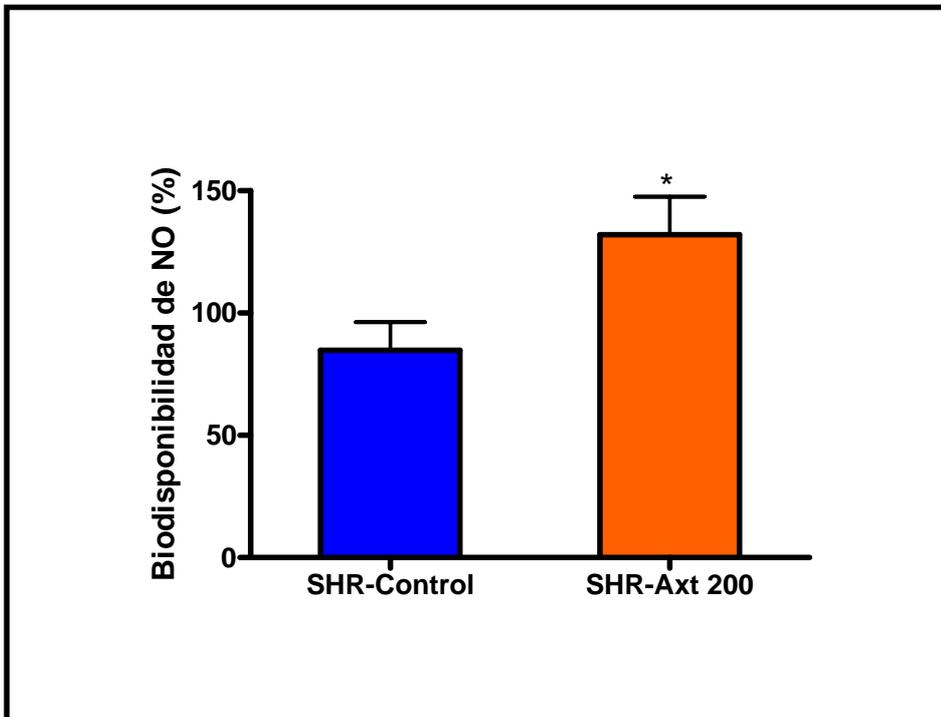


Figura 21.- Biodisponibilidad de NO en riñón perfundido de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control) y SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200). * $p < 0,05$ frente al grupo SHR-Control.

La relajación provocada por NTP en riñón perfundido fue similar en los tres grupos estudiados como podemos observar tanto en las curvas concentración-respuesta como en los parámetros calculados a partir del ajuste no lineal de la misma (Tabla 11 y Figura 22).

Nótese que aunque el grupo SHR-Axt 75 tuvo valores de relajación ligeramente superiores a los otros dos grupos, esta diferencia no fue significativa. De hecho, la curva concentración-respuesta correspondiente a este grupo se desplazó a la izquierda dando un valor de pD_2 ligeramente mayor pero no estadísticamente diferente.

Tabla 11.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M) en riñón de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75).

NITROPRUSIATO SÓDICO			
Parámetro	SHR-Control	SHR-Axt 200	SHR-Axt 75
E_{max} (%)	76,4 ± 15,8	75,9 ± 10,6	83,4 ± 12,2
pD_2	6,3 ± 0,5	6,1 ± 0,3	7,3 ± 0,7

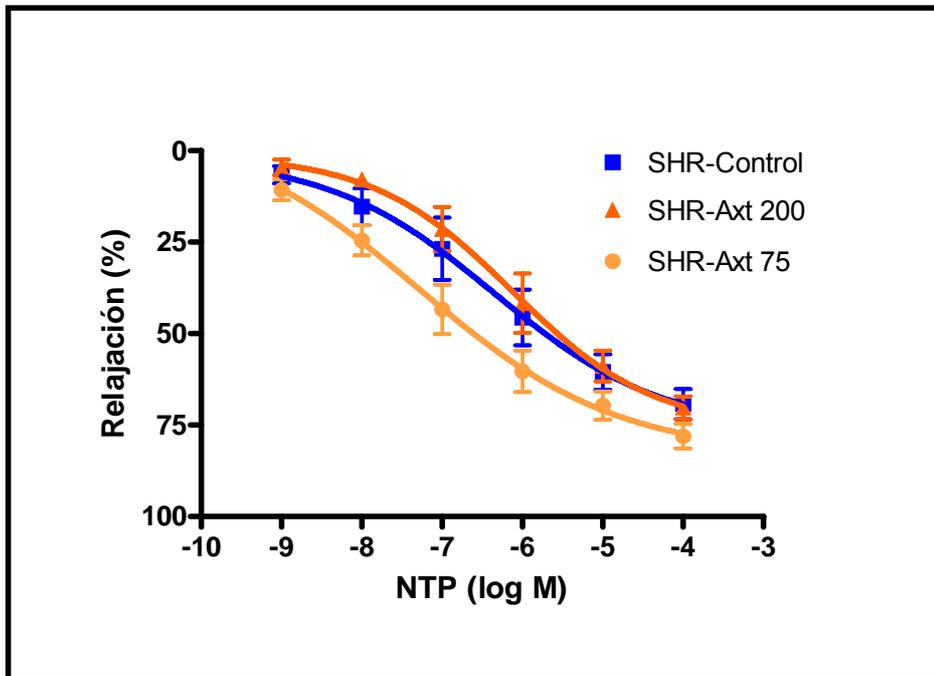


Figura 22.- Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M) en riñón, perfundido y precontraído con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75)-

3. Hipertrofia cardiaca

Metodología

Una vez que se sacrifican los animales se extrae el corazón y se coloca inmediatamente en solución Krebs a 37 °C aireada con carbógeno. A continuación se pasa a otra solución de 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 izquierdo¹⁸⁵. Se seca cuidadosamente para eliminar el exceso de líquido y se pesa. La relación entre el peso del ventrículo izquierdo y el peso corporal se utiliza como índice de hipertrofia cardiaca (HVI).

Resultados

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 10 experimentos. El análisis estadístico de los resultados se realizó como se describe en el apartado 2 del anexo 2.

En la figura 23 puede observarse que el tratamiento con astaxantina redujo de forma significativa la hipertrofia cardiaca. Cabe destacar que al comparar los dos tratamientos con astaxantina no se encontró diferencia significativa entre ellos. De acuerdo a lo anterior, podemos decir que la astaxantina reduce la HVI con las dos dosis utilizadas de manera estadísticamente significativa con respecto al grupo SHR-Control.

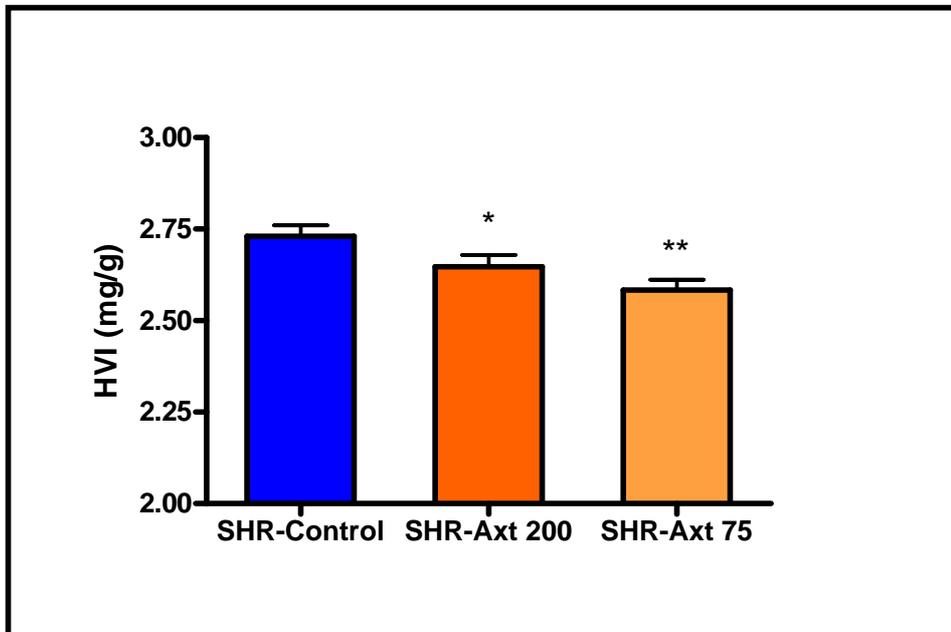


Figura 23.- Índice de hipertrofia cardiaca (HVI) en ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente al grupo SHR-Control.

4. Morfometría en arterias

Metodología

La metodología para arterias de conductancia (aorta) y de resistencia (lecho vascular renal) es común, sólo cambia la forma de obtener las muestras, lo que se especifica en las siguientes líneas.

Todas las muestras se fijaron en formol tamponado al 10%. De la arteria aorta se fijó un anillo, en tanto que para el caso de las arterias renales, la fijación se realizó con la mitad del riñón derecho seccionado longitudinalmente en su eje dorso-ventral. Posteriormente, en ambos casos, se realiza la inclusión en parafina sintética entre 56 y 57 °C, mediante el uso de un procesador automático de tejidos Shandon-Elliot modelo Bench SCE 0400, EE.UU., con un programa de cambio de alcoholes y bencenos que se efectúa de manera automática. Una vez concluido este proceso se realizan los bloques en la unidad formadora de bloques marca Tissue-Teck, Japón.

Para el estudio estructural se realizaron cortes seriados de estas muestras de 4-5 μm de grosor con un micrótomo de rotación (LEICA RM 2155, Alemania). A continuación, se colocaron en portaobjetos previamente desengrasados y tratados con albúmina-glicerina. Por último los cortes se dejaron secar en una estufa a 37 °C durante 16-18 horas. Las secciones se desparafinan en xilol y se hidratan pasando por una serie de alcoholes de concentración decreciente.

Para determinar los distintos parámetros morfométricos de las arterias los cortes se tiñen con hematoxilina-eosina con el fin de aumentar el contraste. La hematoxilina es un colorante de carácter básico con más afinidad por componentes celulares ácidos como el núcleo, que se tiñe de color violeta. En contraste, la eosina es de naturaleza ácida, con mayor afinidad por el citoplasma que adquiere un color rosado.

Una vez realizada la tinción, los cortes se observan al microscopio óptico (Olympus BX50, Japón), ajustando el objetivo para cada muestra de modo que se obtenga una visión completa de los anillos de aorta y de las secciones transversales de las arterias renales. En este caso, se eligieron arterias intrarrenales de entre 20 y 60 μm de diámetro externo con el fin de asegurarnos que se trataba de vasos de resistencia. Las imágenes se captaron con la ayuda de una cámara de alta resolución (Olympus DP50, Japón) 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 midieron los siguientes parámetros:

- P_i : perímetro interno que delimita el lumen del vaso.
- P_e : perímetro externo 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 realizó por duplicado por un mismo observador dando como valor de medida la media entre ambos valores. A partir de estos valores se calcularon 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, ($P_e = 2\pi R_e$).
- CSA_m : área seccional de la capa media que se obtiene por diferencia de áreas ($A_e - A_i$).
- L : lumen del vaso ($2 \times R_i$).
- W_m : grosor de la capa media que se obtiene por diferencia entre ambos radios ($R_e - R_i$).
- W_m/L : relación entre el grosor de la capa media y el lumen del vaso.

Resultados

Los resultados de morfometría se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 5 experimentos. El análisis estadístico de los resultados se realizó como se describe en el apartado 2 del anexo 2.

- Morfometría de aortas

Los valores de cada parámetro morfométrico se pueden ver en la tabla 12. La administración de astaxantina produjo cambios significativos en todos ellos, excepto en el valor de L del grupo SHR-Axt 200. La disminución en el W_m en las aortas de ratas de los grupos tratados produjo cambios significativos en el área seccional de la capa media y en la relación W_m/L (Figura 24). Estos cambios en la morfometría de la aorta, implican una mejoría estructural. Para ilustrar los resultados, en la figura 25 se muestran imágenes representativas.

Tabla 12.- Parámetros morfométricos de arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente al grupo SHR-Control.

Parámetro	SHR-Control	SHR-Axt 200	SHR-Axt 75
L (μm)	1514 \pm 18	1519 \pm 21	1636 \pm 31**
W_m (μm)	130,0 \pm 3,4	115,3 \pm 3,0*	112,0 \pm 3,9**
CSA_m (mm^2)	0,659 \pm 0,014	0,589 \pm 0,014 *	0,597 \pm 0,018 **

L= lumen del vaso, W_m = grosor de la capa media, CSA_m = área seccional de la capa media.

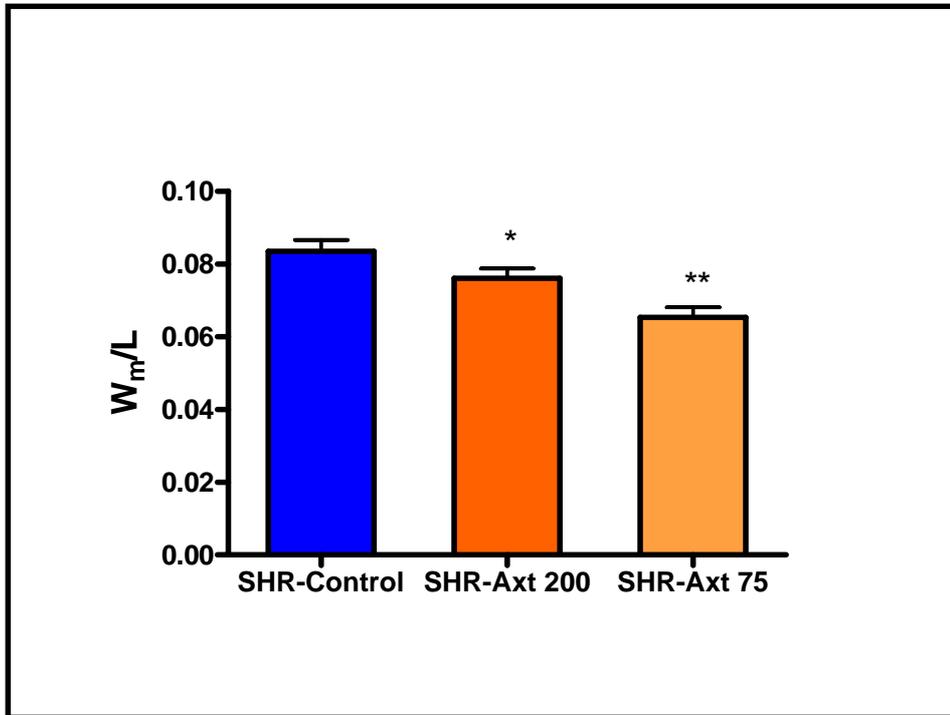


Figura 24.- Relación entre el grosor de la capa media y el lumen (W_m/L) en secciones de aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente al grupo SHR-Control.

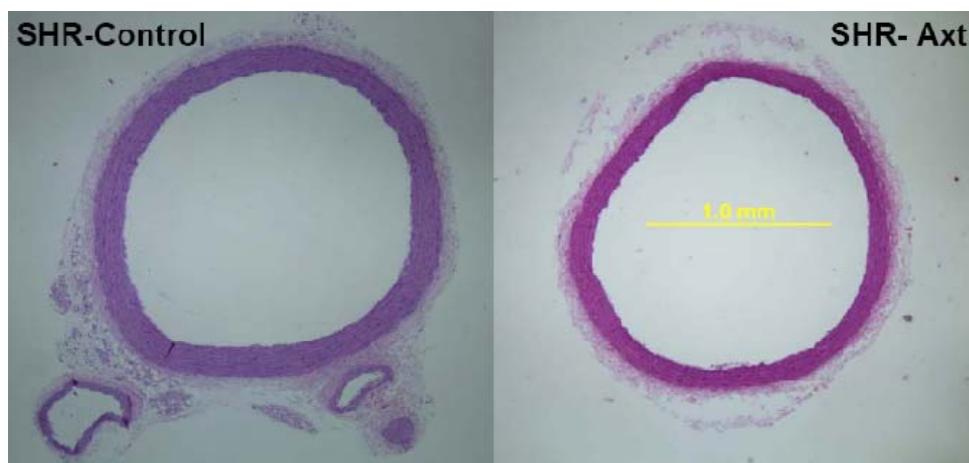


Figura 25.- Imágenes obtenidas de cortes histológicos de secciones transversales de arteria aorta teñida con hematoxilina-eosina. Ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control) y ratas SHR tratadas con astaxantina (SHR-Axt).

- Morfometría de arterias renales

La evaluación de los cambios morfométricos en arterias de resistencia se llevó a cabo seleccionando un mínimo de 10 arterias intrarrenales para cada riñón con un diámetro externo comprendido entre 20 y 60 μm . El análisis morfométrico de estas arterias mostró que los tratamientos con astaxantina modificaron todos los parámetros morfométricos, con excepción del lumen en el grupo SHR-Axt 200. En la tabla 13 se puede ver que el lumen del grupo experimental SHR-Axt 75 mostró un incremento altamente significativo con respecto al grupo SHR-Control.

Los dos grupos tratados con astaxantina mostraron una reducción del W_m , siendo en ambos casos esta diferencia altamente significativa con respecto al grupo SHR-Control. El comportamiento para el CSA_m fue el mismo que en el parámetro anterior, pero la diferencia encontrada entre los dos grupos tratados con astaxantina y el grupo SHR-Control fue menos significativa. Los cambios producidos por la administración de astaxantina en la morfometría de las arterias renales en las dosis utilizadas, implican una mejoría en la estructura de los vasos. Al comparar los dos grupos tratados para estos tres parámetros, no se encontró diferencia estadísticamente significativa. En la figura 26 se muestran los valores correspondientes a la relación W_m/L para cada uno de los grupos experimentales. En tanto que en la figura 27, se muestran imágenes representativas.

Tabla 13.- Parámetros morfométricos en arterias intrarrenales de resistencia de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente al grupo SHR-Control.

Parámetro	SHR-Control	SHR-Axt 200	SHR-Axt 75
L (μm)	17,30 \pm 0,83	18,02 \pm 0,86	21,57 \pm 0,99**
W_m (μm)	10,32 \pm 0,36	8,58 \pm 0,38**	7,99 \pm 0,29**
CSA_m (μm^2)	847,6 \pm 55,9	710,6 \pm 58,2 *	707,3 \pm 50,0*

L= lumen del vaso, W_m = grosor de la capa media, CSA_m = área seccional de la capa media.

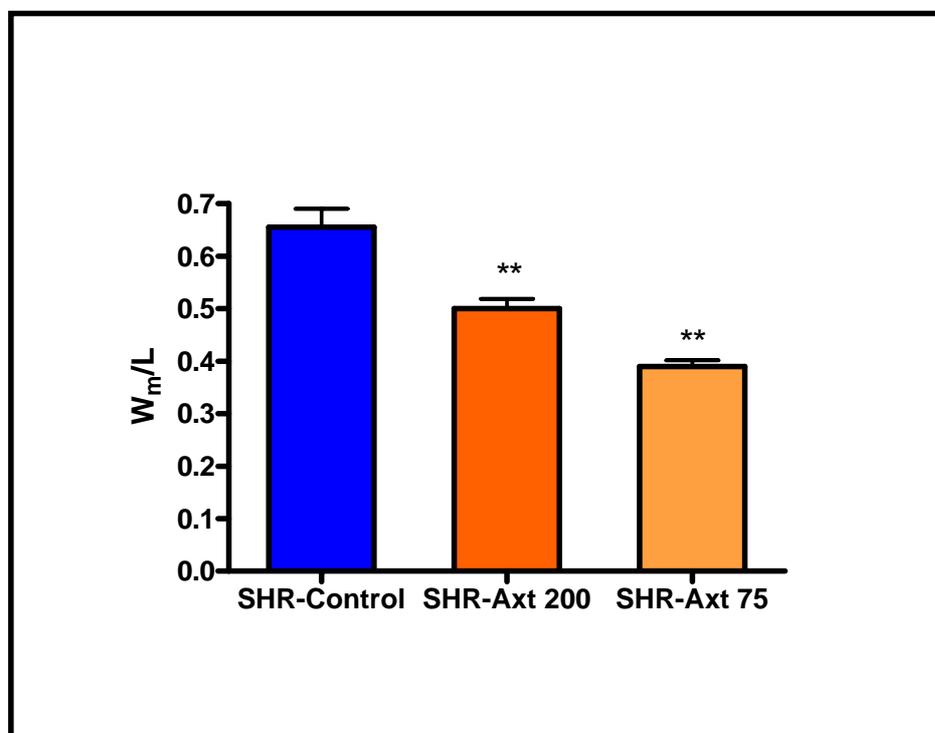


Figura 26.- Relación entre el grosor de la capa media y el lumen (W_m/L) en secciones de arterias intrarrenales de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). ** $p < 0,01$ frente al grupo SHR-Control.

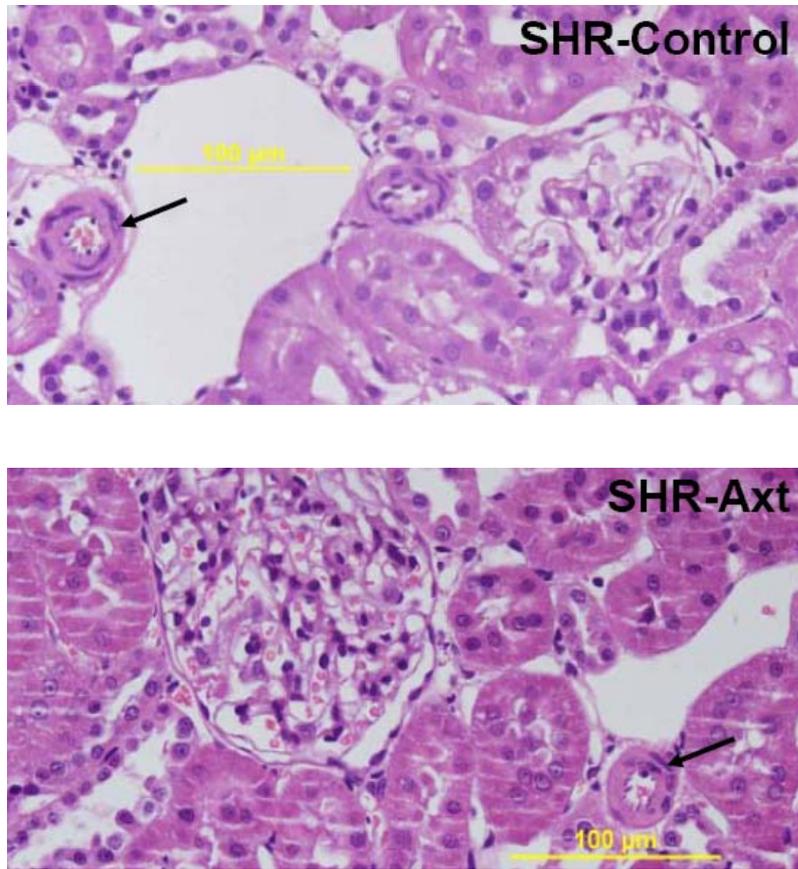


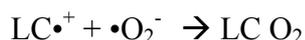
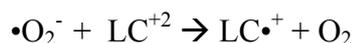
Figura 27.- Imágenes obtenidas de cortes histológicos de secciones transversales de arterias intrarrenales teñidas con hematoxilina eosina. Ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control) y ratas SHR tratadas con astaxantina (SHR-Axt).

5. Producción de anión superóxido

5.1. Evaluación por quimioluminiscencia

Metodología

La producción de $\bullet\text{O}_2^-$ se midió mediante quimioluminiscencia con lucigenina (LC), este método se basa en la formación de un catión de lucigenina (LC^+) en presencia de $\bullet\text{O}_2^-$, a partir de este catión se forma un dioxetano de lucigenina (LCO_2) también en presencia del $\bullet\text{O}_2^-$; posteriormente, para estabilizar la lucigenina, el dioxetano cede su energía en forma de ondas electromagnéticas que son medidas por un fotoamplificador y un fotodetector, de acuerdo a las siguientes reacciones¹⁸⁶:



Las determinaciones se realizaron en arteria aorta siguiendo las condiciones propuestas por Münzel y col.¹⁸⁷. Animales provenientes de cada uno de los grupos experimentales se sacrificaron como ya se mencionó, se extrajo la arteria aorta y, una vez limpia de tejido conectivo y grasa, se cortó en anillos. Los anillos se incubaron en una solución tampón HEPES cuya composición se detalla en el anexo de sustancias utilizadas (anexo 1). La incubación se realizó durante 30 minutos a 37 °C, con adición constante de carbógeno y en presencia de ácido dietil-ditiocarbamato (DDC, 10 mM).

Se realizaron medidas de producción de $\bullet\text{O}_2^-$ tanto en forma basal como estimulada mediante la adición de NADPH 100 μM como sustrato de la NADPH oxidasa.

En un tubo del luminómetro se pone HEPES a 37 °C, se añade LC (5 μM), por último se pone el anillo de aorta y se lee inmediatamente. Al terminar esta lectura se añade 4,5-dihidroxi-1,3-benceno ácido disulfónico (tirón 1 M), que es un “scavenger” de $\bullet\text{O}_2^-$, con el fin de hacer una segunda lectura y obtener por diferencia las unidades relativas de luminiscencia (URL) específicas del $\bullet\text{O}_2^-$.

La mitad de los anillos se incubaron en presencia de NADPH para determinar la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ cuando se estimula la NAD(P)H oxidasa con su sustrato.

Todas las lecturas se realizaron en un luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold, Alemania). Cada lectura fue el promedio de 10 medidas de 30 segundos con un retraso de 2 segundos.

Terminado el experimento los anillos de aorta se secaron y se pesaron para posteriormente expresar los resultados como unidades relativas de luminiscencia por unidad de tiempo y respecto al peso seco de los anillos (URL/min/mg de seco).

Resultados

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 5 experimentos. El análisis estadístico de los resultados se realizó como se describe en el apartado 2 del anexo 2.

La producción basal de $\bullet\text{O}_2^-$ no fue estadísticamente diferente entre los tres grupos experimentales: $289,8 \pm 61,3$ para el grupo SHR-Control, $351,0 \pm 34,1$ y $253,3 \pm 26,4$ URL/min/mg de tejido para los grupos SHR-Axt 200 y SHR-Axt 75 respectivamente.

La producción estimulada de $\bullet\text{O}_2^-$ mediante la adición de NADPH se incrementó entre 6 a 10 veces respecto a la producción basal. En este caso, las diferencias en la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ se hicieron patentes entre los grupos experimentales (Figura 28). En la figura se puede observar que el tratamiento con astaxantina, independientemente de la dosis, redujo en un 50% la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ frente al grupo SHR-Control. Sin embargo, no existió diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos tratados.

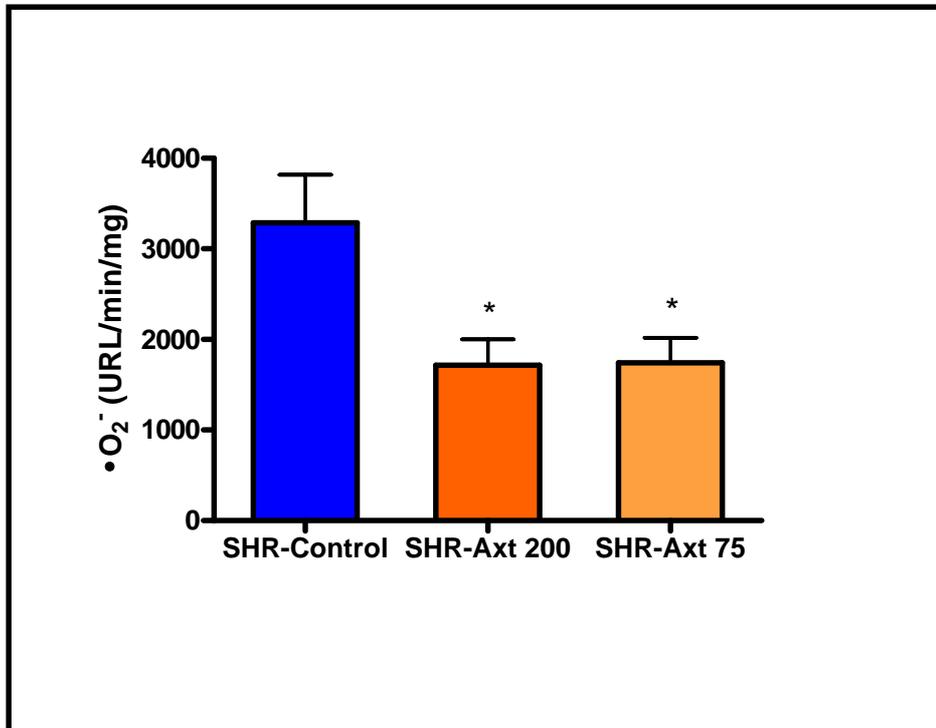


Figura 28.- Producción de $\bullet\text{O}_2^-$ estimulada con NADPH ($100\ \mu\text{M}$) en anillos de aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control), SHR tratadas con 200 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 200) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). * $p < 0,05$ frente al grupo SHR-Control.

5.2. Evaluación por fluorescencia

Metodología

Debido a que el valor más bajo de producción de $\bullet\text{O}_2^-$ basal entre los tres grupos experimentales se obtuvo con el grupo SHR-Axt 75, se decidió evaluar la producción *in situ* de $\bullet\text{O}_2^-$ tanto en este grupo como en el grupo SHR-Control, para lo cual se utilizó dihidroetidio (DHE), una sonda fluorogénica específica de $\bullet\text{O}_2^-$. Muestras de anillos de aorta provenientes de estos dos grupos experimentales fueron incluidas de manera inmediata a su obtención en una mezcla de alcohol polivinílico y carbowax (O.C.T. Sakura Tissue Tek, Japón) y mantenidos a -80°C hasta su utilización.

A partir de estas inclusiones, se hicieron cortes de $2\ \mu\text{m}$ de espesor en un criostato (Microm HM 505N, Alemania). Una vez montados en portaobjetos se llevaron a temperatura ambiente y se rehidrataron con solución tampón HEPES. Posteriormente se incubaron en la oscuridad durante cinco minutos en una solución $1\ \mu\text{M}$ de dihidroetidio en tampón HEPES, se lavaron nuevamente con la solución tampón y se observaron y fotografiaron mediante un microscopio confocal (Zeiss LSM 510, Alemania) usando una longitud de onda de excitación de $530\ \text{nm}$ y un filtro de emisión de rodamina. Las condiciones del detector y del laser se mantuvieron constantes para todas las muestras.



La fluorescencia del DHE se cuantificó mediante un paquete de análisis de imagen (Image J versión 1.4.3. NIH., EE.UU.). Las imágenes RGB del microscopio confocal fueron cargadas en este programa y convertidas a imágenes de 8 bits en escala de grises. La fluorescencia media se cuantificó como la densidad integrada de fluorescencia (producto del valor medio en grises multiplicado por el área de medición). El valor medio de grises a su

vez corresponde a la luminosidad en grises dividida entre el número total de píxeles.

Resultados

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 4 experimentos. El análisis estadístico de los resultados se realizó como se describe en el apartado 2 del anexo 2.

Como se ve en la figura 29, la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ en el grupo control fue superior a la producción del grupo tratado con astaxantina. El tratamiento con astaxantina a la dosis de 75 mg/kg/día redujo la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ en los cortes de aorta en un 34% con respecto al grupo no tratado, lo que pondría de manifiesto el carácter antioxidante de la astaxantina. En la misma figura 29 se presentan dos fotografías características de esta evaluación.

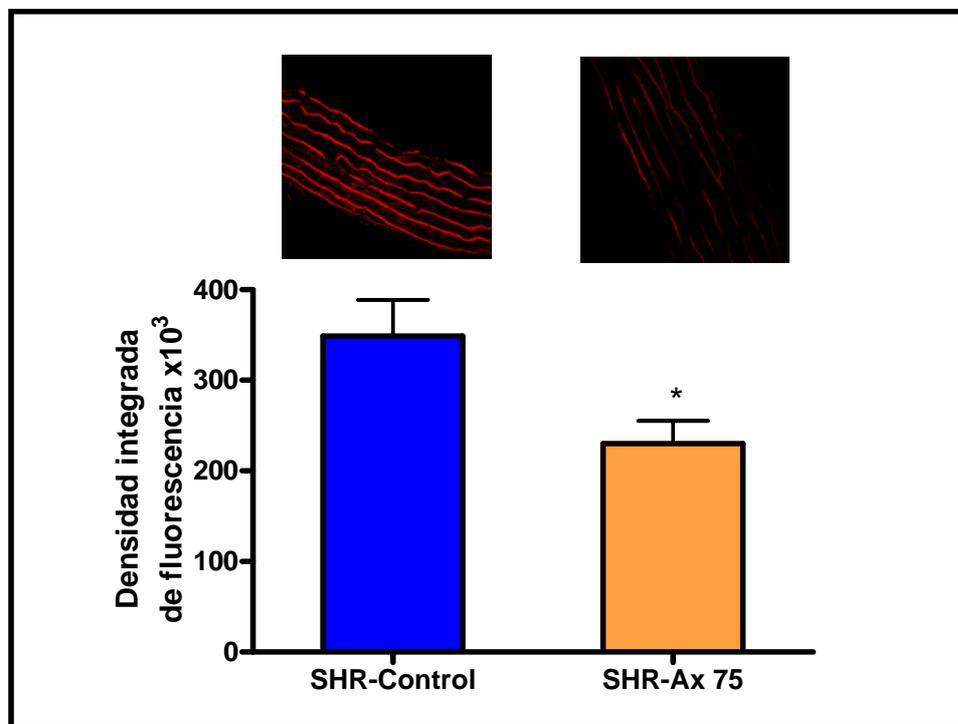


Figura 29.- Producción “in situ” de $\bullet\text{O}_2^-$ en anillos de aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR-Control) y SHR tratadas con 75 mg/kg/día de astaxantina (SHR-Axt 75). * $p < 0,05$ frente al grupo SHR-Control.

MODELO 2. RATONES CON HIPERTENSIÓN INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II

El modelo se desarrolló con ratones macho Swiss Albino pertenecientes a la cepa CD1 con ocho semanas de edad, procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la USAL.

Previamente se pesaron y se midió la presión arterial sistólica (PAS) para distribuir a los animales en los siguientes grupos:

Sham: ratones Swiss Albino-CD1 operados e implantados con las minibombas osmóticas pero sin la infusión de Ang II.

Ang II: ratones Swiss Albino-CD1 operados e implantados con las mini-bombas osmóticas y la infusión de Ang II.

Ang II Axt: ratones Swiss Albino-CD1 operados e implantados con las minibombas osmóticas y la infusión de Ang II más el tratamiento en la dieta con astaxantina a una dosis de 75 mg/kg/día.

El pienso y el agua consumidos se midieron cada tres días. Semanalmente se pesaron los animales con el objeto de ajustar la dosis de astaxantina a la cantidad correspondiente de acuerdo a los cambios en el peso corporal. Con la misma frecuencia fue evaluada la PAS.

1. Presión arterial sistólica

Metodología

La PAS se midió en la arteria caudal, siguiendo el método descrito en el modelo con ratas SHR. En este caso se utilizó un equipo NIPREM 645 (Cibertec S.A. España). Las medidas se realizaron antes de la inserción de las minibombas y después de 7 y 14 días.

En este caso, además, se determinó la presión arterial media (PAM) por un método cruento en animales anestesiados. Después de terminar el tiempo de experimentación, los ratones se anestesiaron con uretano (1,5 g/kg, i.p), a continuación se canuló la arteria carótida con un catéter ($\varnothing = 0,61$ mm), que se conectó a un transductor de presión. Los valores de presión detectados por el transductor se registraron con un sistema computarizado PowerLab/800 para Windows. Se midió la PAS, la presión arterial diastólica (PAD) y se calculó la presión arterial media de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$PAM = \{[PAS-PAD]/3\} + PAD$$

Resultados

Los resultados de la PAS y de la PAM se expresan en mmHg como media aritmética \pm EEM de un mínimo de 10 experimentos, el análisis estadístico se realizó como se menciona en el apartado 2 del anexo 2.

En los valores de la PAS se encontró que, si bien al inicio no existieron diferencias significativas, conforme avanzó el tiempo de tratamiento los tres grupos mostraron comportamientos diferentes.

Durante los 14 días de tratamiento la PAS no se modificó en el grupo Sham: al inicio fue de 102 ± 1 mmHg y al final de 104 ± 1 mmHg. En contraste la infusión de Ang II produjo un incremento de 45 ± 1 mmHg en

el grupo experimental Ang II. Por otro lado, en el grupo de animales que además de Ang II recibió astaxantina en la dieta, el incremento de la PAS fue de 24 ± 1 mmHg. En la figura 30 se puede observar el comportamiento en relación a las PAS de los tres grupos.

En la misma figura se observa la PAM al final del tratamiento, aunque las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas, el comportamiento fue similar al de la PAS: el grupo Ang II mostró el valor más alto, seguido del grupo donde se administró astaxantina, mientras que el menor valor de la PAM fue para el grupo Sham.

En cuanto al peso de los animales, observamos que no existió diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos experimentales, tanto al inicio como al final del tratamiento, por lo que podemos decir que la infusión de Ang II y la administración de astaxantina en el alimento no afectaron el crecimiento en peso de los animales.

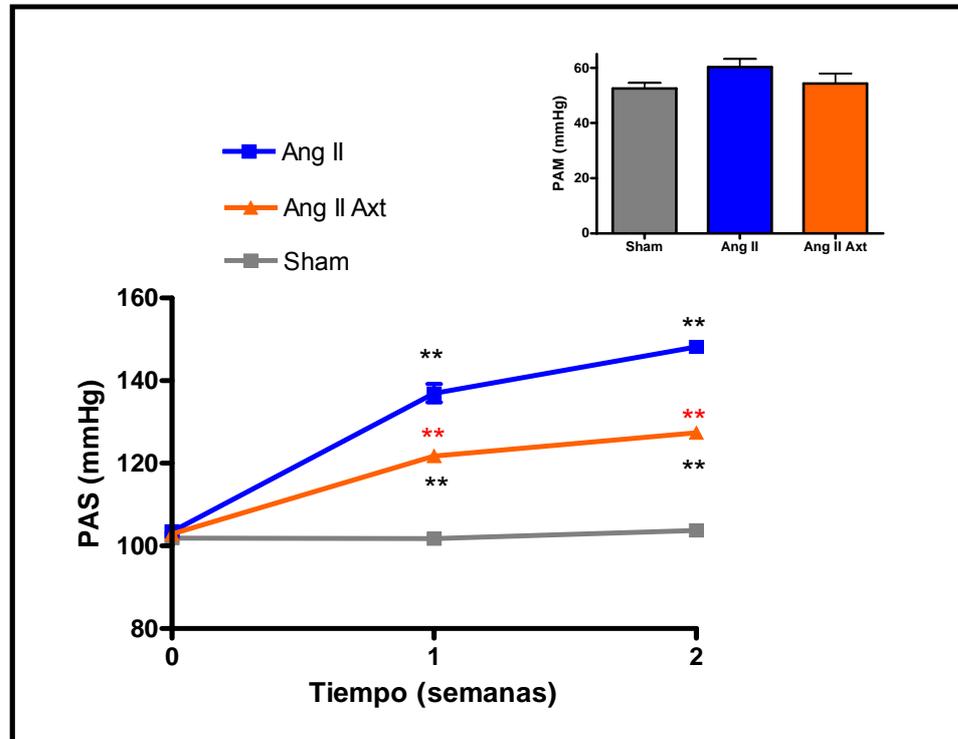


Figura 30.- Presión arterial sistólica (PAS) en ratones conscientes y presión arterial media (PAM) en ratones anestesiados Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). ** $p < 0,01$ frente al grupo Sham y ** $p < 0,01$ frente al grupo Ang II.

2. Estudios *in vitro*

Una vez determinada la PAM se realiza una laparotomía y se procede a la extracción de aorta y riñón para estudios de funcionalidad, corazón para determinar la hipertrofia cardiaca y fibrosis, además de sangre e hígado para determinar parámetros relacionados con el estrés oxidativo. Parte de las muestras se congelan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de las determinaciones.

2.1 Estudios de funcionalidad: arteria aorta

Metodología

Para los estudios de funcionalidad en aorta se utilizó un miógrafo de cuatro canales (Multiwire Myograph System, DMT Modelo 610M, Dinamarca). Previamente al montaje de los anillos y después de extraer la arteria aorta se procede a la eliminación del tejido conectivo y graso que la rodea, a continuación se corta en anillos de aproximadamente 2 mm de longitud. A través de la luz de cada segmento se introducen dos alambres finos de acero inoxidable de 40 μm de diámetro, uno se coloca en la parte fija o correspondiente al transductor, mientras que el otro se une a la parte móvil que a su vez está unida al tornillo micrométrico. Una vez que los anillos están montados en los baños, con solución Krebs y aereados con carbógeno se espera a que la temperatura se estabilice a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se normalizan los anillos a una tensión equivalente a 100 mmHg, y se ajusta la tensión a 5 mN. En la figura 31 se muestran los distintos pasos en el montaje.

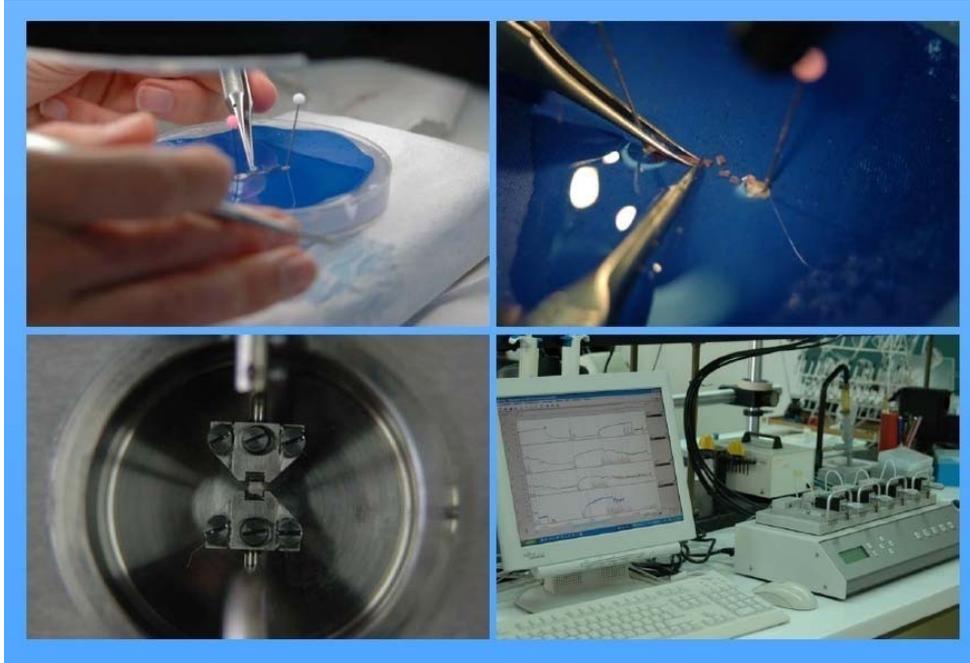


Figura 31.- Miógrafo y procedimiento para el montaje de anillos de aorta de ratón para los estudios de funcionalidad.

Cada anillo se deja estabilizar durante 60 minutos renovando la solución nutritiva cada 30 minutos. La funcionalidad del tejido se comprueba añadiendo al baño FE (1×10^{-7} M), una vez alcanzada una meseta de contracción se añade ACh (1×10^{-6} M) cuya respuesta relajante nos indica el estado funcional del endotelio. Posteriormente, se lavan repetidamente los anillos, se dejan estabilizar durante 30 minutos, tiempo aproximado que tarda el anillo en recuperar la tensión basal, se renueva la solución

Krebs y se dejan estabilizar 30 minutos más. A partir de este momento se realizaron, en anillos diferentes, los protocolos siguientes.

- Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes y contracturantes

Previa contracción de los anillos con FE (1×10^{-7} M) y una vez alcanzada una meseta de contracción estable, se realizaron curvas acumulativas concentración-respuesta de los siguientes agentes relajantes: ACh (1×10^{-8} - 3×10^{-4} M) y NTP (1×10^{-9} - 3×10^{-5} M).

Las curvas a ACh se repitieron después de la incubación durante 30 minutos con apocinina (1×10^{-4} M), un inhibidor de la NADPH oxidasa, para valorar la participación del $\bullet\text{O}_2^-$ en la respuesta relajante.

En otros anillos se realizaron curvas concentración-respuesta a noradrenalina (NA 1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) como se ve en la figura 32.

Además se obtuvieron respuestas a dosis única de Ang II (1×10^{-7} M) en diversos anillos de cada grupo experimental.

Las sustancias utilizadas se detallan en el anexo 1.

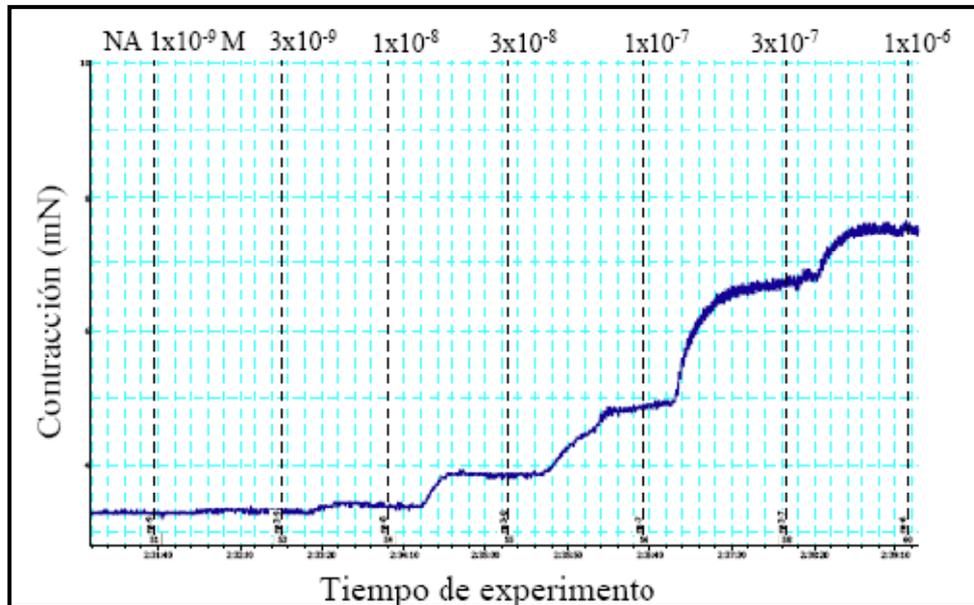


Figura.- 32. Registro original de una curva concentración-respuesta a NA en aorta de ratón.

Resultados

El efecto provocado por ACh y NTP se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE y las respuestas contracturantes a NA y Ang II se expresan en mN. En cada serie de experimentos los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 10 experimentos. El análisis estadístico de los resultados se realizó como se describe en los apartados 2 y 3 del anexo 2

- Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes: acetilcolina

Como se puede ver en la figura 33, la relajación endotelio dependiente en anillos de aorta no mejoró con la administración de astaxantina. La curva del grupo Sham queda desplazada hacia arriba del gráfico, mientras que las curvas de los grupos Ang II y Ang II Axt están muy próximas. Los valores de pD_2 para los grupos Ang II y Ang II Axt fueron prácticamente los mismos. Del mismo modo se puede ver que no existió diferencia entre estas dos curvas en sus valores de relajación máxima (Tabla 14). En contraste, los valores de pD_2 y del E_{max} de la curva correspondiente al grupo Sham fueron estadísticamente diferentes frente a los presentados por los primeros.

En la misma tabla también se observan los datos de las curvas concentración-respuesta a ACh en presencia de apocinina. En el grupo Sham la incubación con apocinina no modificó esta respuesta. En los grupos Ang II y Ang II Axt al comparar las curvas concentración respuesta en ausencia y en presencia de apocinina, los valores de E_{max} y de pD_2 fueron menores por lo que se puede decir que la incubación con apocinina de los anillos de aorta de estos dos grupos experimentales produjo una relajación menor y un desplazamiento a la derecha en las curvas concentración-respuesta. Esta disminución fue menor para el grupo Ang II Axt (Figura 34).

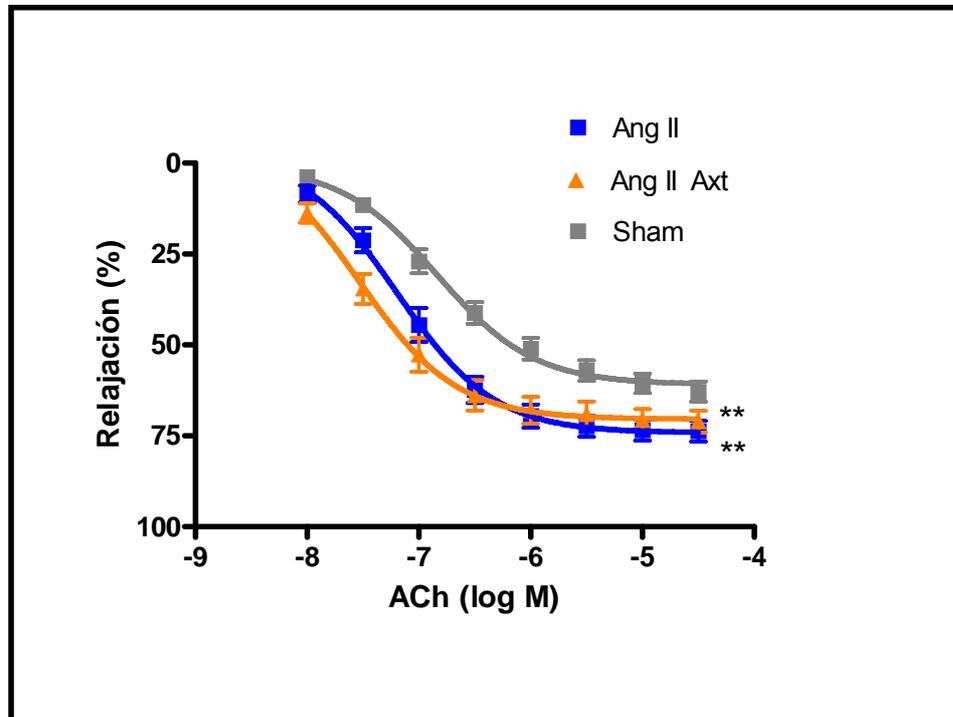


Figura 33.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-5} M) en aortas, precontraídas con fenilefrina (1×10^{-7} M), de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). ** $p < 0,01$ frente al grupo Sham.

Tabla 14.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-5} M) en ausencia y en presencia de apocinina (1×10^{-4} M) en aortas de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). # $p < 0,05$ frente a curva sin incubación con apocinina. ** $p < 0,01$ frente al grupo Sham.

ACETILCOLINA				
Curva	Parámetro	Sham	Ang II	Ang II Axt
Acetilcolina	E_{max} (%)	$60,9 \pm 1,5$	$74,3 \pm 1,7^{**}$	$70,5 \pm 1,8^{**}$
	pD_2	$6,8 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,1^{**}$	$7,5 \pm 0,1^{**}$
Acetilcolina + Apocinina	E_{max} (%)	$51,5 \pm 5,7$	$50,8 \pm 6,5\#$	$55,2 \pm 4,7\#$
	pD_2	$6,2 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,3\#$	$7,0 \pm 0,3\#$

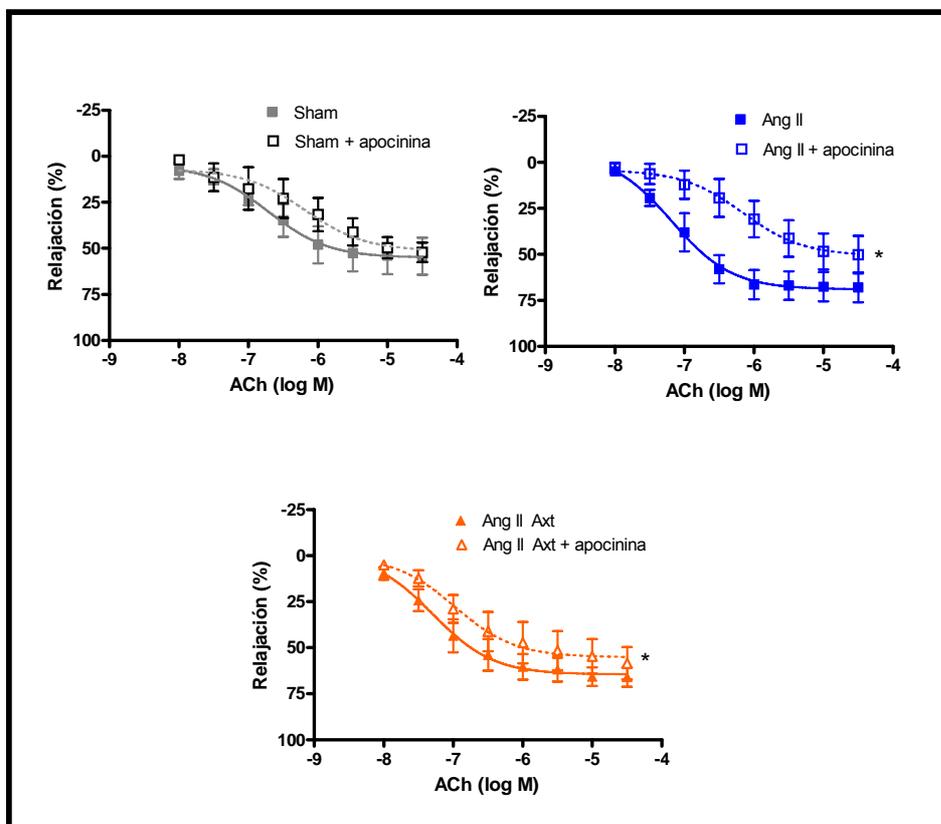


Figura 34.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-4} M), en ausencia y en presencia de apocinina (1×10^{-4} M), en aortas precontraídas con fenilefrina (1×10^{-7} M), de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). * $p < 0,05$ frente a curva sin incubar con apocinina.

- Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes: nitroprusiato sódico

En la figura 35 se muestran las curvas concentración-respuesta a NTP. La forma y magnitud de la respuesta fue semejante en los tres grupos de estudio. La respuesta máxima alcanzó el 100% en todos los grupos, sin embargo podemos observar un desplazamiento a la derecha de la curva del grupo Sham, lo que se refleja en una disminución significativa del valor de pD_2 (Tabla 15).

Tabla 15.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (1×10^{-9} - 3×10^{-6} M) en aortas de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt).

NITROPRUSIATO SÓDICO			
Parámetro	Sham	Ang II	Ang II Axt
E_{max} (%)	$98,3 \pm 1,9$	$101,0 \pm 2,6$	$100,6 \pm 2,3$
pD_2	$7,6 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$

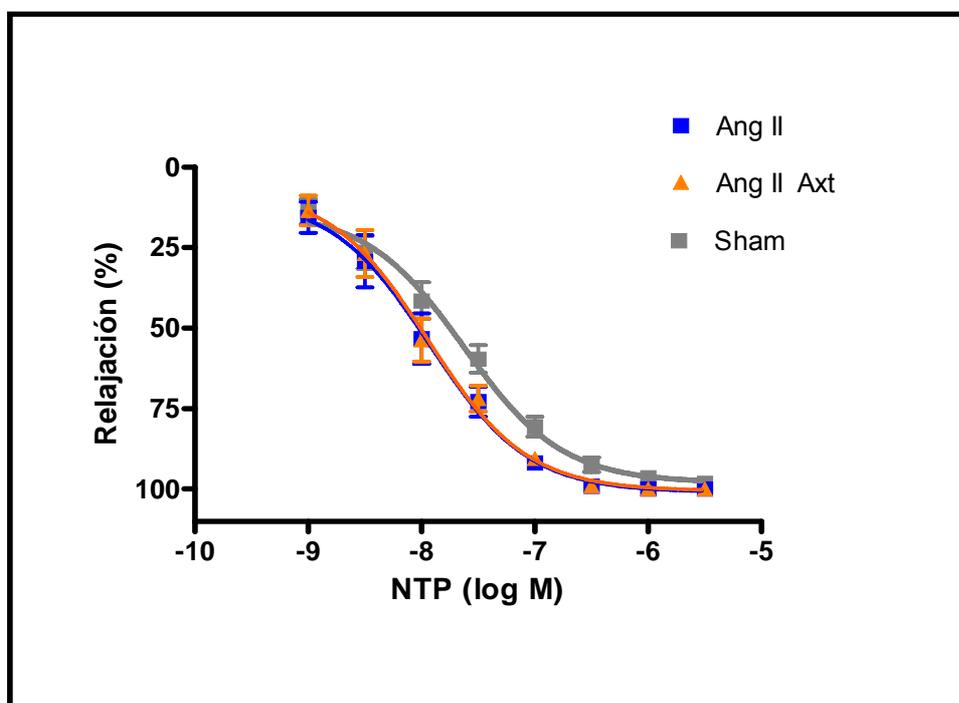


Figura 35.- Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (1×10^{-9} - 3×10^{-6} M) en aortas, precontraídas con fenilefrina (1×10^{-7} M), de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt).

- Respuestas a agentes contracturantes

La infusión de Ang II no se asoció a un incremento de la respuesta a NA en comparación con el grupo Sham, mientras que el tratamiento concomitante con astaxantina dio lugar a respuestas significativamente menores en el grupo Ang II Axt (Figura 36). Los valores de pD_2 y E_{max} confirman este comportamiento como se puede ver en la tabla 16.

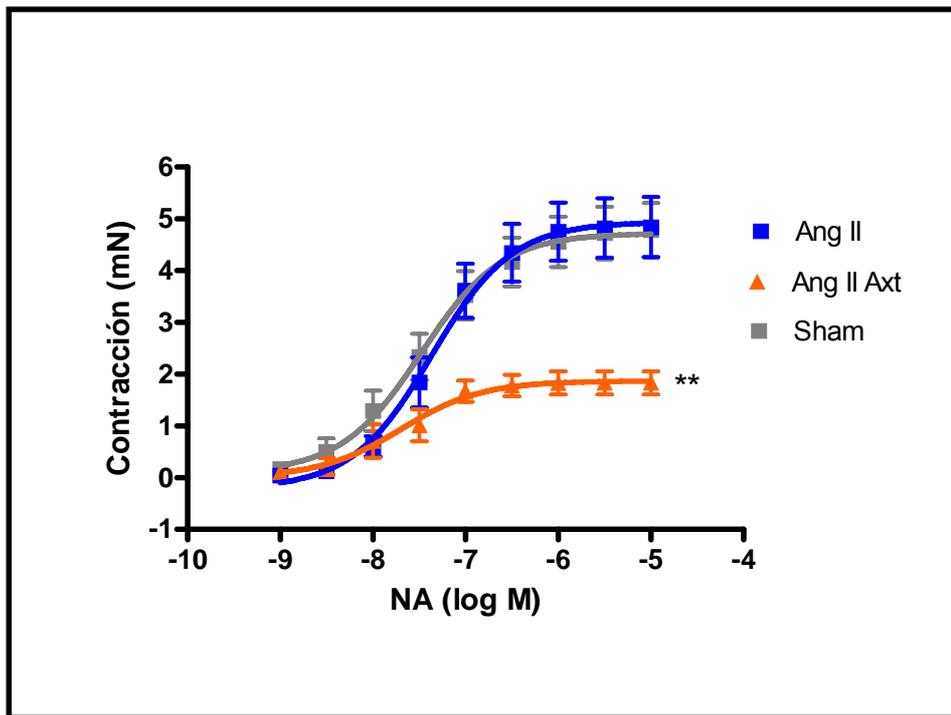


Figura 36.- Curvas concentración-respuesta a noradrenalina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M), en aortas de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). ** $p < 0,01$ frente a los grupos Sham y Ang II.

Tabla 16.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a noradrenalina (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en aortas de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). ** $p < 0,01$ frente a los grupos Sham y Ang II.

NORADRENALINA			
Parámetro	Sham	Ang II	Ang II Axt
E_{\max} (%)	$4,7 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1^{**}$
pD_2	$7,5 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,2^{**}$

La magnitud de la respuesta a Ang II fue muy pequeña en todos los casos, como se muestra en la figura 37. En este caso la respuesta, aunque diferente desde el punto de vista de los valores medios encontrados, las comparaciones no alcanzaron significancia estadística.

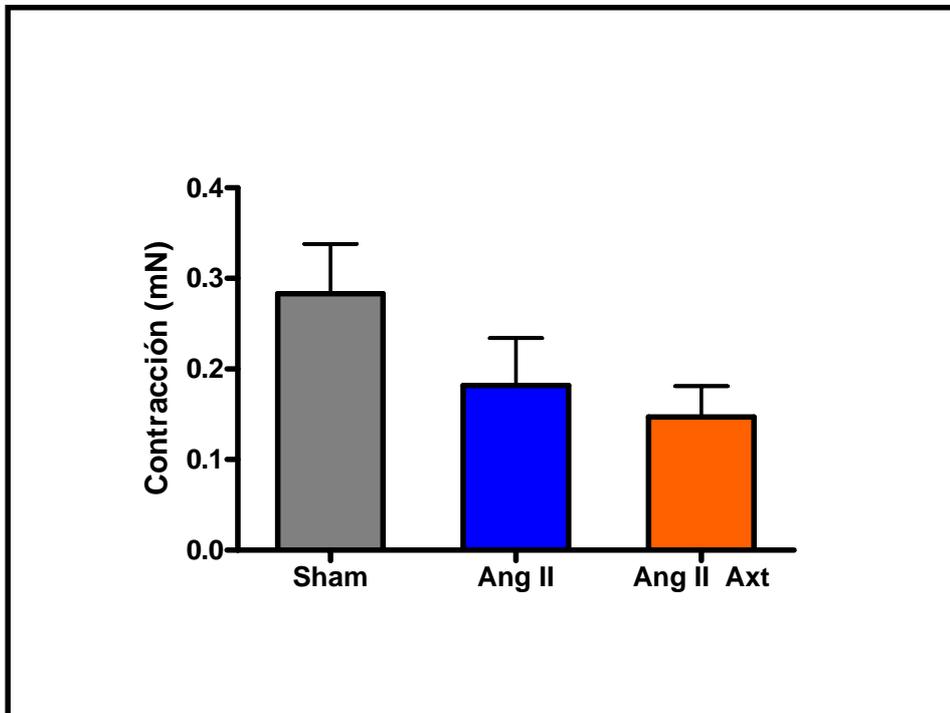


Figura 37.- Respuesta contracturante a dosis única de angiotensina II (1×10^{-7} M) en aortas de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt).

2.2. Estudios de funcionalidad: riñón

Metodología

La metodología es semejante a la descrita para el riñón perfundido en el modelo de ratas SHR, con la diferencia de que se utiliza un catéter más pequeño ($\varnothing = 0,61$ mm) y el flujo de perfusión es de 1 ml/min (Figura 19).

Las curvas concentración-respuesta a ACh (1×10^{-8} - 1×10^{-4} M) se realizaron previa contracción con FE (1×10^{-6} M). Además se realizaron curvas concentración-respuesta a FE (1×10^{-7} - 1×10^{-5} M). Los detalles de las sustancias utilizadas se pueden consultar en el anexo 1.

Resultados

La presión de perfusión basal, la respuesta a KCl y la respuesta a FE se expresan en mmHg. La relajación provocada por ACh se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE 1×10^{-6} M. En cada serie de experimentos, los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 6 experimentos. El análisis estadístico se realizó como se describe en los apartados 2 y 3 del anexo 2.

Inicialmente, debe mencionarse que no existió diferencia significativa en la presión de perfusión basal y en la respuesta a KCl (40 mM) entre los tres grupos experimentales: la primera fue de $61,0 \pm 4,6$ mmHg, $62,0 \pm 8,4$ mmHg y $74,1 \pm 9,2$ mmHg para los grupos Sham, Ang II y Ang II Axt respectivamente; mientras que las respuestas a KCl (40 mM) en el mismo orden fueron de $80,2 \pm 10,9$ mmHg, $54,4 \pm 4,2$ mmHg y $61,0 \pm 8,3$ mmHg.

En la figura 38 se presentan las curvas concentración-respuesta a ACh en riñón. Tanto las respuestas máximas como los valores de pD_2 sugieren un comportamiento diferenciado entre los tres grupos, con un desplazamiento a la izquierda de las curvas correspondientes al grupo Ang II Axt y del grupo Sham respecto al grupo Ang II. La mayor respuesta máxima observada correspondió al grupo donde se administró astaxantina (Tabla 17).

La respuesta contracturante a FE del lecho vascular renal en los tres grupos experimentales fue muy similar. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de E_{max} y pD_2 (Tabla 18 y figura 39).

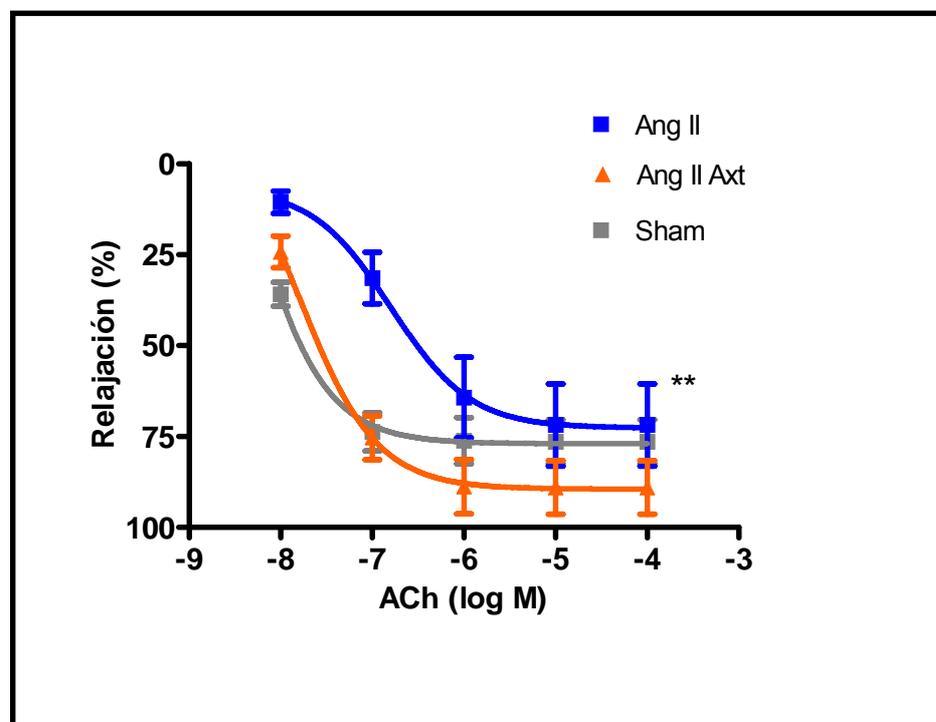


Figura 38.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 1×10^{-4} M) en riñón perfundido y precontraído con FE (10^{-6} M) de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). ** $p < 0,01$ frente a los grupos Sham y Ang II Axt.

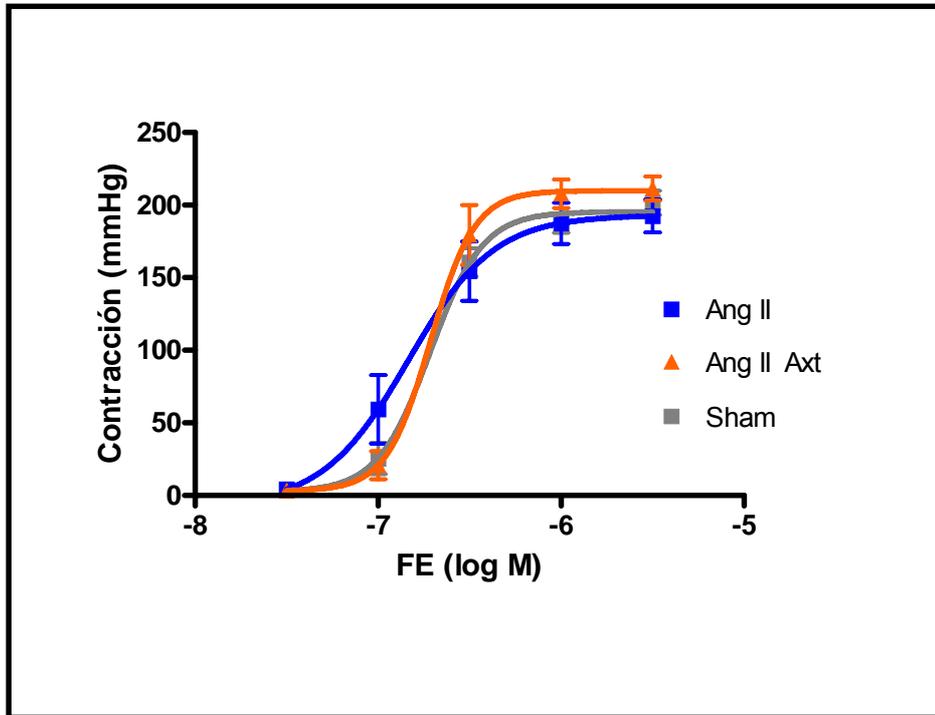


Figura 39.- Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (1×10^{-7} - 1×10^{-5} M) en riñón perfundido de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt).

Tabla 17.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M) en riñón de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). ** $p < 0,01$ frente a las curvas de los grupos Sham y Ang II Axt.

ACETILCOLINA			
Parámetro	Sham	Ang II	Ang II Axt
E_{\max} (%)	$77,0 \pm 3,2$	$71,5 \pm 6,2^{**}$	$89,6 \pm 3,9$
pD_2	$8,7 \pm 3,7$	$7,1 \pm 0,4^{**}$	$7,8 \pm 0,5$

Tabla 18.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a fenilefrina (1×10^{-7} - 1×10^{-5} M) en riñón de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt).

FENILEFRINA			
Parámetro	Sham	Ang II	Ang II Axt
E_{\max} (%)	$195,4 \pm 6,0$	$193,0 \pm 12,8$	$209,9 \pm 8,3$
pD_2	$6,2 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$

3. Hipertrofia cardiaca e hipertrofia renal

Metodología

Una vez que se sacrifican los animales se extrae el corazón, se coloca inmediatamente en solución Krebs a 37 °C, aireada con carbógeno. Se eliminan cuidadosamente los restos de tejido graso y se separan las aurículas. Los ventrículos se secan cuidadosamente para eliminar el exceso de líquido y se pesan. La relación entre el peso de los ventrículos y el peso corporal se utilizó como índice de hipertrofia cardiaca (HV). El riñón derecho también se extrae, se limpia, se seca y se pesa. La relación entre el peso del riñón derecho y el peso corporal se utilizó como índice de hipertrofia renal (HR).

Resultados

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 5 experimentos. Los análisis estadísticos se realizaron como se menciona en el apartado 2 del anexo 2.

En la figura 40 puede observarse que la administración continua de Ang II produjo un incremento altamente significativo del índice de hipertrofia cardiaca. El tratamiento con astaxantina durante los 14 días del estudio impidió el desarrollo de la hipertrofia puesto que el valor de HV es similar al del grupo Sham.

La HR no se modificó por la administración de Ang II. En tanto que la administración de astaxantina redujo este índice de forma significativa. Los valores de HR para los grupos Sham, Ang II y Ang II Axt fueron respectivamente: $7,7 \pm 0,2$; $7,7 \pm 0,2$ y $6,6 \pm 0,3$ mg/g.

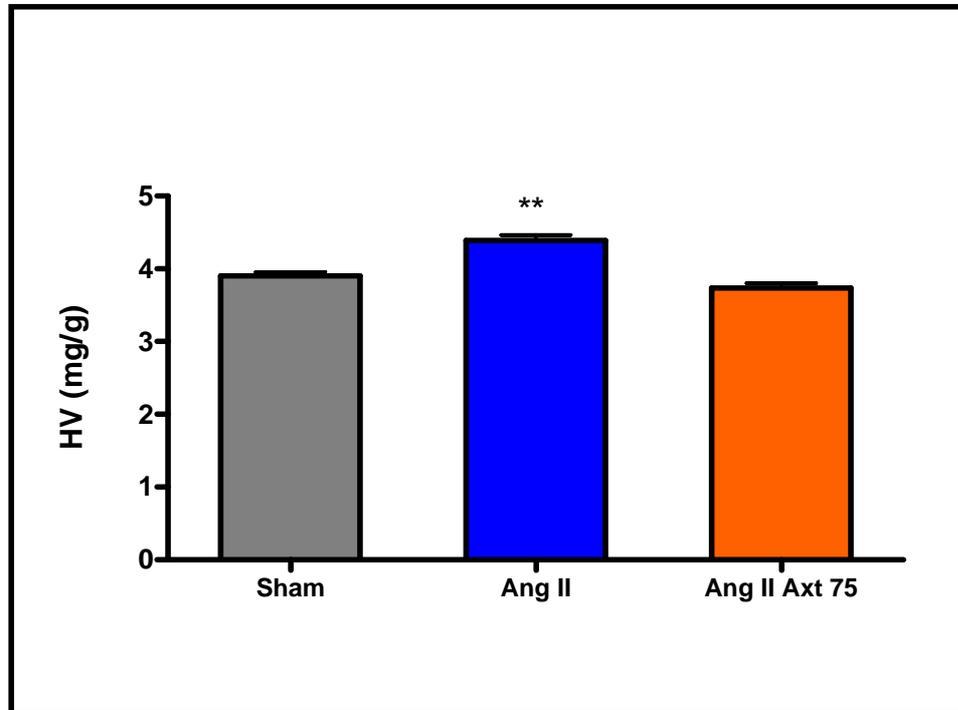


Figura 40.- Índice de hipertrofia cardiaca (HV) en ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). ** $p < 0,01$ frente a los grupos Sham y Ang II Axt.

4. Determinación de colágeno

Metodología

Estos ensayos se han llevado a cabo en corazón. El protocolo fue diseñado para pulmón¹⁸⁸ y posteriormente optimizado para hígado por Fort y col.¹⁸⁹. El método cuantifica la hidroxiprolina (OH-Pro), un aminoácido que forma parte del colágeno. Se basa en que la OH-Pro es oxidada por la cloramina T formando un compuesto que se convierte en cromóforo al reaccionar con el reactivo de Ehrlich. Este método consta de dos etapas:

1. Homogeneización del tejido e hidrólisis ácida.

El tejido se homogeneiza en agua destilada (10% p/v). Una alícuota de este homogeneizado se diluye con HCl 12 N (1:1) y se hidroliza durante 24 horas a una temperatura constante de 115 °C. A continuación se filtra mediante un filtro Millipore de 0,45 µm.

2. Formación del cromóforo.

Se toma por duplicado una muestra del filtrado (100 µl) y se añade NaOH 6 N e isopropanol al 50%. Posteriormente se adiciona cloramina T 23,24 mM y 5 minutos después se añade el reactivo Erlich 1,66 M. La mezcla obtenida se incuba durante 30 minutos a 60 °C y finalmente se lee la absorbancia a 560 nm. La concentración de OH-Pro en cada muestra se determinó a partir de una recta patrón elaborada con concentraciones conocidas de OH-Pro entre 1,25 y 100 µg/l.

A partir de una alícuota de cada homogeneizado se determinaron las proteínas por el método de Bradford utilizando un reactivo comercial (Bio-Rad, Alemania).

Resultados

Los resultados se expresan en μg de OH-Pro/mg de proteína y aparecen como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 5 experimentos. Los análisis estadísticos realizados se describen en el apartado 2 del anexo 2.

Los resultados revelan que la infusión de Ang II en la dosis suministrada es capaz de producir fibrosis cardiaca. Como se puede ver en la figura 41, se produjo un incremento en la concentración de OH-Pro en el grupo Ang II, este incremento fue estadísticamente significativo con respecto al grupo Sham. En el caso del grupo experimental Ang II Axt se observó un valor intermedio entre el grupo Ang II y el grupo Sham, sin mostrar diferencias significativas frente a ninguno por lo que podríamos decir que la astaxantina previene sólo en parte el desarrollo de la fibrosis provocada por la administración de Ang II.

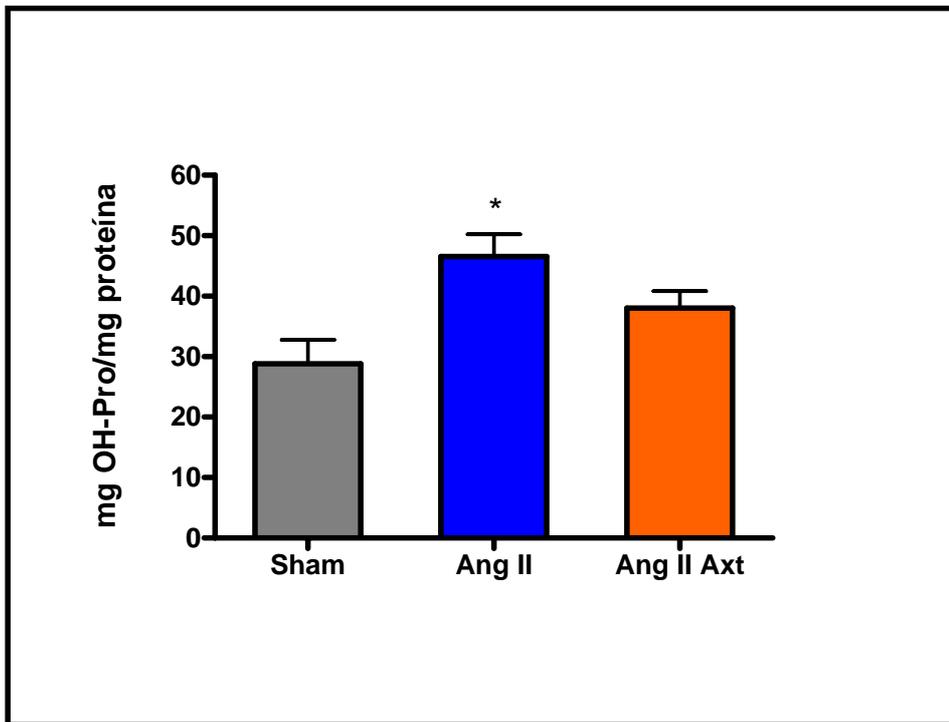


Figura 41.- Concentraciones de hidroxiprolina (OH-Pro) en corazones de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). * $p < 0,05$ frente al grupo Sham.

5. Producción de anión superóxido

Metodología

Como se describió en el apartado 5.1 de los métodos y resultados para el modelo con ratas SHR, la determinación de $\bullet\text{O}_2^-$ en vasos se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando lucigenina. Se valoró tanto la producción basal como la estimulada con NADPH. Para la realización de estos estudios se utilizó la arteria aorta de una parte de los animales de cada grupo experimental. Inmediatamente después del sacrificio la aorta se extrae, se limpia, se corta en dos secciones y se mantienen en Krebs HEPES frío. En una mitad se determina la producción basal y en otra la estimulada.

Resultados

La producción de $\bullet\text{O}_2^-$ se expresa como URL/min/mg de tejido. Los resultados se expresaron como media aritmética \pm EEM de un mínimo de 5 experimentos. Los análisis estadísticos se realizaron como se describe en el apartado 2 del anexo 2.

La producción basal de $\bullet\text{O}_2^-$ no fue estadísticamente diferente entre los tres grupos experimentales, al igual que sucedió en el modelo de ratas SHR. La producción estimulada de $\bullet\text{O}_2^-$ mediante la adición de NADPH se incremento de 6 a 10 veces respecto a la producción basal (Figura 42). En este caso las diferencias en la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ se hicieron patentes entre los grupos experimentales. El grupo Ang II mostró la mayor producción de $\bullet\text{O}_2^-$ en tanto que los grupos Sham y Ang II Axt mostraron valores menores.

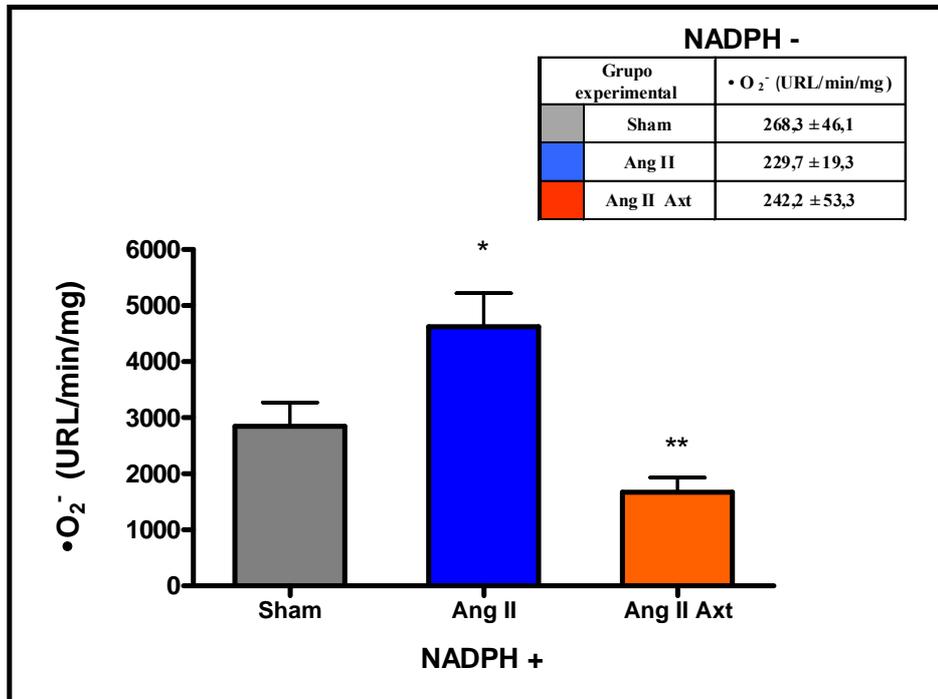


Figura 42.- Producción de $\bullet\text{O}_2^-$ en aorta de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). Producción basal (NADPH -) y producción estimulada (NADPH +). * $p < 0,05$ frente al grupo Sham y ** $p < 0,01$ frente al grupo Ang II.

6. Peroxidación lipídica

Metodología

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 la peroxidación lipídica se puede llevar a cabo por la medida de los aldehídos reactivos formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos. El malondialdehído (MDA) es el aldehído más importante obtenido en dicha degradación. El método del TBARS 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 dando un producto coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente.

Con el fin de determinar si el tratamiento con astaxantina modifica el grado de peroxidación lipídica en este modelo de hipertensión, determinamos la producción de MDA en plasma e hígado.

La concentración **plasmática** de MDA se determinó siguiendo el método de Draper y col.¹⁹⁰. El procedimiento seguido consiste en mezclar 500 µl de plasma con 500 µl de suero fisiológico. A continuación se añade una solución que contiene ácido tricloroacético al 15%, ácido tiobarbitúrico al 0,37% y ácido clorhídrico 0,25 N. Después de incubar 30 minutos a 90 °C, se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 25 minutos y se recoge el sobrenadante para, finalmente, leer la absorbancia a 535 nm. El MDA se usa como patrón. Para calcular la concentración plasmática de MDA se utiliza su coeficiente de extinción molar ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

Los niveles de MDA en **hígado** se midieron por un método basado en el ensayo descrito por Ohkawa y col.¹⁹¹ Las muestras de hígado se homogeneizan en KCl 1,15% (1:6 p/v) y se centrifugan durante 10 minutos a 4000 r.p.m.; 100 µl del sobrenadante obtenido se añaden a la mezcla de

reacción que contiene: dodecilsulfato de sodio 8,1%; ácido acético 20%; ácido tiobarbitúrico y H₂O. Después de incubar 1 hora a 95 °C, se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Finalmente leemos la absorbancia a 532 nm. La concentración de MDA se determinó a partir de una curva patrón construida con 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

Resultados

La concentración de MDA a nivel plasmático se expresa en nmol/ml de plasma mientras que en hígado se expresa como nmol/g hígado. Todos los resultados se expresan como media aritmética \pm EEM de un mínimo de 5 experimentos. El análisis estadístico se realizó como se especifica en el apartado 2 de anexo 2.

Como se puede observar, la infusión de Ang II apenas incrementó los niveles plasmáticos de MDA. Cuando los ratones fueron tratados con astaxantina se produjo una reducción significativa de dichos niveles (Figura 43).

Resultados similares se pueden observar en el hígado, no se detectaron incrementos en los valores de MDA en los ratones tratados con Ang II, sin embargo, los niveles disminuyeron significativamente cuando los animales recibieron también astaxantina (Figura 43).

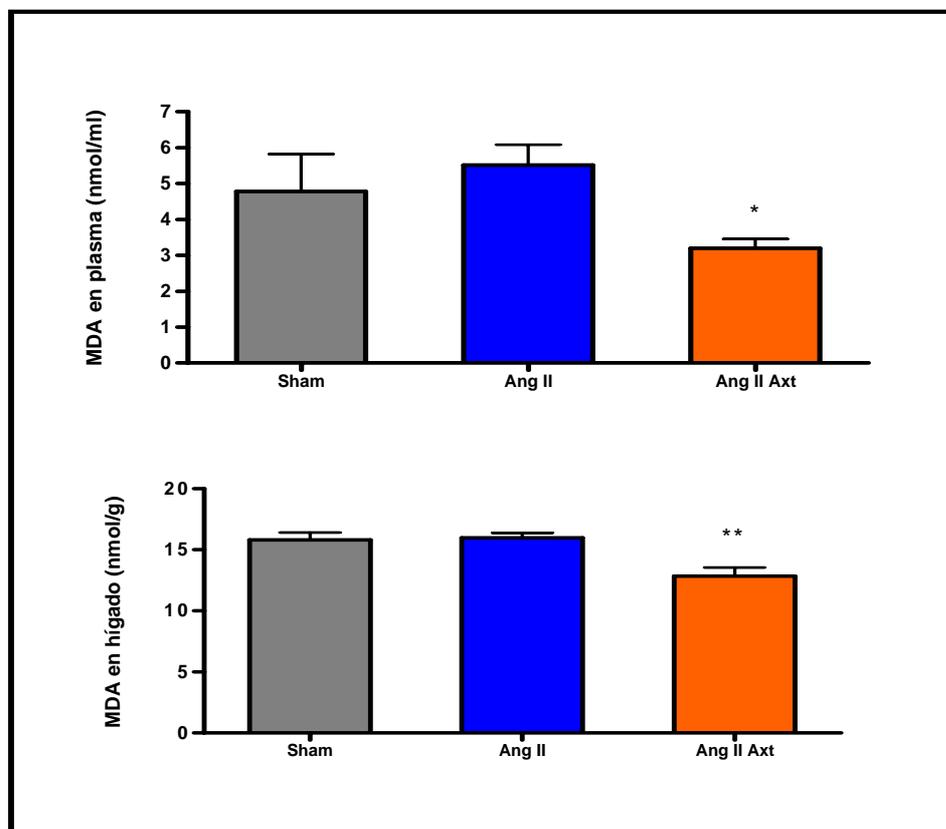


Figura 43.- Concentración de MDA en plasma y en hígado de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). * $p < 0,05$ frente al grupo Ang II y ** $p < 0,01$ frente al grupo Sham.

7. Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes

Metodología

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

Tras perfundir el animal con suero fisiológico 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, pH 7,5) al que se añade EDTA (1 mM). Una parte se congela como tal para posteriormente determinar la actividad enzimática de la CAT y el resto se centrifuga a 12000 r.p.m. El sobrenadante obtenido se congela a -80 °C para la determinación de la actividad de SOD y GPx.

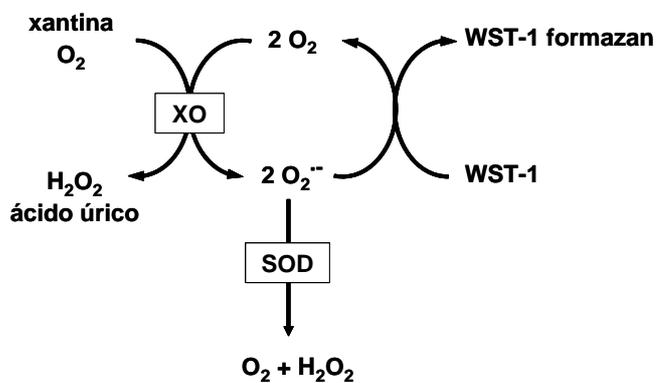
Se determina la cantidad de proteínas de las muestras, para expresar la actividad de las enzimas por mg de proteína.

- Actividad de la Superóxido Dismutasa

La SOD es una de las enzimas más importantes del sistema de defensa antioxidante del organismo, y constituye la primera defensa frente a los radicales libres, encargándose de la dismutación del $\bullet\text{O}_2^-$ a H_2O_2 y O_2 , eliminando así uno de los principales radicales libres.

La actividad de la SOD se determinó utilizando un preparado comercial (SOD determination Kit, Fluka, España). En el método desarrollado recientemente por Peskin¹⁹², se emplea XO para formar radicales $\bullet\text{O}_2^-$, que pueden desaparecer por acción de la SOD o reaccionar con la sal de

tetrazolio soluble (WST-1) dando lugar a un compuesto coloreado también soluble (WST-1 formazan), según muestra el siguiente esquema:



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 cuantifican los niveles de $\bullet O_2^-$ inherentes a la muestra y con el blanco 3 se cuantifica la actividad residual de los reactivos. Los reactivos y los volúmenes utilizados en cada caso aparecen en la siguiente tabla:

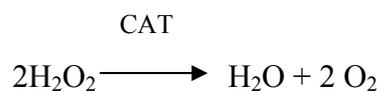
	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Muestra	20 µl	-----	20 µl	-----
Agua bidestilada	-----	20 µl	-----	20 µl
WST-1	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
XO	20 µl	20 µl	-----	-----
Tampón	-----	-----	20 µl	20 µl

La placa se incubó durante 20 minutos a 37 °C y posteriormente se mide la absorbancia a 450 nm. Se determina la inhibición de la formación del compuesto coloreado (WST-1 formazán) utilizando la siguiente ecuación.

$$[[(\text{Blanco 1}-\text{Blanco 3}) - \text{Muestra} - \text{Blanco 2}]/ (\text{Blanco 1}- \text{Blanco 3})] \times 100$$

- Actividad de la Catalasa

Esta enzima cataliza la descomposición de H₂O₂ en H₂O y O₂. El H₂O₂ se forma principalmente como producto de la dismutación del •O₂⁻ por la SOD. La eliminación del H₂O₂ del interior de la célula mejora la protección frente al daño oxidativo. El esquema de reacción es el siguiente:



La actividad de la CAT se determinó utilizando un preparado comercial (Catalase Assay Kit, Sigma, España), basado en el método descrito por Aebi¹⁹³. Este método consiste en el seguimiento espectrofotométrico a 240 nm durante 30 segundos de la desaparición de H₂O₂ (50 mM) a 25 °C y pH 7. Para ello se mezcla una alícuota de 5 µl de muestra con 195 µl de la solución tampón incluida en el preparado y con 200 µl de una solución que contiene H₂O₂.

Una unidad enzimática de CAT puede transformar 1 µM de H₂O₂ a H₂O y O₂ por minuto a pH 7 y 25 °C con una concentración de sustrato de 10 mM.

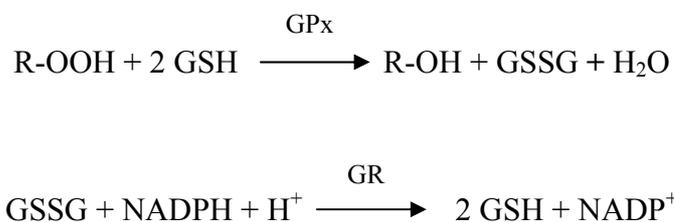
- Actividad de la Glutación Peroxidasa

La GPx cataliza la detoxificación de hidroperóxidos de distintas procedencias. Transforma tanto H₂O₂ como peróxidos orgánicos (R-OOH) en sus correspondientes alcoholes estables y en agua consumiendo GSH. Esta reacción juega un papel crucial en la protección de las células frente al daño por radicales libres formados por la descomposición de hidroperóxidos.

Se han encontrado al menos 5 isoenzimas de GPx en mamíferos. Cada una tiene diferentes afinidades según el tipo de peróxido que elimine pero la diferencia más notable es que la isoforma GPx-5 es independiente de selenio y no reacciona con H₂O₂ lo que permite su determinación aislada del resto de GPx al utilizar hidroperóxido de cumeno como activador de la reacción.

La actividad de la GPx no selenio dependiente se determinó mediante un método indirecto basado en el propuesto por Lawrence y col.¹⁹⁴. La reacción que cataliza esta enzima produce la oxidación de GSH a GSSG. Esta reacción está acoplada a la recuperación de GSH por la enzima 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 GPx no selenio dependiente. Las reacciones descritas se muestran en el esquema siguiente:



Una alícuota de 25 μl de muestra se mezcla en una cubeta con hidroperóxido de cumeno (1,5 mM) y con una solución compuesta por tampón fosfato sódico (50 mM), EDTA-Na (1 mM), azida sódica (1 mM), GR (1 UI), NADPH (0,2 mM) y GSH (1 mM) y se realiza el seguimiento de la desaparición del NADPH.

Una unidad enzimática de GPx se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de NADPH por minuto.

Resultados

La actividad de SOD se expresa como % de inhibición de la formación del compuesto coloreado. La actividad de la CAT y GPx, se expresa en U/mg proteína. Todos los resultados se expresan como media aritmética \pm EEM de un mínimo de 5 experimentos. El análisis estadístico se realizó como se menciona en el apartado 2 del anexo 2.

La actividad de SOD más baja se presentó en el grupo Ang II, mejorando significativamente en el grupo Ang II Axt ya que se obtuvieron valores similares a los del grupo Sham (Figura 44).

Los valores de la actividad CAT entre los grupos Sham y Ang II fueron muy similares y no presentaron diferencia estadísticamente significativa,

mientras que el grupo Ang II Axt presentó la menor actividad de la CAT (Figura 44).

En el caso de la actividad GPx, el grupo Ang II Axt mostró la mayor actividad seguido del grupo Sham, mientras que la menor actividad de la GPx correspondió al grupo Ang II (Figura 44).

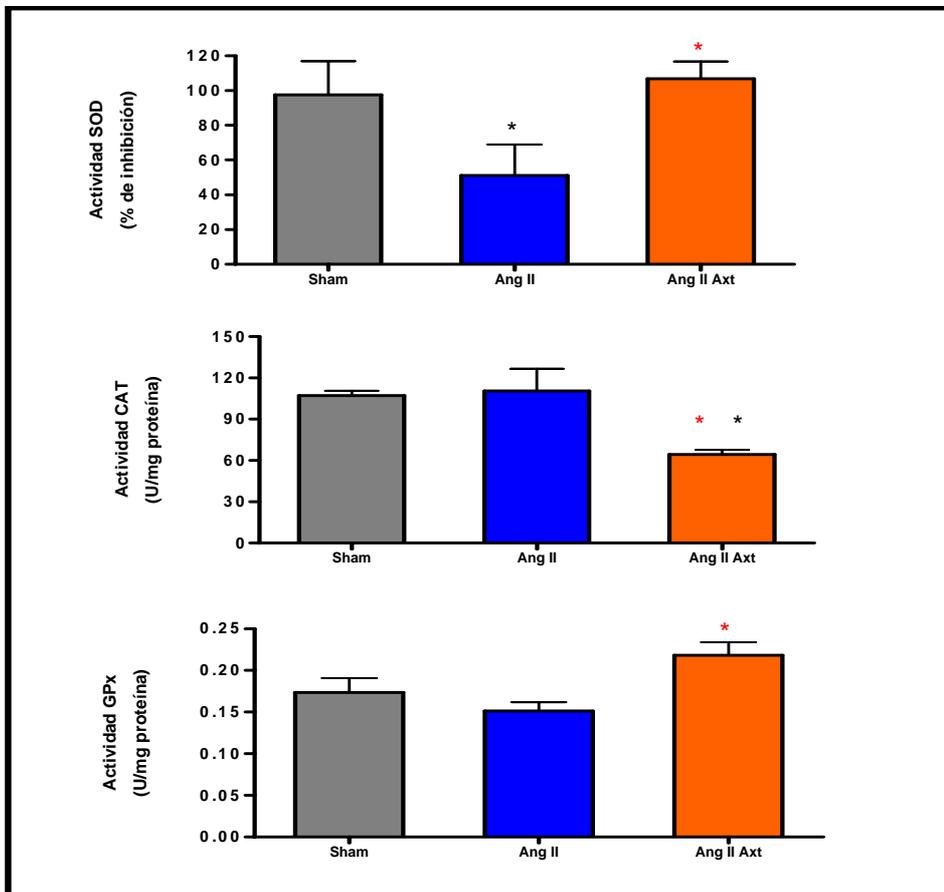


Figura 44.- Actividad de la superóxido dismutasa (SOD), de la catalasa (CAT) y de la glutatión peroxidasa (GPx) en hígado de ratones Swiss Albino-CD1 (Sham), Swiss Albino-CD1 con infusión de angiotensina II sin tratamiento (Ang II) y tratados con astaxantina 75 mg/kg/día (Ang II Axt). * $p < 0,05$ frente al grupo Sham y * $p < 0,05$ frente al grupo Ang II.

MODELO 3. RATONES *Vav3*^{-/-}

Se utilizaron animales de 10 semanas de edad *Vav3* deficientes o *Vav3*^{-/-} (knockout), provenientes de la Unidad de generación de organismos modificados genéticamente-SEA de la USAL, proporcionados por el Dr. Bustelo del Centro de Investigación del Cáncer. Los animales se dividieron en dos grupos.

***Vav3*^{-/-}**: ratones deficientes en *Vav3* que constituyen el grupo control con HTA.

***Vav3*^{-/-}Axt**: ratones deficientes en *Vav3* tratados con astaxantina suministrada en la dieta a una dosis de 100 mg/kg/día.

En este caso, el tratamiento se mantuvo durante 8 semanas. En este periodo, el alimento y el agua consumidos se midieron cada tres días. Semanalmente se midió la PAS y se pesaron los animales con el fin de ajustar la astaxantina en el alimento.

1. Presión arterial sistólica

Metodología

Al igual que en los dos modelos anteriores, la PAS se midió en la arteria caudal, mediante un método incruento, con un equipo NIPREM 645 (Cibertec S.A. España). Los detalles de este método también se muestran en la sección correspondiente a la determinación de presión arterial sistólica del modelo 1.

Al igual que en el modelo anterior, también se midió la PA para calcular la PAM por un método cruento como se refiere en la sección 1 del modelo de HTA inducida por Ang II.

Resultados

Tanto los resultados de la PAS como de la PAM, se expresan en mmHg como media aritmética \pm EEM de un mínimo de 10 experimentos. Los análisis estadísticos se realizaron como se menciona en el apartado 1 del anexo 2.

Los valores de PAS y de peso corporal durante el estudio se muestran en la tabla 19, donde se puede apreciar que los valores de PAS al inicio del experimento corresponden a los valores esperados ya que los ratones del grupo $Vav3^{-/-}$ y $Vav3^{-/-}$ Axt estuvieron por encima de los 145 mmHg. Conforme avanzó el tratamiento con astaxantina y, de manera evidente, a partir de la de la segunda semana los valores de PAS del grupo experimental $Vav3^{-/-}$ Axt empiezan a disminuir separándose del grupo $Vav3^{-/-}$ hasta que al final del estudio la presión se reduce en unos 25 mmHg frente a los valores iniciales, dando lugar a diferencias significativas respecto al grupo $Vav3^{-/-}$ (Figura 45).

Estas diferencias también se observaron cuando la PAM se determinó, en animales anestesiados, en la arteria carótida (Figura 45).

Los datos correspondientes al peso corporal de los grupos $Vav3^{-/-}$ y $Vav3^{-/-}$ Axt, que también se presenta en la tabla 19, no muestran diferencias ni al inicio ni al final del tratamiento.

Tabla 19.- Valores de presión arterial sistólica (PAS) y peso en ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-}Axt).
** $p < 0,01$ frente al grupo *Vav3*^{-/-}.

Parámetro		Inicio del estudio	Fin del estudio
PAS (mmHg)	<i>Vav3</i> ^{-/-}	146 ± 1	145 ± 0,7
	<i>Vav3</i> ^{-/-} Axt	149 ± 2	123 ± 0,4**
Peso corporal (g)	<i>Vav3</i> ^{-/-}	24 ± 2	27 ± 1
	<i>Vav3</i> ^{-/-} Axt	24 ± 2	27 ± 2

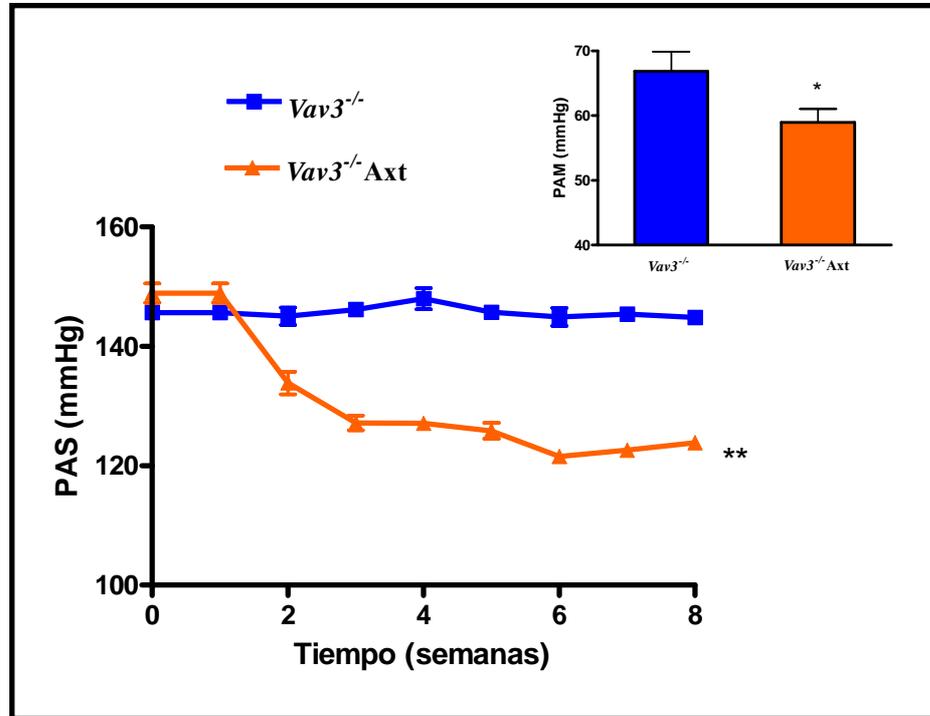


Figura 45.- Presión arterial sistólica (PAS) en ratones conscientes y presión arterial media (PAM) en ratones anestesiados *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-}Axt). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente al grupo a *Vav3*^{-/-}.

2. Estudios *in vitro*

De manera similar a los otros dos modelos experimentales, después de finalizar las ocho semanas de estudio, los ratones se anestesiaron con uretano (1,5 g/kg, i.p). Posteriormente se realiza una laparotomía y se procede a la extracción de aorta y riñón para estudios de funcionalidad, corazón y glándulas suprarrenales (GSR) para determinar índices de hipertrofia.

2.1 Estudios de funcionalidad: aorta

Metodología

Para los estudios de funcionalidad en aorta se utilizó un miógrafo de cuatro canales, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en las aortas del modelo de infusión de Ang II.

- Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes y contracturantes

Previa contracción de los anillos con FE (1×10^{-7} M) y una vez alcanzada una meseta de contracción estable, se realizaron curvas acumulativas concentración-respuesta de los siguientes agentes relajantes: ACh (1×10^{-8} - 3×10^{-4} M) y NTP (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M).

En otros anillos se realizaron curvas concentración-respuesta a noradrenalina (NA, 1×10^{-9} - 1×10^{-5} M).

Además se obtuvieron respuestas a dosis única de Ang II (1×10^{-7} M) en diversos anillos de cada grupo experimental. Las sustancias utilizadas se detallan en el anexo 1.

Resultados

El efecto provocado por ACh y NTP se expresa como % de relajación frente a la respuesta máxima contráctil obtenida con FE y las respuestas contracturantes de NA y Ang II se expresan en mN. En cada serie de experimentos, los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 7 experimentos. El análisis estadístico de los resultados se realizó como se describe en los apartados 1 y 3 del anexo 2.

- Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes

Las curvas concentración-respuesta a ACh fueron similares en los dos grupos experimentales de este modelo de hipertensión (Figura 46). La comparación de los parámetros que caracterizan la cinética de la curva concentración respuesta, E_{\max} y pD_2 , nos permite corroborar esta afirmación (Tabla 20).

En la figura 47 se presentan las curvas concentración-respuesta a NTP. En ambos grupos se producen respuestas relajantes próximas al 100%, no se observó cambio en las curvas concentración-respuesta del grupo tratado con astaxantina (Tabla 21).

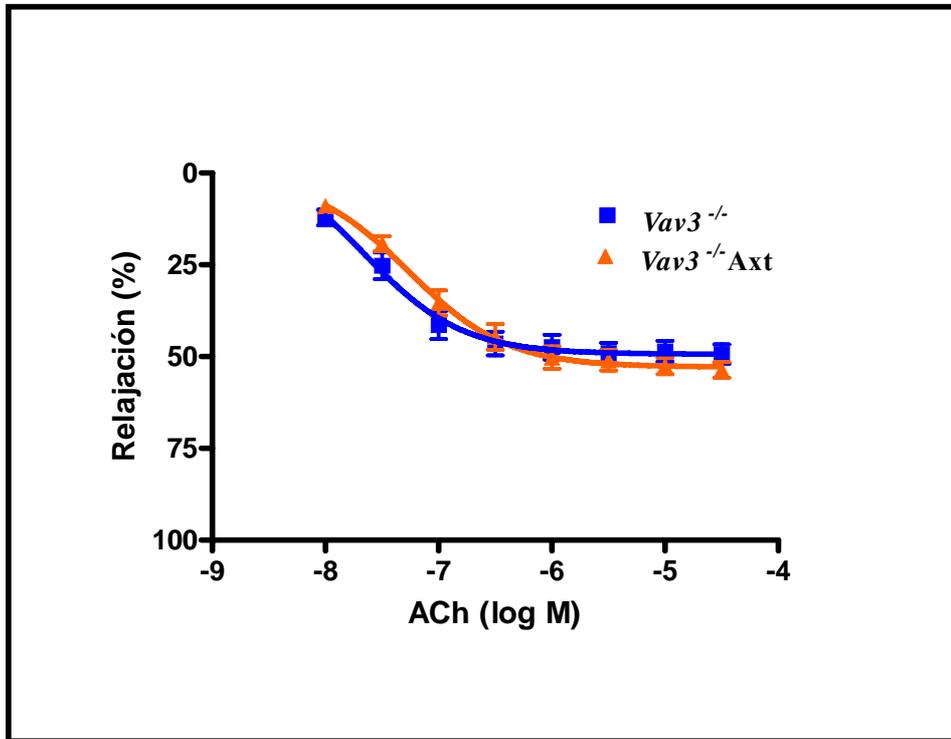


Figura 46.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-5} M) en aortas, precontraídas con fenilefrina (1×10^{-7} M), de ratones $Vav3$ deficientes ($Vav3^{-/-}$) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día ($Vav3^{-/-}$ Axt).

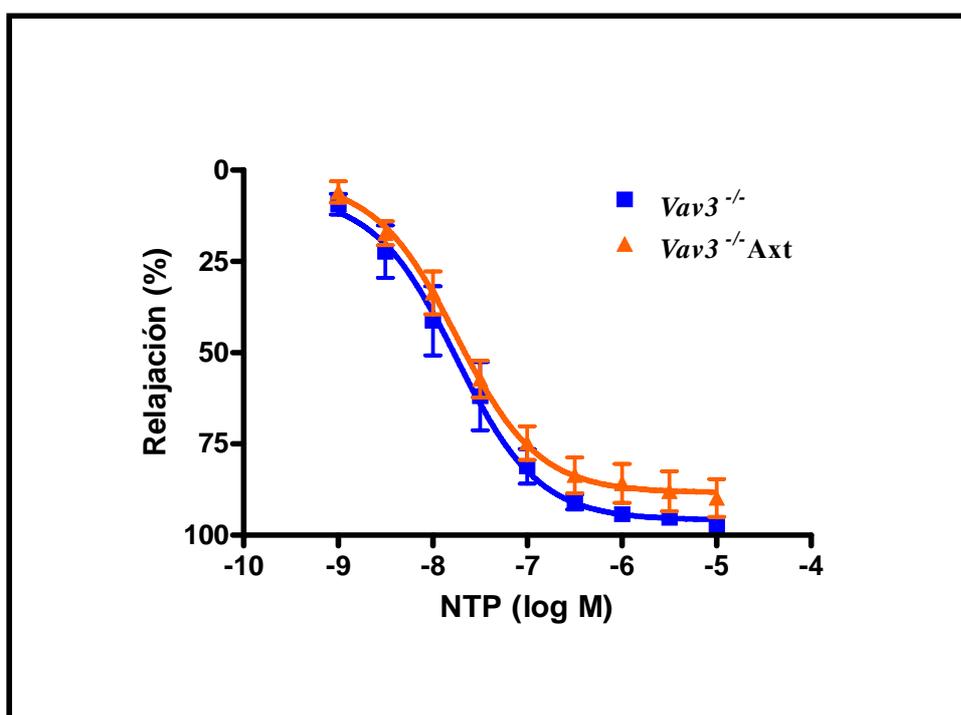


Figura 47.- Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M) en aortas, precontraídas con fenilefrina (1×10^{-7} M), de ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-}Axt).

Tabla 20.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-8} - 3×10^{-5} M) en aortas de ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-} Axt).

ACETILCOLINA		
Parámetro	<i>Vav3</i> ^{-/-}	<i>Vav3</i> ^{-/-} Axt
E _{max} (%)	49,4 ± 1,5	52,9 ± 1,4
pD ₂	7,7 ± 0,2	7,3 ± 0,1

Tabla 21.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (1×10^{-9} - 3×10^{-5} M) en aortas de ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-} Axt).

NITROPRUSIATO SÓDICO		
Parámetro	<i>Vav3</i> ^{-/-}	<i>Vav3</i> ^{-/-} Axt
E _{max} (%)	95,9 ± 2,7	88,4 ± 2,4
pD ₂	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1

- Respuesta a agentes contracturantes

El comportamiento de la respuesta contracturante a NA de los anillos de aorta de los dos grupos experimentales se presenta en la figura 48. Las curvas de los dos grupos fueron diferentes, siendo mayor la respuesta contracturante en el grupo $Vav3^{-/-}$ Axt. Estas diferencias se reflejan en los parámetros que definen la cinética de las curvas, ya que los valores de E_{max} y pD_2 fueron estadísticamente mayores para el grupo tratado con astaxantina (Tabla 22).

En lo que respecta a la respuesta a una dosis única de Ang II (1×10^{-7} M) hemos de decir que la respuesta contracturante fue muy pequeña y poco reproducible, de manera que aunque en el grupo tratado con astaxantina la contracción fue mayor, debido a esta variabilidad, las diferencias no fueron significativas ($0,06 \pm 0,01$ y $0,11 \pm 0,07$ para los grupos $Vav3^{-/-}$ y $Vav3^{-/-}$ Axt respectivamente).

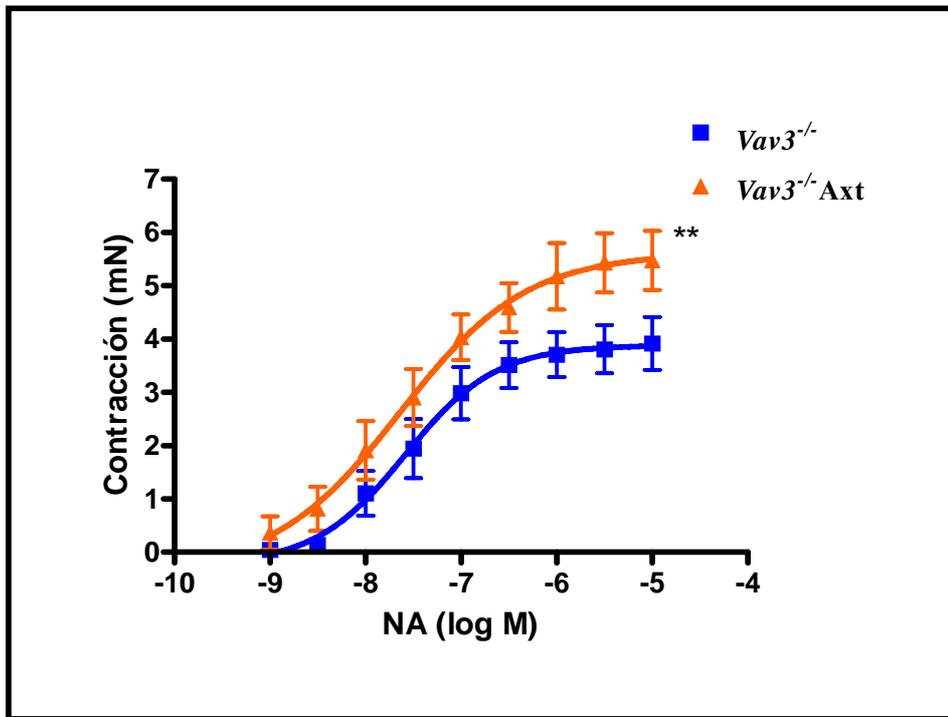


Figura 48.- Curvas concentración-respuesta a noradrenalina (1×10^{-9} - 3×10^{-5} M) en aortas de ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-} Axt). ** $p < 0,01$ frente al grupo *Vav3*^{-/-}.

Tabla 22.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a noradrenalina (1×10^{-9} - 3×10^{-5} M) en aortas de ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-}Axt). ** $p < 0,01$ frente al grupo *Vav3*^{-/-}.

NORADRENALINA		
Parámetro	<i>Vav3</i> ^{-/-}	<i>Vav3</i> ^{-/-} Axt
E _{max} (%)	3,9 ± 0,3	5,6 ± 0,5**
pD ₂	7,6 ± 0,2	7,6 ± 0,3**

2.2. Estudios de funcionalidad: riñón

Metodología

La metodología es semejante a la descrita para el riñón perfundido en el modelo 2.

Las curvas concentración-respuesta a ACh (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M) se realizaron previa contracción con FE (1×10^{-6} M). De la misma manera se hicieron las curvas concentración respuesta a NTP (1×10^{-8} - 1×10^{-4} M). Además se determinó la respuesta contracturante a dosis única de Ang II (1×10^{-7} M). Los detalles de las sustancias utilizadas se pueden consultar en el anexo 1.

Resultados

La presión de perfusión basal, la respuesta a KCl y a Ang II se expresan en mmHg. La relajación provocada por ACh y NTP se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE 1×10^{-6} M. En cada serie de experimentos, los resultados se expresan como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 6 experimentos. El análisis estadístico se realizó como se describe en los apartados 1 y 3 del anexo 2.

No se obtuvieron diferencias significativas en los valores de presión de perfusión basal entre ambos grupos ($79,2 \pm 8,9$ mmHg para el grupo *Vav3^{-/-}* y $82,6 \pm 5,5$ mmHg para el grupo *Vav3^{-/-}Axt*). Las respuestas a KCl (40 mM) fueron similares en ambos grupos: $87,9 \pm 14,2$ y $104,5 \pm 23,7$ mmHg.

En la figura 49 se presentan las curvas concentración-respuesta a ACh en riñón. La curva del grupo experimental $Vav3^{-/-}$ está desplazada a la derecha y hacia arriba respecto a la curva del grupo $Vav3^{-/-}$ Axt, lo que implica que la administración crónica de astaxantina mejoró la relajación endotelio dependiente en el lecho vascular renal. Debido a esto, los parámetros que definen la curva concentración-respuesta de cada grupo (E_{max} y pD_2) mostraron valores estadísticamente diferentes, como se muestra en la tabla 23.

En la figura 50 se muestran las curvas concentración-respuesta realizadas usando NTP. Como se puede ver en estas dos curvas no se encontró diferencia en la respuesta aunque al final muestran una tendencia a separarse, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Del mismo modo, no se observaron diferencias en los parámetros que definen cada curva (Tabla 24).

La respuesta de los dos grupos experimentales a una dosis única de Ang II (1×10^{-7} M), no mostró diferencia. Las respuestas de los grupos $Vav3^{-/-}$ y $Vav3^{-/-}$ Axt fueron respectivamente: $141,8 \pm 6,1$ y $146,2 \pm 4,7$ mmHg. La administración de astaxantina no produjo un cambio en la respuesta a Ang II en el lecho vascular renal.

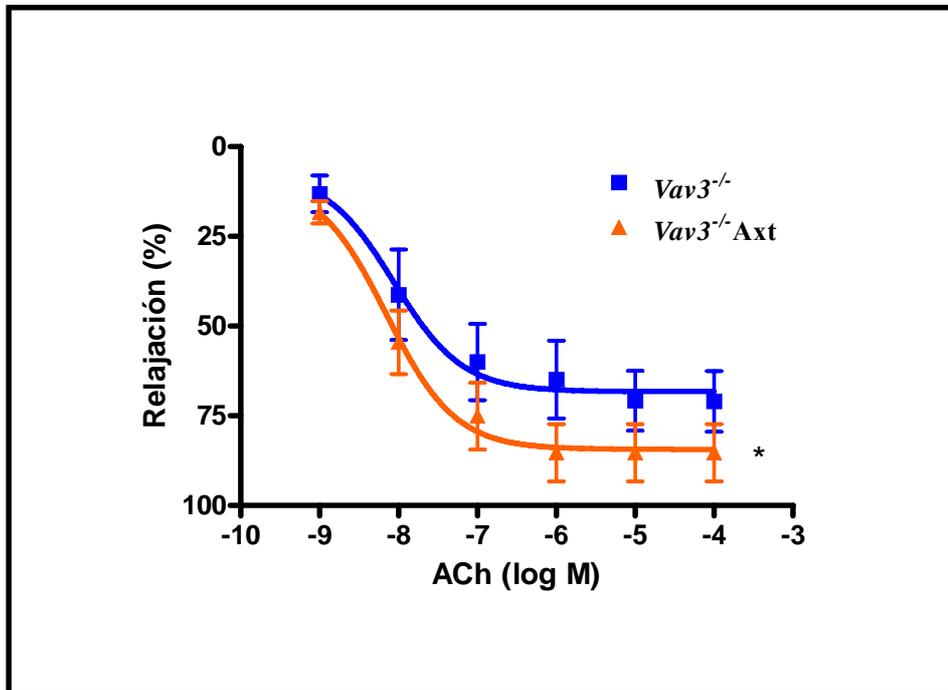


Figura 49.- Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M) en riñón, perfundido y precontraído con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratones $Vav3$ deficientes ($Vav3^{-/-}$) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día ($Vav3^{-/-}$ Axt). * $p < 0,05$ frente al grupo $Vav3^{-/-}$.

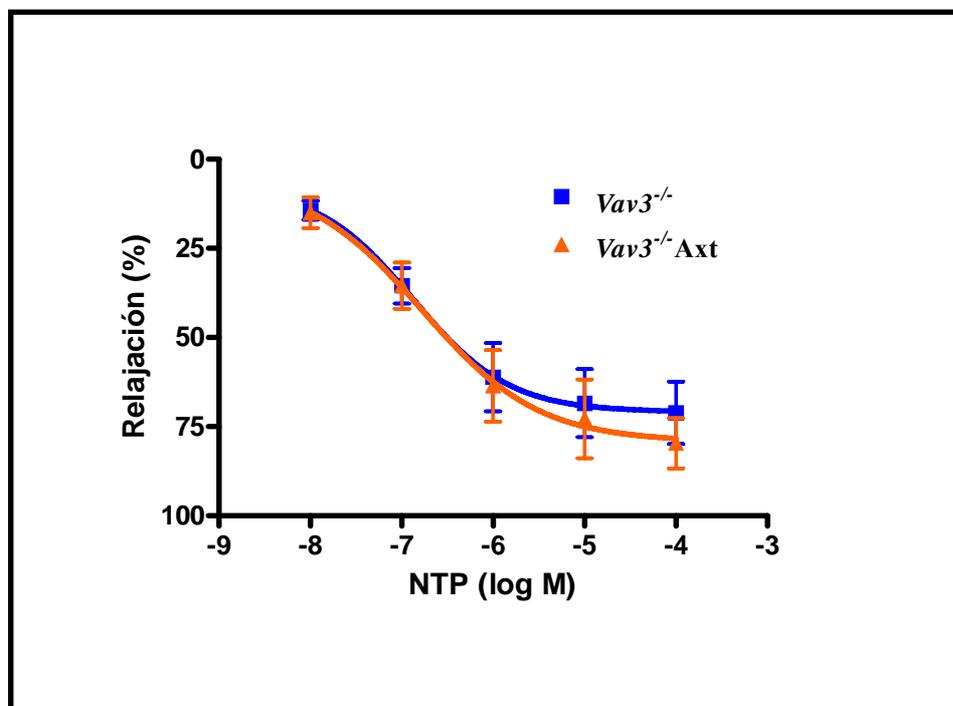


Figura 50.- Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (1×10^{-8} - 1×10^{-4} M) en riñón, perfundido y precontraído con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-} Axt).

Tabla 23.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (1×10^{-9} - 1×10^{-4} M) en riñón, perfundido y precontraído con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-}Axt). * $p < 0,05$ frente al grupo *Vav3*^{-/-}.

ACETILCOLINA		
Parámetro	<i>Vav3</i> ^{-/-}	<i>Vav3</i> ^{-/-} Axt
E _{max} (%)	68,3 ± 4,9	84,4 ± 4,1*
pD ₂	8,0 ± 0,4	8,2 ± 0,3*

Tabla 24.- Parámetros que caracterizan las curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (1×10^{-8} - 1×10^{-4} M) en riñón, perfundido y precontraído con fenilefrina (1×10^{-6} M), de ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-}Axt).

NITROPRUSIATO SÓDICO		
Parámetro	<i>Vav3</i> ^{-/-}	<i>Vav3</i> ^{-/-} Axt
E _{max} (%)	71,0 ± 6,9	79,3 ± 9,2
pD ₂	6,9 ± 0,5	6,8 ± 0,6

3. Hipertrofia cardiaca

Metodología

Al igual que en el modelo anterior, una vez que se sacrifican los animales se extrae el corazón, se eliminan cuidadosamente los restos de tejido graso y se separan las aurículas. Los ventrículos se secan cuidadosamente para eliminar el exceso de líquido y se pesan. La relación entre el peso de los ventrículos y el peso corporal se utilizó como HV.

Resultados

Los resultados de HV se expresan como media aritmética \pm EEM de un mínimo de 10 experimentos. Las comparaciones estadísticas se realizaron como se indica en apartado 1 del anexo 2.

En la figura 51 se presentan los datos de HV, como puede observarse el tratamiento con astaxantina redujo la hipertrofia cardiaca de forma estadísticamente significativa con respecto al grupo *Vav3^{-/-}*.

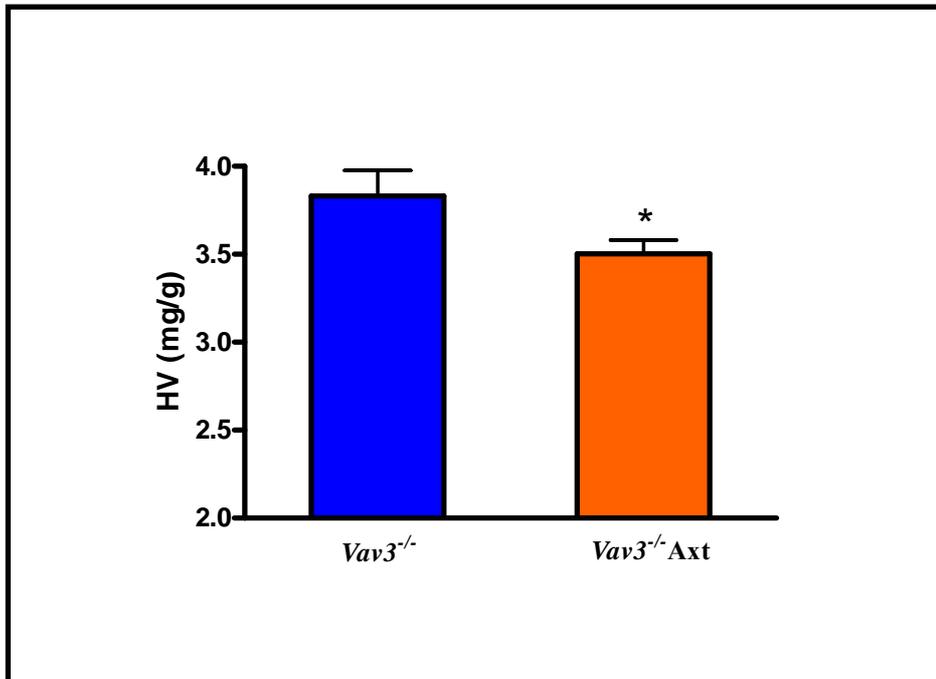


Figura 51.- Índice de hipertrofia cardiaca (HV) en ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-}Axt). * $p < 0,05$ frente al grupo *Vav3*^{-/-}.

4. Hipertrofia de las glándulas suprarrenales

Metodología

El fenotipo producido por la deficiencia de las proteínas Vav3 incluye una serie de características relacionadas de manera importante con la función renal, pero no se observan cambios en la morfología y el peso de los riñones¹⁸², sin embargo, se ha observado que existe hipertrofia de las glándulas suprarrenales. Para valorar si el tratamiento con astaxantina modifica este parámetro, las GSR se separaron del riñón, se limpiaron y se pesaron. La relación entre el peso de las GSR y el peso corporal se define como el índice de hipertrofia de las glándulas suprarrenales (HGSR).

Resultados

Los resultados se expresan en mg/g como la media aritmética \pm EEM de un mínimo de 6 experimentos. Las comparaciones estadísticas se realizaron como se indica en el apartado 1 del anexo 2.

Como se observa en la figura 52, tanto el peso de las GSR como el HGSR fueron significativamente menores en los ratones tratados con astaxantina con respecto al grupo control.

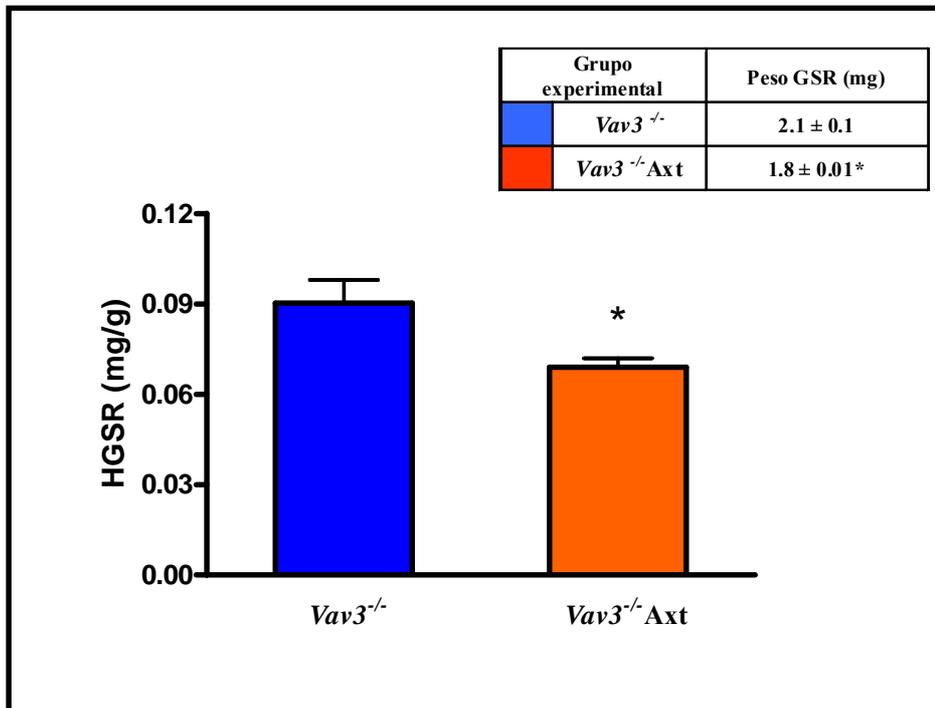


Figura 52.- Peso e hipertrofia de las glándulas suprarrenales (HGSR) en ratones *Vav3* deficientes (*Vav3*^{-/-}) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día (*Vav3*^{-/-} Axt).
* $p < 0,05$ frente al grupo *Vav3*^{-/-}.

5. Producción de anión superóxido

Metodología

Al igual que en los dos modelos de hipertensión anteriores, la determinación de $\bullet\text{O}_2^-$ en vasos se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando lucigenina. Se valoró tanto la producción basal como la estimulada con NADPH. Para la realización de estos estudios se utilizó la arteria aorta de una parte de los animales de cada grupo experimental. Inmediatamente después del sacrificio la aorta se extrae, se limpia, se corta en dos secciones y se mantienen en Krebs HEPES frío. En una mitad se determina la producción basal y en otra la estimulada.

Resultados

La producción de $\bullet\text{O}_2^-$ se expresa como URL/min/mg de tejido. Los resultados se expresaron como media aritmética \pm EEM de un mínimo de 5 experimentos. Los análisis estadísticos se realizaron como se describe en el apartado 1 del anexo 2.

No se encontraron diferencias significativas en la producción basal de $\bullet\text{O}_2^-$, pero el tratamiento con astaxantina redujo, de manera significativa, la formación de $\bullet\text{O}_2^-$ cuando se estimulaba con NADPH (Figura 53).

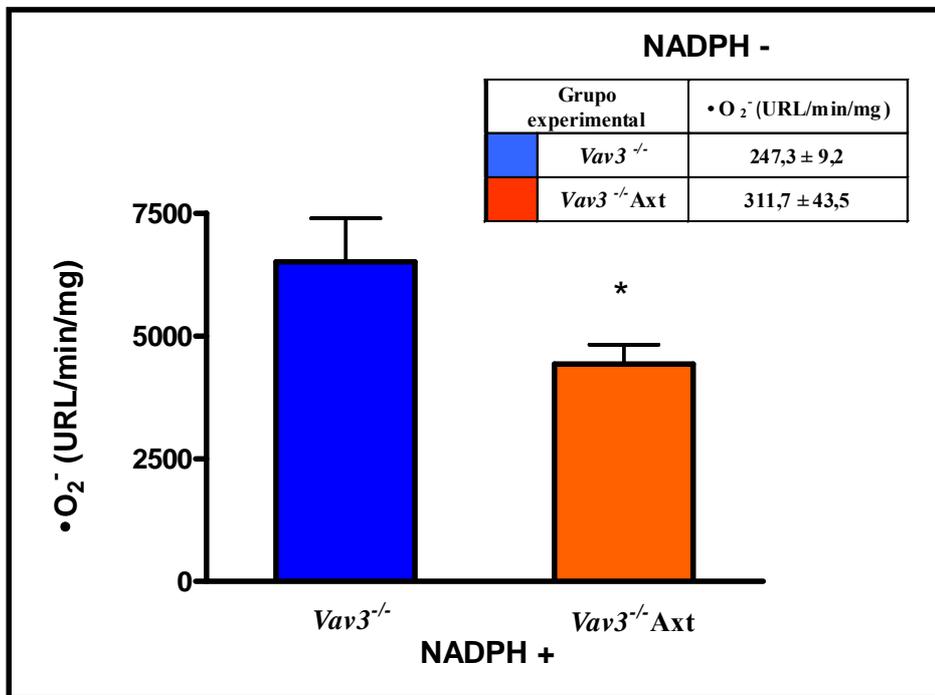


Figura 53.- Producción $\bullet\text{O}_2^-$ en aorta de ratones $Vav3$ deficientes ($Vav3^{-/-}$) y tratados con astaxantina 100 mg/kg/día ($Vav3^{-/-}$ Axt). Producción basal (NADPH -) y producción estimulada (NADPH +). * $p < 0,05$ frente al grupo $Vav3^{-/-}$.

Discusión

La HTA es un problema de salud pública a nivel mundial, por su elevada prevalencia y por ser uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En el año 2000 aproximadamente el 26,4% de la población mundial con más de 20 años padecía hipertensión y se estima que llegue al 29,2% en el año 2025. La prevalencia aumenta con la edad y a partir de los 50 años de forma exponencial¹⁹⁵. Las organizaciones internacionales y regionales de salud, han reconocido el papel que tiene la nutrición en el control de la hipertensión^{42,43,44}. En estos estudios se ha sugerido que el manejo nutricional integral donde se combina el consumo de frutas y verduras, que incrementa el consumo de antioxidantes, la reducción en la ingesta de azúcares, café, alcohol, tabaco y la promoción de la actividad física son elementos necesarios para la disminución y control de los niveles elevados de PA.

Por otro lado, en el sistema cardiovascular las ERO tienen un papel fisiológico esencial en el mantenimiento de la homeostasis, así como un papel patofisiológico en la disfunción endotelial asociada a enfermedades como hipertensión, diabetes y aterosclerosis^{196,197}. Entre las ERO más importantes destacan el $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 , y el NO. En condiciones fisiológicas estas ERO son producidas de manera controlada a bajas concentraciones, funcionando como moléculas de señalización regulando el tono vascular y el desarrollo de las CMLV^{198,199}. Sin embargo, en condiciones patológicas la producción aumentada de ERO conlleva a la disfunción endotelial, vasoconstricción aumentada y a un desarrollo excesivo de las CMLV, entre otros procesos, que contribuyen al daño cardiovascular²⁰⁰.

En modelos animales donde se han desarrollado patologías como las mencionadas se ha observado que la alteración de la relajación endotelio dependiente está asociada a una degradación mayor de NO por las ERO. Esto también se ha estudiado en seres humanos, donde las vitaminas antioxidantes han demostrado incrementar la relajación endotelio dependiente en la

circulación coronaria y radial de individuos con hipertensión y diabetes^{178,179,180}.

Esta relación entre el balance de las ERO, los sistemas antioxidantes propios del organismo, de la dieta y la salud cardiovascular se ha reforzado en los últimos años. Por lo que con esta hipótesis de partida, nos propusimos evaluar el efecto que la astaxantina, un carotenoide de origen natural, tiene sobre la funcionalidad vascular, el remodelado cardiovascular y el estrés oxidativo asociados a la hipertensión.

Para ello hemos utilizado tres modelos animales de HTA: el modelo con ratas SHR fue utilizado debido a que los animales presentan daño en órganos similares a los observados en la hipertensión esencial en humanos¹⁸¹. El modelo de infusión de Ang II nos pareció importante debido a que la cascada de señalización producida por la Ang II involucra la estimulación de la NAD(P)H vascular por lo que se asocia a la producción excesiva de ERO, mientras que los ratones *Vav3*^{-/-} nos parecieron interesantes debido a que la expresión a la alza del SRA implica estrés oxidativo y a que es un nuevo modelo de HTA.

En todos los casos, la astaxantina fue administrada en el pienso en las dosis mencionadas, y observamos que en ningún caso alteró el desarrollo de los animales. El crecimiento de los grupos tratados con astaxantina fue igual al crecimiento de los grupos no tratados. Esto es importante debido a que le proporciona validez a las comparaciones donde se utiliza el peso corporal para la obtención de índices de hipertrofia. Además, se observó que las velocidades de crecimiento en todos los casos fueron las adecuadas para los animales utilizados en relación a su edad y bienestar. En parte esto es reflejo de que todos los grupos experimentales consumieron el mismo alimento. En los grupos experimentales donde se administró astaxantina, la composición del pienso no cambió debido a que la cantidad de astaxantina administrada y el vehículo que se utiliza como soporte (dextrinas), se ajustó con base a la

cantidad de almidón, por lo que no existió diferencia en la ingesta calórica entre los grupos debido a la dieta utilizada¹⁸³.

El bienestar de los animales de los grupos experimentales está asociado a la cantidad y calidad del alimento recibido. Esto es importante debido a que se sabe que un cambio sustancial en la densidad calórica de la dieta puede modificar los datos experimentales e interferir en los resultados sobre todo en trabajos donde se involucra el sistema cardiovascular y el sistema nervioso en general²⁰¹.

La administración de astaxantina en la dieta y en las dosis usadas fue capaz de disminuir la PAS o de ralentizar el incremento de ésta según el modelo de hipertensión utilizado (Figuras 10, 30, 45).

Como podemos ver en los tres modelos, la reducción en la PAS con respecto a los grupos con HTA fue del mismo orden de magnitud: de 26 y 20 mmHg en el modelo con ratas SHR, 21 mmHg en el modelo de infusión de Ang II y 22 mmHg en el modelo *Vav3^{-/-}*. En este sentido, la administración de astaxantina produce disminuciones de PAS discretas, propias de los antioxidantes como la vitamina C y E¹²⁵. Hussein y col.³⁶ han descrito el uso de astaxantina en ratas SHR y Wistar Kyoto (WKY) y han encontrado que la administración oral en animales de 7 semanas de edad y en dosis única de 5, 50 y 500 mg/kg no afectaba la PAS. Sin embargo, en el mismo estudio la administración en una dosis diaria de 50 mg/kg durante dos semanas disminuyó los valores de PAS de 198 a 173 mmHg. De la misma manera, cuando analizan el efecto de dos dosis diarias, 5 y 50 mg/kg, durante cinco semanas encontraron que la velocidad de disminución de los valores de PA estaba relacionada con la dosis, de tal manera que con la dosis baja los cambios en la PA no se ponían de manifiesto hasta finalizar la segunda semana de administración, mientras que con la dosis alta la disminución fue evidente desde la primera semana de administración. En promedio se encontró que la astaxantina en esas dosis disminuye la PA en ratas SHR alrededor de 18 mmHg.

Si consideramos la disminución que encontramos en nuestros experimentos, también con ratas SHR: 11,3% y 14,8% con dosis de 75 y 200 mg/kg/día respectivamente pareciera ser que la velocidad de disminución de la PAS es dosis dependiente pero que estamos en el límite de respuesta. Los resultados considerando los porcentajes de disminución de la PAS encontrados en los otros dos modelos utilizados, son muy similares a los encontrados con ratas SHR, ya que tanto para el modelo de infusión de Ang II como en los ratones *Vav3^{-/-}* la disminución fue de un 15%.

Con el fin de evaluar la disminución de la PA producida por la astaxantina, Husein y col. administraron por vía oral una dosis de 5 mg/kg/día durante 7 semanas en ratas SHR; los resultados fueron similares a los mencionados. La disminución en la PAS fue de 13% y se evidenció a partir de la segunda semana de tratamiento^{37,38}.

En cuanto a la evaluación de las propiedades antihipertensivas de otros antioxidantes, los estudios se han centrado sobre todo en las vitaminas E y C. En la primera se han usado modelos animales como ratas SHR pero hay pocos estudios en seres humanos, mientras que en el caso de la vitamina C, los trabajos se han centrado más en humanos que en modelos animales. Newaz y Nawal²⁰² administraron γ -tocotrienol a ratas SHR en una dosis de 15 mg/kg observando una disminución de la PAS y un incremento en la actividad SOD. Estos mismos autores en otro estudio²⁰³ utilizando α -tocoferol, en una dosis de 34 mg/kg en ratas WKY y SHR, observaron reducciones de la PAS considerables, de la peroxidación de lípidos e incrementos de la actividad SOD de los grupos de animales tratados. Newaz y col.²⁰⁴ en un estudio en el que se relaciona el efecto dosis respuesta de α -tocoferol utilizando dosis en la dieta de 17, 34 y 170 mg/kg en ratas SHR, describen que los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 34 mg/kg disminuyendo la PA e incrementando los valores de actividad de eNOS.

En otras investigaciones con modelos animales, se ha analizado la influencia de la vitamina E sobre el metabolismo de los ácidos grasos omega 3 y 6, la

producción de PGI₂ y su efecto antihipertensivo²⁰⁵. En todos los casos, los mecanismos propuestos para la reducción de la PA por medio de la vitamina E coinciden en que incrementa la capacidad antioxidante, la actividad de la eNOS, la biodisponibilidad del NO y reduce la oxidación de las LDL.

En el caso de la vitamina C se ha demostrado una clara disminución de los valores de PAS en modelos animales, y esta disminución es dosis dependiente²⁰⁶. Vasdev y col.²⁰⁷ encontraron que la administración crónica de vitamina C durante 9 semanas con una dosis de 1000 mg/kg dieta/día en ratas SHR, disminuía la PAS del orden de 20 a 30 mmHg desde la primera semana de administración, pero esta reducción nunca llegaba a ser de mayor magnitud pues los valores alcanzados en ese tiempo se mantenían constantes durante todo el estudio. Atribuyeron las propiedades antihipertensivas de la vitamina C a que ésta es capaz de restituir los niveles de cisteína y de glutatión con la mejora del estado oxidativo de los individuos.

Además, Chen y col.¹²⁵ estudiaron el efecto de la vitamina C y E en la progresión de la HTA en un modelo de ratas SHR-SP. Las vitaminas C y E fueron administradas en una dosis de 1000 mg/día y de 1000 UI/día respectivamente durante seis semanas. En las primeras dos semanas el efecto de las dos vitaminas llegó a su máximo, 30 mmHg por debajo del grupo control, manteniéndose así durante las semanas restantes. La disminución de la PAS se atribuyó a una mejora en el estado antioxidante de los grupos tratados, a una mejor vasorrelajación endotelio dependiente y a una disminución del remodelado vascular.

En un estudio *in vitro* realizado por Ülker y col.²⁰⁸ se analizan los efectos de las vitaminas C y E en la función vascular y la actividad de la NAD(P)H oxidasa y la eNOS utilizando aortas de ratas SHR y su control normotenso (WKY), con el fin de discriminar los mecanismos involucrados en la reducción de la PA asociada a la ingesta de estos dos antioxidantes. Sus resultados atribuyen la disminución en los valores de la PA a una mejor

función endotelial, a un incremento en la actividad de la eNOS y a una disminución en la actividad de la NAD(P)H oxidasa.

Diversos estudios en seres humanos han ayudado a proponer diferentes mecanismos para explicar la capacidad antihipertensiva de vitaminas antioxidantes^{209,210,211,212,213,214}. Entre los mecanismos más importantes destacan el incremento de la biodisponibilidad del NO, de la actividad de la eNOS, de la recuperación de glutatión oxidado a glutatión reducido y una mejor función vascular.

El licopeno, otro carotenoide como la astaxantina, ha demostrado su capacidad antihipertensiva reduciendo hasta en 9 mmHg la PAS de individuos de entre 40 a 65 años de edad²¹⁵.

Así, la acción antihipertensiva de la astaxantina, los posibles mecanismos de acción y su relación con las ERO han sido propuestos en un trabajo de revisión,³⁹ donde se han sugerido como posibles vías, una disminución en la respuesta α adrenérgica de las células vasculares de músculo liso, una disminución en la agregación plaquetaria, una menor respuesta a la activación de la NAD(P)H oxidasa por parte de la Ang II y una reducción en las concentraciones de ERO, sin embargo, ni en este trabajo ni en los que le preceden corroboraron estos mecanismos.

Con los resultados de nuestros experimentos, podemos decir que la disminución en la PAS encontrada en los tres modelos utilizados mediante la administración de astaxantina, se asocia a cambios funcionales y estructurales de los vasos y a una mejora del estado de oxidación, aspectos que se detallarán más adelante.

La pérdida de la vasodilatación endotelio-dependiente en la hipertensión ha sido asociada a la disminución de la biodisponibilidad de NO. Este hecho también se ha relacionado con una disminución en la síntesis de NO y/o un incremento en la degradación del NO por interacción con el $\bullet\text{O}_2^-$ para formar

ONOO^{-216,217} que es un vasodilatador muy pobre comparado con el NO, además de que tiene propiedades inflamatorias²¹⁸. En modelos experimentales de hipertensión se ha mejorado la función endotelial mediante antioxidantes o mediante precursores de BH₄^{219,220}. Por esta razón, uno de nuestros objetivos de estudio fue determinar si el tratamiento con astaxantina podría mejorar la funcionalidad de diferentes lechos vasculares.

En el caso de la aorta de ratas SHR, la respuesta a ACh, que refleja el estado funcional del endotelio, no mejoró con la administración de astaxantina. Como aparece en la figura 13, las curvas del grupo SHR-Control y de los dos grupos tratados SHR-Axt 200 y SHR-Axt 75 fueron prácticamente iguales, lo que nos confirmó que el tratamiento con astaxantina, no mejoró la disfunción endotelial asociada a la HTA en arterias de conductancia.

Estos resultados están parcialmente en concordancia con los trabajos del grupo de Hussein, que estudiaron la administración oral de astaxantina en ratas SHR. En estas investigaciones no encontraron un efecto significativo en la respuesta relajante a ACh en anillos de aorta torácica, aspecto que atribuyen al hecho de que la producción de NO endotelial no se altera con la astaxantina^{36,37}. En comparación con nuestros resultados, ellos sí encontraron diferencias en la relajación independiente del endotelio.

Sin embargo, existen otros estudios donde se ha descrito que el uso de vitaminas antioxidantes mejora la relajación endotelio dependiente²²¹. Estudios realizados en anillos de aorta de ratas SHR y WKY incubados con vitaminas C y E en concentraciones de 10 μ M y 100 μ M cada una, han demostrado que se mejora la relajación endotelio dependiente en SHR logrando relajaciones similares a las obtenidas en ratas WKY. Los resultados en ambos casos han sido positivos, siendo mejor la relajación producida por la incubación con vitamina C²⁰⁸.

Al estudiar en estos mismos vasos la influencia de los prostanoides derivados de la COX mediante la inhibición de esta enzima con indometacina, si bien

como era de esperar mejoró la relajación con respecto a los anillos de aorta no incubados, no hubo diferencia entre los tres grupos experimentales lo que evidencia que la astaxantina además de no mejorar la relajación endotelio dependiente, no influye significativamente en la síntesis de las prostaglandinas (Figuras 14 y 15).

Tampoco encontramos diferencias en la respuesta a NTP (Figura 18), ni en la biodisponibilidad de NO, pues la respuesta a FE no cambió en presencia del antagonista de la eNOS, L-NAME, evidenciando que el tratamiento con la astaxantina, con las dos dosis utilizadas, no mejoró la producción basal de NO. Estos datos nos sugieren que el hecho de no encontrar una mejor relajación endotelio-dependiente en la aorta, se puede asociar a una falta de mayor biodisponibilidad de NO.

El comportamiento funcional de la aorta en el modelo de infusión de Ang II tuvo similitudes y diferencias a lo encontrado en el modelo con ratas SHR. Si comparamos la respuesta de los grupos Ang II y Ang II Axt a ACh observamos que fue prácticamente igual. En este sentido podemos decir que la administración de astaxantina no mejoró la relajación endotelio dependiente en este modelo de hipertensión. Algo que nos sorprendió, fue el hecho de observar que la curva concentración respuesta a ACh en el grupo Sham se desplazara significativamente a la derecha, con respecto a los otros dos grupos experimentales como se aprecia en la figura 33. Los resultados de actividades enzimáticas observadas en el hígado en este modelo de hipertensión nos sugieren que al presentarse valores altos de la actividad SOD, valores de la actividad CAT similares y mayor actividad de la GPx en el grupo Sham frente al grupo Ang II, podrían estar relacionadas con una disminución acusada de H₂O₂ y que éste participe en la mediación de la relajación endotelio dependiente en las aortas, pues se ha descrito la participación del H₂O₂ en la hiperpolarización y el efecto relajante observado en vasos de conductancia como la carótida^{101,222}. Aspecto que también estaría relacionado con una ligera disminución del MDA en plasma.

En este modelo 2, no se realizó una incubación con inhibidores de la vía de la COX, sino que nos interesamos, además de analizar la relajación endotelio dependiente, en ver si ésta cambiaba con la inhibición de la NAD(P)H oxidasa utilizando apocinina como un inhibidor conocido de este sistema enzimático. Los resultados no fueron los esperados, ya que si bien en el grupo Sham la apocinina no modificó esta respuesta, en los grupos Ang II y Ang II Axt la incubación con apocinina disminuyó los valores de pD_2 y de E_{max} de manera significativa (Figura 34 y Tabla 14). Las posibles razones de esto pueden atribuirse a que la misma apocinina pueda ser un agente pro-oxidante o como algunos autores sugieren puede producir un efecto negativo pues induce estrés oxidativo²²³. Los mecanismos químicos involucrados en las acciones de la apocinina han sido estudiados en fagocitos, se ha encontrado que para poder inhibir la NAD(P)H oxidasa, es necesario que la apocinina se oxide en presencia de H_2O_2 y mieloperoxidasa (MPO). Una vez oxidada ésta es capaz de formar dímeros o trímeros que son los compuestos con actividad metabólica. No se sabe si la actividad de la apocinina es específica de la MPO, si en las células vasculares la apocinina es capaz de inhibir la NAD(P)H oxidasa, a pesar de que no tienen MPO propia sino que la toman las células endoteliales a partir de la MPO secretada por neutrófilos y que de esta manera se active la dimerización y la actividad inhibitoria de la apocinina e inclusive si la apocinina en sí misma es un antioxidante. Para aumentar la complejidad, algunos estudios han demostrado que la apocinina en células endoteliales puede ser un pro-oxidante que incrementa la formación de ERO más que disminuirla^{224,225,226}. Lo que es cierto es que la complejidad de tales hallazgos ha abierto más que una polémica un espacio para futuras investigaciones.

En este modelo al igual que en el modelo anterior, la respuesta independiente del endotelio no mostró ninguna diferencia entre los tres grupos experimentales utilizados (Figura 35).

En este mismo modelo al analizar la respuesta contracturante mediante curvas dosis respuesta a NA, encontramos una respuesta diferenciada. La respuesta contracturante en el grupo experimental Ang II y en el grupo Sham fue prácticamente igual, mientras que la respuesta del grupo Ang II Axt fue significativamente menor a la de estos dos grupos. Podemos decir que la infusión de Ang II no incrementó la respuesta a NA, mientras que la administración de astaxantina regula a la baja esta respuesta (Figura 36).

Los valores de los parámetros que definen las curvas correspondientes variaron de manera significativa (Tabla 16). Este hecho ha sido documentado en ambos sentidos, pues algunos autores hablan de una respuesta y una expresión aumentada de los receptores adrenérgicos α_{1d} en modelos animales de hipertensión con respecto a animales normotensos²²⁷, mientras que otros autores han concluido que las ratas SHR y las ratas WKY no presentan diferencias en la respuesta a norepinefrina²²⁸, de hecho algunas investigaciones sugieren que los receptores adrenérgicos α_{1d} y α_{1b} no están relacionados con la hipertensión inducida por Ang II^{229,230}. Otros autores han encontrado que la Ang II, a través de los receptores AT₁, amplifica o facilita la actividad del SNS y que este mecanismo contribuye a la acción vasoconstrictora de la Ang II⁶³. Nosotros pensamos que esto último es posible, ya que en modelos de diabetes y disfunción endotelial se ha observado una respuesta incrementada a NA en aortas, mientras que la utilización de antioxidantes como el resveratrol mejora la función endotelial que además se asocia a una reducción en la respuesta a NA²³¹.

En lo que respecta a la respuesta de los anillos de aorta de este modelo de hipertensión a una dosis única de Ang II (1×10^{-7} M), los resultados no fueron diferentes, sobre todo considerando los valores del EEM. Nuestros datos no concuerdan con los de Hussein y col.³⁷, quienes mencionan que la astaxantina reduce significativamente la respuesta contráctil a Ang II, en ratas SHR, sin embargo hay también que considerar que se trata de especies diferentes y por lo tanto la respuesta no necesariamente tendría que ser la misma. Lo que es

evidente, como aparece en la figura 37, es que hay una tendencia de respuesta a la baja en los dos grupos experimentales donde se realizó la infusión con Ang II: grupos Ang II y Ang II Axt, probablemente esta respuesta pueda estar relacionada con un mecanismo de regulación a la baja de los receptores AT_1 como un mecanismo compensatorio por la concentración de ligando que se está suministrando a través de las minibombas osmóticas, o que se presente un antagonismo regulatorio mediante los receptores AT_2 ⁵⁷. También cabe mencionar que si bien se ha observado una expresión a la alza del ARNm y de la proteína propia de los receptores AT_1 en modelos animales de hipertensión como las ratas SHR en comparación con ratas WKY, esto no necesariamente se traduce en una mayor respuesta en los vasos^{232,233}.

En el modelo de hipertensión con ratones modificados genéticamente para las proteínas Vav3 encontramos un comportamiento muy similar en la funcionalidad de la aorta con respecto a los dos modelos precedentes. En la relajación endotelio-dependiente, la respuesta a ACh no mejoró por la administración crónica de astaxantina.

Este efecto podría estar relacionado con el hecho de que los ratones $Vav3^{-/-}$ tienen niveles elevados de Ang II, que se incrementan con la edad, al mismo tiempo que expresan a la alza los receptores AT_1 en las CMLV de la aorta. Dicha sobre-expresión de Ang II y de sus receptores AT_1 , conllevan una vasoconstricción mediada por DAG, IP_3 y la activación de la NAD(P)H oxidasa y por lo tanto un incremento en la producción de $\bullet O_2^-$ que, a su vez, produce un “círculo vicioso” de activación de la contracción muscular disminuyendo la biodisponibilidad de NO y el posible desacoplamiento de la eNOS, por lo que la capacidad antioxidante de la astaxantina a pesar de que puede disminuir la producción de $\bullet O_2^-$, como lo comprobamos mediante quimioluminiscencia (Figura 53), no es suficiente para incrementar la biodisponibilidad de NO y de esta manera reflejarse en una mejor relajación endotelio-dependiente.

En las curvas concentración-respuesta a NTP, para analizar la respuesta endotelio-independiente, no se observó ninguna diferencia entre los dos grupos experimentales. Los valores de E_{\max} y de pD_2 que aparecen en la tabla 21, son muy parecidos entre sí.

Como se sabe el SNS participa en la homeostasis cardiovascular mediante la regulación de la frecuencia cardíaca, la contracción cardíaca, el tono vascular y la liberación de renina^{234,235}. Estas acciones se llevan a cabo por tres catecolaminas: adrenalina, noradrenalina y dopamina. Sauzeau y col.¹⁸² mencionan que en ratones $Vav3^{-/-}$ estas tres catecolaminas se encuentran elevadas desde su nacimiento hasta la edad adulta, lo que implica una hiperactividad del SNS. Al analizar las curvas correspondientes a la respuesta contracturante a NA se pudo observar que el grupo experimental $Vav3^{-/-}$ presentó un menor valor del E_{\max} que el grupo $Vav3^{-/-}$ Axt. Además de esta diferencia, el valor del parámetro pD_2 del grupo tratado con astaxantina también fue mayor, lo que implica que este grupo mostró una mayor sensibilidad en su respuesta a NA, lo que estaría en oposición con los datos de Hussein y col.³⁹, quienes mencionan que la astaxantina es capaz de normalizar la respuesta de los receptores adrenérgicos. Por otro lado, esta respuesta aumentada a NA en el grupo $Vav3^{-/-}$ Axt podría deberse a una disminución en la concentración de catecolaminas en este grupo experimental, lo que llevaría a una expresión al alza de los receptores adrenérgicos como un mecanismo de regulación. Aunque cabría esperar una reducción en la respuesta a NA en el grupo tratado con astaxantina como ocurría en el anterior modelo, ya que el uso de otros antioxidantes como el resveratrol se ha asociado a una menor respuesta de anillos de aorta a la NA como parte de la mejor función vascular observada²³¹. Lo que es evidente, es que el conocimiento de este modelo en la óptica de la hipertensión está en sus primeras etapas y que queda mucho por investigar.

La respuesta a dosis única de Ang II (1×10^{-7} M) en anillos de aorta de este modelo de hipertensión, no fue significativamente diferente entre los dos

grupos experimentales, tan sólo se observó una tendencia de respuesta aumentada en el grupo $Vav3^{-/-}$ Axt, que de ninguna manera puede darnos elementos para relacionar este incremento con la administración de astaxantina, sobre todo considerando los valores del EEM que se observaron. Cabe mencionar que aunque se sabe que los ratones $Vav3^{-/-}$ tienen una regulación al alza del ARNm de los receptores AT_1 en las CMLV y en el corazón, se conoce poco sobre el significado funcional de este hecho. Estudios en otros modelos animales de hipertensión, también han demostrado una expresión aumentada del ARNm y de la proteína de los receptores AT_1 y AT_2 en aortas de ratas SHR en comparación de ratas WKY^{232,233,236}. Otros investigadores han confirmado que esta diferencia entre las cepas SHR y WKY se produce en la densidad de expresión y la afinidad que tienen estos receptores, pero esta diferencia sólo se ha podido identificar a nivel de médula adrenal, parte externa de la médula renal y en el corazón pero no en los vasos; por lo que se ha sugerido que la regulación a la alza de la señalización de Ang II en individuos hipertensos ocurre a nivel post-receptor²³⁷. De cualquier modo, con los datos obtenidos no podemos relacionar la respuesta a Ang II con algún cambio producido por la administración crónica de astaxantina, sobre todo por la variabilidad observada en la respuesta.

En los tres modelos de hipertensión, el lecho vascular renal se comportó de manera diferente a los resultados que encontramos en la aorta. En este caso la mejoría en la funcionalidad del lecho vascular renal asociada a la administración de astaxantina, da respuesta a la disminución en los valores de PAS observados y se relaciona con otros cambios estructurales y funcionales beneficiosos que se irán discutiendo durante el desarrollo de este capítulo.

Con los datos obtenidos en el modelo de ratas SHR, podemos decir que la astaxantina mejoró la relajación endotelio dependiente en el lecho vascular renal incrementando los valores de pD_2 y aumentando entre un 15 a un 18% el valor del E_{max} (Figura 20 y Tabla 10). Esta mejor respuesta vascular además la asociamos a un incremento significativo en la biodisponibilidad de NO de un

84,8 ± 11,5% en el grupo SHR-Control a un 132,0 ± 15,5% en el grupo SHR-Axt 200.

En el modelo de hipertensión mediante infusión de Ang II, la astaxantina también mejoró la relajación endotelio dependiente en el lecho vascular renal. En este caso se observó en el grupo experimental Ang II Axt un incremento de 25% en el valor del E_{max} con respecto al grupo Ang II, esta relajación máxima observada en el grupo Ang II Axt, inclusive, fue ligeramente superior a la del grupo Sham (Figura 38). Los valores mayores de pD_2 correspondieron a los grupos Sham y Ang II Axt.

En el modelo de hipertensión basado en la deficiencia de las proteínas Vav 3, los resultados fueron alentadores, en este caso la administración crónica de astaxantina también mejoró la respuesta del lecho vascular renal a ACh, lo que se reflejó tanto en el valor de pD_2 como en la respuesta máxima del grupo $Vav3^{-/-}$ Axt que fue 22% superior a la del grupo $Vav3^{-/-}$ (Figura 49). Estos resultados nos sugieren que la disminución de la PAS asociada a la administración crónica de astaxantina en este modelo de hipertensión puede estar relacionada con la mejora en la función endotelio-dependiente en arterias de resistencia.

Creemos que uno de los hallazgos más importantes de este estudio es que la administración de astaxantina disminuyó los valores de PAS en los tres modelos utilizados, y que esta disminución está asociada a una mejoría en la función endotelial en arterias de resistencia, como demuestran los resultados obtenidos en el lecho vascular renal. Pensamos además, que estos cambios están relacionados con el estado redox, ya que en el modelo de ratas SHR esta mejoría en la función endotelial del lecho vascular renal se asoció claramente a un incremento en la biodisponibilidad del NO en el mismo lecho vascular (Figura 21), esta asociación entre función endotelial, biodisponibilidad de NO y astaxantina ha sido sugerida por algunos autores²³⁸. Estos datos son concordantes con los resultados de diversos estudios, donde se han suministrado de manera crónica vitaminas C y E encontrando una mejoría en

la relajación endotelio dependiente en vasos de resistencia (segmentos de arterias mesentéricas) que asocian a un incremento en el estado antioxidante del plasma y a la función de “scavenger” de estas vitaminas¹²⁵. El uso de estas vitaminas, también ha sido asociado por otros autores con una estimulación directa de la eNOS por medio de un aumento en la BH₄ intracelular con la consecuente síntesis aumentada de NO^{202,204,221}. También se ha observado que la administración de vitaminas antioxidantes en ratones deficientes en Apo E y con disfunción endotelial, es capaz aumentar el estatus antioxidante del plasma, lo que se traduce en una menor disponibilidad de radicales libres, que mejora la defensa celular y la respuesta funcional del endotelio. En este caso, la respuesta se asocia a un incremento en la BH₄, a una mayor actividad de la eNOS y niveles basales altos de cGMP, lo que sugiere que la vitamina C produce una estimulación BH₄ dependiente de la síntesis de NO^{177,239}.

En otros estudios, usando un modelo de hipertensión mediante la infusión de Ang II en ratones, se analizó el efecto del estado redox en la PA y la función endotelial de vasos de resistencia, mediante la administración en la dieta de apocinina en una dosis de 2,5 mg/día. En este caso, más allá de que los diversos grupos de investigación no se ponen de acuerdo en si la apocinina es un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa o un antioxidante²²⁵, los resultados son interesantes ya que la disminución de los valores de PAS se asociaron a una mejora en la función endotelial de arterias mesentéricas de segundo orden y a la disminución de las concentraciones de •O₂⁻²⁴⁰. Estos resultados han sido respaldados por el hecho de que la infusión de Ang II produce una disminución en la biodisponibilidad de NO^{241,242}, que se ve mermada por los incrementos en •O₂⁻ cuando la hipertensión está plenamente establecida²⁴³ y al hecho de que la eNOS desacoplada produce más •O₂^{-244,245}, todo esto en detrimento de la función endotelial.

De manera indirecta también se ha resaltado la importancia del equilibrio redox y del balance entre las ERO y las enzimas antioxidantes en el desarrollo

de la hipertensión mediante la sobre-expresión de enzimas como la SOD y la CAT¹⁷⁵.

En lo que respecta a la respuesta independiente del endotelio en los dos modelos donde se realizó para el lecho vascular renal: modelo con ratas SHR y modelo de ratones *Vav3*^{-/-}, podemos decir que en el caso del primero la administración de dosis altas de astaxantina no modificó la respuesta a NTP (Figura 22), sin embargo, cuando se administró en una dosis de 75 mg/kg/día, se produjo un E_{max} superior ($83,40 \pm 12,2\%$) en comparación a los valores del grupo SHR-Control ($76,42 \pm 15,8\%$) sin que estos fueran significativos. Hasta el momento no se han realizado estudios con astaxantina en lechos vasculares de resistencia, por lo que no existe literatura al respecto; sin embargo Hussein y col.³⁷ encontraron en aortas de SHR una relajación independiente del endotelio mayor en el grupo experimental donde se administró vía oral astaxantina en una dosis de 5 mg/día, en comparación del grupo no tratado. Estos autores atribuyen esta diferencia en la respuesta a NTP, a que en el grupo tratado con astaxantina puede haber un incremento de los nucleótidos cíclicos y una disminución en el calcio intracelular, a pesar de que esta hipótesis es interesante, ellos no lo corroboraron en su estudio.

En el modelo con ratones *Vav3*^{-/-}, las curvas concentración respuesta a NTP de los grupos experimentales *Vav3*^{-/-} y *Vav3*^{-/-}Axt no fueron diferentes (Figura 50). Estos datos concuerdan con los resultados encontrados en diferentes investigaciones donde utilizan vitaminas antioxidantes o inhibidores de la NAD(P)H oxidasa como la apocinina. En estos estudios hay dos hechos principales: el uso de los antioxidantes mejora la relajación endotelio-dependiente y no modifica la relajación a NTP^{208,125,240}.

Los datos que encontramos al realizar curvas concentración respuesta a FE en el lecho vascular renal del modelo de hipertensión inducido por la infusión de Ang II, no reflejan un efecto producido por la administración de la astaxantina. El comportamiento entre los tres grupos experimentales, como se comentó en la sección de resultados, fue igual. Esto estaría en concordancia

con los resultados mencionados, ya que investigaciones recientes han encontrado que los receptores adrenérgicos α_{1d} y α_{1b} no están relacionados con la hipertensión inducida por Ang II^{229,230} o que no existe diferencia en la respuesta adrenérgica entre ratas hipertensas y normotensas²²⁸. Sin embargo, como sucedió en las curvas dosis respuesta a NA en aortas de este mismo modelo de hipertensión, también existen investigaciones que indican lo contrario²²⁷. Lo que sí es un hecho es que la administración de astaxantina no modificó a la baja esta respuesta.

La perfusión de Ang II en dosis única no produjo una respuesta diferente entre los grupos experimentales $Vav3^{-/-}$ y $Vav3^{-/-}$ Axt. Sauzeau y col.¹⁸² mencionan que la disfunción cardiovascular que caracteriza el fenotipo de los ratones $Vav3^{-/-}$ está relacionada con una expresión al alza del SRA, incluyendo los receptores AT₁. Ensayos preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio utilizando riñón perfundido indican que esto se corresponde con una mayor respuesta contracturante a Ang II en los ratones $Vav3^{-/-}$. En este sentido, con los datos obtenidos podemos decir que la astaxantina no modificó la respuesta a Ang II en la dosis y condiciones señaladas.

Se sabe que las consecuencias nocivas de la hipertensión se deben tanto a factores hemodinámicos como no hemodinámicos y el hecho que la astaxantina disminuya de manera significativa la presión arterial nos llevó a pensar que otros parámetros como la hipertrofia cardíaca y vascular podrían mejorar en los modelos de HTA utilizados. Así, otro de los objetivos de este trabajo fue determinar si la administración de astaxantina influía sobre los procesos de remodelado cardiovascular propios de la HTA.

El remodelado cardíaco se ha definido como la expresión de cambios moleculares, celulares e intersticiales que se manifiestan clínicamente como modificaciones que deterioran la forma, el tamaño y la función del corazón²⁴⁶. La HTA está vinculada con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca que se manifiesta fundamentalmente en el ventrículo izquierdo. Ello se debe a un aumento en el número o tamaño de los cardiomiocitos y a la hiperplasia de

fibroblastos del intersticio, que en último término lleva a la disfunción cardíaca. En este mismo sentido, el SRA está considerado uno de los sistemas reguladores más importantes en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular. Actualmente se sabe que la Ang II puede actuar localmente como quimocina, induciendo la fosforilación de tirosinas, el crecimiento, la hipertrofia y la diferenciación celulares. Además, evidencias recientes han demostrado que la Ang II es un estimulador importante de la producción de ERO y por lo tanto de los mecanismos de inflamación¹²³.

De los resultados obtenidos en nuestros experimentos, podemos decir que la administración de astaxantina disminuyó la hipertrofia ventricular de manera significativa en los tres modelos de hipertensión utilizados.

En el modelo con ratas SHR encontramos que esta reducción fue significativa para las dos dosis de astaxantina. Como se ve en la figura 23 la dosis menor de astaxantina se relacionó con una reducción más eficiente de la HVI. En los trabajos sobre el uso de astaxantina como antihipertensivo no se hace referencia al análisis de la HVI^{36,37,38}; sin embargo, Gross y col.^{34,35} estudiaron el efecto cardioprotector de la astaxantina, observando que ésta se acumula en el miocardio en forma libre y que esto reduce la cantidad de radicales libres, de MPO, TNF α y prostaglandina E₂. Si algo similar ocurre con los animales del grupo SHR-Axt, esto podría explicar en parte la reducción del tamaño del corazón.

En otros estudios, utilizando el modelo de ratas SHR a las que se administra vitamina C, se ve que ésta es capaz de reducir los valores de HVI con respecto al control SHR²⁰⁷. En otras investigaciones utilizando productos antioxidantes como la quercetina y polifenoles del vino se ha visto también una reducción de los valores de HVI con respecto al control, aunque en ningún caso los valores se acercan a los valores de las ratas WKY^{247,248}. En general, los valores de reducción en la HVI logrados con antioxidantes presentes en los alimentos no llega a ser tan significativa como en el caso de los fármacos^{249,250}.

En el modelo de infusión de Ang II, los resultados fueron muy positivos ya que el grupo Ang II Axt tuvo valores de hipertrofia similares a los del grupo Sham, mientras que el grupo Ang II presentó valores más altos (Figura 40). Estos resultados fueron bastante similares a los encontrados por varios autores utilizando el modelo de hipertensión mediante la infusión de Ang II y la interrupción de las vías de señalización de ésta en ratones modificados genéticamente^{251,252}. Lu y col.²⁵³, en otro estudio, destacan el hecho de que las enzimas antioxidantes juegan un papel muy importante en el desarrollo de la HV y demuestran que la deficiencia en la SOD exacerba en el miocardio el estrés oxidativo, la fibrosis, la disfunción y la HV producida por un modelo de sobrecarga de presión. Así mismo, se ha destacado que la reducción de ERO y de ERN mediante la administración de BH₄ aumenta la actividad correcta de la eNOS, produciendo NO, previniendo la HTA, reduciendo los niveles de peroxinitritos y la HV asociada a la infusión de Ang II²⁵⁴. Las evidencias de que el estrés oxidativo tiene un papel muy importante en la patogénesis de la hipertensión son cada vez mayores y la Ang II incrementa la producción de ERO mediante la activación de la NAD(P)H oxidasa²⁴¹. Tanto el •O₂⁻ como el H₂O₂ generados son potentes mitogénicos que producen sus efectos por medio de la activación de la p38MAP-cinasa²⁵⁵, ERK-5 y NF-κB²⁵⁶.

Wenzel y col.²⁵⁷ han demostrado, mediante el cultivo de cardiomiocitos de ratas, que la reducción del NO derivado de la eNOS contribuye a la hipertrofia de los cardiomiocitos. El cultivo de éstos con un inhibidor de la eNOS produjo un incremento en la velocidad de síntesis de proteínas y un aumento en el tamaño de las células. Este proceso fue sensible a la inhibición de la p38MAP-cinasa y lo más relevante, al menos para nosotros, a antioxidantes. La inhibición de la eNOS, produjo un rápido incremento de las ERO, una subsecuente activación de p38MAP-cinasa y la expresión de TGF-β y TNFα. Debido a la participación del NO y a la inhibición de la p38MAP-cinasa por parte de los antioxidantes, como es de suponer estos fenómenos están asociados al balance redox. La capacidad antioxidante y “scavenger” de las diversas ERO que tiene la astaxantina explicaría la reducción en la HV

encontrada tanto en el modelo con ratas SHR como en el modelo de infusión de Ang II.

En el modelo con ratones *Vav3*^{-/-} encontramos que la administración crónica de astaxantina también redujo la HV. El grupo experimental *Vav3*^{-/-} tuvo un valor de HV de $3,8 \pm 0,1$, mientras que el grupo tratado con astaxantina fue de $3,5 \pm 0,1$ (Figura 51).

En estos ratones la ausencia de las proteínas Vav 3, que son factores de intercambio de GDP/GTP dependientes de la fosforilación, produce HTA mostrando PAS y PAD elevadas, taquicardia, HVI, un mayor tamaño en los cardiomiocitos, fibrosis del ventrículo izquierdo y un engrosamiento de la aorta, sin embargo, estos defectos no se observaron en el ventrículo derecho y en arterias pulmonares¹⁸². Estos defectos cardiovasculares se asocian a un incremento de renina en plasma, a una mayor concentración de ECA en el corazón y a un incremento, dependiente de la edad, de los niveles de Ang II que a su vez va acompañado de una regulación al alza del ARNm de los receptores AT₁ en aorta y corazón pero no en el circuito pulmonar. Sin embargo no se describen cambios en los receptores de endotelina, sugiriendo que la hipertensión es dependiente del SRA, lo cual corroboraron farmacológicamente. Por otro lado, los niveles altos de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) en los ratones *Vav3*^{-/-} indicaban que la estimulación del SRA, que producía los defectos cardiovasculares, era dependiente del SNS. Este aspecto se corroboró utilizando un inhibidor selectivo de los receptores β -adrenérgicos. Lo que es evidente es que la participación del SRA y de la Ang II en particular, tienen el mismo papel en lo que se refiere a la activación de diversas tirosín-quinasas, citocinas, factores de crecimiento y ERO como los mencionados en los modelos anteriores, lo que explicaría que el papel antioxidante de la astaxantina redujera también en este modelo los valores de HV.

Por último cabe mencionar que la importancia de la Ang II en el desarrollo de la hipertrofia y de la fibrosis cardiacas ha sido bien documentada mediante

antagonistas de los receptores AT₁ como losartan y candesartan, que han sido capaces de atenuar tanto la hipertrofia cardiaca como la fibrosis asociada^{258,259}.

De acuerdo a lo anterior, decidimos evaluar en el modelo de hipertensión mediante la infusión de Ang II, la concentración de OH-Pro como una medida de la fibrosis asociada a la hipertrofia cardiaca propia de la hipertensión.

Los resultados de concentración de OH-Pro obtenidos en el corazón de los ratones de los tres grupos experimentales, nos muestran que en el grupo Ang II la concentración de OH-Pro fue 64% mayor que la obtenida en el grupo Sham y en el grupo experimental Ang II Axt la concentración de OH-Pro fue un 20% menor a la del grupo Ang II, como se muestra en la figura 41.

Así, podemos decir que la infusión de Ang II produce HV, asociada a un incremento en la cantidad de colágeno en el corazón y que la astaxantina la disminuye, pero que no es capaz de revertirla a los niveles presentados por el grupo Sham. En general, estos datos concuerdan con los valores de HV encontrados en cada grupo experimental, ya que los valores menores de HV corresponden también a los animales con valores de OH-Pro menores, aunque en el caso del grupo donde se administró la astaxantina la diferencia no haya sido significativa. Esto concuerda con el hecho de que en la hipertrofia cardiaca, además del aumento en la síntesis de colágeno, también juega un papel muy importante el tamaño y disposición de los cardiomiocitos como lo han demostrado algunos autores²⁶⁰.

Por otro lado, el hecho de encontrar un incremento de OH-Pro en el grupo Ang II estaría bien relacionado con la capacidad que tiene ésta de producir hipertrofia activando diversas vías como las tirosín-cinasas, la p38MAP-cinasa y la producción de ERO a través de la NAD(P)H oxidasa, como ya hemos comentado^{241,255,256}. Del mismo modo que la presencia de la astaxantina en el grupo Ang II Axt nos sugiere que su capacidad antioxidante y “scavenger” de •O₂⁻²⁶¹ estaría relacionada con una concentración menor de

OH-Pro como lo han demostrado Lijnen y col.²⁶². Estas mismas vías han sido señaladas como las vías de actuación de la Ang II en la hipertrofia y depósito de matriz extracelular en células mesangiales. Block y col.²⁶³, mencionan que este proceso es regulado por la subunidad Nox4 de la NAD(P)H oxidasa a través de Src y la subsecuente fosforilación de la proteína-cinasa-1 dependiente 3-fosfoinositol (PDK-1 cinasa); mientras que la regulación al alza de Nox4 es inducida por Ang II y que esta cascada de señalización es redox dependiente. Este hecho también concordaría con la disminución de la hipertrofia renal observada en el modelo de infusión de Ang II cuando se administró astaxantina. Los valores promedio que correspondieron a cada uno de los grupos experimentales Sham, Ang II y Ang II Axt en el mismo orden fueron los siguientes: $7,7 \pm 0,2$ mg/g; $7,7 \pm 0,2$ mg/g y $6,6 \pm 0,3$ mg/g. Así, el carácter antioxidante de la astaxantina también se vio reflejado al disminuir la HR en este modelo de hipertensión. Estos datos además concuerdan parcialmente con investigaciones en las que se ha administrado vitamina C durante nueve semanas en un modelo con ratas SHR. Se ha encontrado una reducción, aunque ésta no fue significativa, en HR sin embargo, los autores comentan que en la inspección al microscopio de los riñones de las ratas SHR tratadas con vitamina C se encontró que tenían una menor hiperplasia en las CMLV y un menor valor de W_m ²⁰⁷. Mientras que en otro estudio utilizando quercetina, también en ratas SHR, aunque se han logrado resultados positivos en la reducción de la PAS y de la disfunción endotelial, no se han modificado positivamente los valores de HR²⁴⁷.

En el modelo con ratones *Vav3*^{-/-} donde se evaluó el peso de las GSR y el índice de HGSR, podemos decir que la administración de astaxantina en la dosis de 100 mg/kg/día, se asoció a una reducción estadísticamente significativa en el peso de las GSR y en el índice de HGSR (Figura 52). Como se mencionó anteriormente en este modelo de hipertensión, la disfunción cardiovascular se asocia a una expresión elevada de la renina, de ECA, de los niveles de Ang II y de los receptores AT₁. Además este mismo modelo tiene una expresión al alza de catecolaminas que a su vez se asocia a una sobre-

estimulación del SNS. Si consideramos que las vías de señalización de la Ang II son redox dependientes como lo hemos expresado en las líneas anteriores^{241,255,256,263}; creemos que la reducción del peso de las GSR y el índice de HGSR puede asociarse al carácter antioxidante y de “scavenger” de $\bullet\text{O}_2^-$ de la astaxantina²⁶¹.

Los cambios hemodinámicos y humorales presentes en la hipertensión, no sólo producen alteraciones en el músculo cardiaco sino que se asocian con el remodelado vascular^{264,265}, esta vinculación ha sido importante en el desarrollo de fármacos antihipertensivos que además puedan atenuar los cambios estructurales^{266,267}. Como se ha mencionado, ahora también se sabe que las ERO participan en los mecanismos de señalización involucrados en el remodelado vascular por lo que la investigación del papel de los antioxidantes en estos procesos ha tomado cada vez más importancia.

En este trabajo encontramos en ratas SHR que, tanto en la aorta como en el lecho vascular renal, la astaxantina produce una reducción del W_m y de la CSA_m . En esta reducción, la dosis más eficiente fue la de 75 mg/kg/día. En el caso del lumen, éste se incrementó también con astaxantina, pero este incremento fue significativo solamente para la dosis más baja. Por estudios previos, se sabe que en modelos de hipertensión por infusión de Ang II y en ratas SHR, se produce un remodelado hipertrófico, ya que en el desarrollo de la hipertensión se incrementan los valores de la relación W_m/L y de CSA_m ^{268,269,270}. Con los resultados obtenidos, podemos decir que la astaxantina en las dos dosis utilizadas, es capaz de revertir la hipertrofia asociada a la hipertensión tanto en la aorta como en el lecho vascular renal.

Hussein y col.³⁸ compararon el remodelado de arterias en ratas SHR y ratas SHR tratadas crónicamente con astaxantina en una dosis de 50 mg/kg/día y encontraron tanto en ramas de arterias coronarias como en aortas, que las ratas tratadas con astaxantina tenían valores menores de W_m y valores mayores de L con respecto a las ratas control. Comentan que en las ratas SHR tratadas con astaxantina, las arterias coronarias presentaron una reducción en W_m y que

esta disminución se vio reflejada en la relación W_m/L , en el caso de la aorta este cambio tuvo el mismo comportamiento junto con una reducción en el número de capas de elastina.

En un estudio, Vasdev y col.²⁰⁷ encontraron que en el lecho vascular renal de ratas SHR los valores de W_m se incrementaban con una reducción en L respecto de las ratas WKY. La administración durante nueve semanas de vitamina C en ratas SHR, produjo una disminución de W_m , aunque el cambio en L fue mínimo. En comparación con el efecto de la vitamina C, en nuestro estudio, la astaxantina sí produce cambios sustanciales en W_m y en L .

En otro trabajo¹²⁵ con vitamina C y E administradas a ratas SHR-SP durante un periodo de 6 semanas, se observó que estas vitaminas eran capaces de reducir la relación W_m/L , consecuencia de una disminución en los valores de W_m pero sin cambios en CSA_m . La utilización de un modelo de hipertensión por infusión de Ang II en ratones machos BALB/c²⁴⁰ dio como resultado un incremento de W_m que no se produjo cuando además se administraba apocinina. En ningún caso se modificó el valor de L . Además cabe destacar que en este trabajo también se asocia la producción de ERO con el remodelado vascular.

Al comparar los resultados obtenidos con astaxantina con un fármaco como el nebivolol en ratas SHR²⁹⁰, encontramos que en arterias intrarrenales de resistencia la reducción que se logró en el valor de W_m con astaxantina (75 mg/kg/día durante dos meses) con respecto a su grupo control SHR fue del 20%, mientras que con nebivolol (8 mg/kg/día durante seis meses) esta reducción fue del 25%. De la misma manera las reducciones correspondientes para la CSA_m fueron respectivamente del 17% y 19%, mientras que el incremento en el valor de L fue de un 25% en ambos casos. Al comparar los cambios producidos por astaxantina y nebivolol en el remodelado de aorta, se obtuvo una reducción en el valor de W_m de 14% con astaxantina y de 25% para el nebivolol, mientras que se redujo el CSA_m un 10% y un 25% respectivamente; en tanto que en el valor medio de L los incrementos fueron

de 8% y 5% respectivamente. Considerando las diferencias de concentración y la naturaleza de la astaxantina como antioxidante, los beneficios producidos por ésta son considerables.

La progresión en la hipertensión incluye dos tipos diferentes de remodelado vascular: eutrófico e hipertrófico²⁷¹. Estos dos fenómenos se pueden presentar en un mismo individuo dependiendo de la localización, del tipo de lecho vascular y del desarrollo mismo de la hipertensión. El remodelado vascular se ha definido como la modificación estructural de los vasos que conlleva a la alteración del grosor de la pared y del lumen. Estas alteraciones pueden ser inducidas por una adaptación pasiva a cambios hemodinámicos crónicos y/o a través de cambios neurohumorales incluyendo la Ang II y las ERO. El remodelado hipertrófico está caracterizado por un incremento en la CSA_m predominantemente en arterias de conductancia y pequeñas arterias en hipertensión secundaria, por ejemplo, pacientes con hipertensión renovascular y ratas hipertensas mediante la infusión de Ang II. En este caso se produce un incremento del tamaño de las células y un aumento de la acumulación de matriz extracelular como colágeno y fibronectina siguiendo el mismo patrón de los modelos animales^{272,273}. Así, para el remodelado hipertrófico es necesaria la hipertrofia de las CMLV y la síntesis de matriz extracelular, tanto el estrés mecánico de los vasos como los mediadores humorales como la Ang II contribuyen al remodelado hipertrófico^{274,275,276}.

Aunque se sabe por ensayos en cultivos de CMLV, que la hipertrofia inducida por Ang II está mediada por H₂O₂ generado a su vez de manera dependiente de la NAD(P)H oxidasa^{198,277}; la contribución de las ERO a este proceso está aún por dilucidar^{278,279}.

El remodelado eutrófico está caracterizado por la reducción en el L, engrosamiento W_m, incremento de W_m/L y usualmente poco cambio en el CSA_m, en este caso el cambio en el tamaño de CMLV es prácticamente nulo²⁸⁰, mientras que el crecimiento de la capa media hacia el lumen corresponde a una reorganización de células y de material extracelular

existente en la pared vascular y apoptosis en la periferia del vaso²⁸¹. Este proceso es común en arterias pequeñas de resistencia de ratas SHR²⁸². A pesar de ello, las causas determinantes de cada tipo de remodelado no han sido claramente dilucidadas. Lo que las investigaciones han demostrado es que el remodelado vascular se puede mejorar por medio de tratamientos con tempol, vitaminas antioxidantes¹²⁵, antagonistas de los receptores de Ang II e inhibidores de la NAD(P)H oxidasa, tanto en modelos animales como en estudios clínicos^{283,284}.

En los tres modelos de HTA estudiamos la producción basal y estimulada de $\bullet\text{O}_2^-$ en anillos de aorta y el comportamiento fue el mismo. La producción basal no se modificó significativamente entre los grupos control y los tratados con astaxantina. Sin embargo, cuando se estimuló la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ con NADPH, además del incremento esperado en la magnitud de la respuesta, las diferencias entre los grupos experimentales se hicieron evidentes. En los tres modelos la producción estimulada fue menor en los grupos experimentales donde se administró astaxantina (Figuras 28, 42 y 53). Cardounel y col.²⁶¹ han evaluado la capacidad de la astaxantina como “scavenger” de radicales libres en un sistema *in vitro* con neutrófilos humanos donde se activó el sistema de generación de $\bullet\text{O}_2^-$, en su trabajo encontramos dos hechos principales: que la astaxantina en las concentraciones que utilizaron (alrededor 100 μM) puede eliminar de manera prácticamente completa la señal producida por el $\bullet\text{O}_2^-$ y que no existe diferencia en la eficiencia como “scavengers” de los diferentes estereoisómeros de la astaxantina, por lo que se intuye que la cadena hidrocarbonada con sus dobles enlaces conjugados es la responsable de este efecto.

Estos datos estarían en concordancia con otros autores que han trabajado con antioxidantes como la quercetina y que encuentran diferencias significativas en la producción estimulada de $\bullet\text{O}_2^-$, pero no así en la producción basal²⁴⁷. Esto se corroboró además mediante la utilización de una sonda fluorogénica como el DHE. Mediante esta técnica pudimos comprobar *in situ* que la

producción de $\bullet\text{O}_2^-$ en aortas del grupo SHR-Axt 75 fue significativamente menor a la producción de los anillos de aortas del grupo SHR-Control (Figura 29). Se sabe que la producción observada corresponde a $\bullet\text{O}_2^-$ debido a que el DHE es una sonda específica del $\bullet\text{O}_2^-$ y no de otras especies reactivas que son capaces de oxidar otro tipo de sondas fluorogénicas^{285,286}.

En condiciones basales la infusión de Ang II no modificó la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ pero cuando ésta se estimuló con NADPH, el grupo Ang II fue el que mostró los valores más altos. Hay que recordar que la Ang II estimula la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ por medio del aumento en la expresión de Nox4, p22^{phox} y de p47^{phox} como lo han demostrado diversos estudios^{241,287,288}. Los grupos Sham y Ang II Axt mostraron producciones significativamente menores de $\bullet\text{O}_2^-$, por lo que la administración de astaxantina redujo la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ o la actividad NAD(P)H oxidasa a niveles similares a los presentados por el grupo Sham (Figura 42)

En el modelo con ratones *Vav3*^{-/-}, sucedió lo mismo en condiciones basales, a pesar de que el grupo donde se administró astaxantina tuvo una tendencia a disminuir, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, al estimular la actividad NAD(P)H oxidasa, la administración de astaxantina sí que reduce significativamente la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ hasta en un 32% con respecto al grupo *Vav3*^{-/-} (Figura 53).

Se sabe que el $\bullet\text{O}_2^-$ derivado de la NAD(P)H oxidasa tiene un papel muy importante en la hipertensión producida por la Ang II ya sea por una activación elevada del sistema SRA o por la infusión directa de ésta^{241,289}. Se han realizado diversos estudios con fármacos donde se relaciona una mejor función vascular con reducción de la actividad de la NAD(P)H oxidasa y por lo tanto de la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ ^{137,138}. Sin embargo, los estudios utilizando vitaminas antioxidantes son más escasos. Viridis y col.²⁴⁰, han relacionado la disminución de la PA, una mejor relajación endotelio dependiente y una mejor estructura vascular con la inhibición de la NAD(P)H oxidasa por medio de apocinina suministrada en el alimento. Otros autores han demostrado que

la administración de vitaminas C y E disminuye la producción vascular de $\bullet\text{O}_2^-$ e incrementa el estado antioxidante en los animales tratados. Desde su perspectiva, estos resultados confirman las propiedades antioxidantes de las vitaminas utilizadas e indican que el tratamiento disminuye la generación de radicales libres e incrementa la defensa antioxidante en su modelo de estudio. Estos hechos pueden relacionarse con la capacidad que tienen estas vitaminas como “scavengers” de radicales libres. Sin embargo, es posible que estas mismas vitaminas puedan también influenciar el estado redox a nivel vascular, modulando la actividad de los sistemas enzimáticos que generan las ERO. En otros estudios relacionan los beneficios que se producen en la función endotelial de ratas SHR mediante la administración crónica de quercetina con una regulación a la baja de la expresión de uno de los componentes de la NAD(P)H oxidasa y con un incremento en la actividad de la eNOS²⁴⁷. Así mismo, otros investigadores han encontrado una regulación a la baja de la expresión de la NAD(P)H oxidasa en presencia de polifenoles, lo que se relacionaría con una modulación de la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ por parte de los antioxidantes²⁹⁰.

Nosotros hemos encontrado por medio de los modelos de HTA utilizados, que el tratamiento con astaxantina disminuye la actividad estimulada de la NAD(P)H oxidasa. Debido a que la NAD(P)H oxidasa es la principal fuente de $\bullet\text{O}_2^-$ a nivel vascular²⁸³, la disminución de la actividad de esta enzima encontrada en anillos de aorta, asociada a la administración de astaxantina nos sugeriría una menor producción no sólo de $\bullet\text{O}_2^-$ sino de otras ERO derivadas de éste. Por otro lado, la mayor actividad de la SOD también asociada a la administración de astaxantina en el modelo 2 de HTA conllevaría a una mayor dismutación del $\bullet\text{O}_2^-$ y a la disminución de su concentración. Con nuestros datos, no podemos discriminar cuál de estos factores contribuye más a la mejora en el estado redox sugerido por la disminución en la concentración de MDA tanto en plasma como en hígado como se mostrará más adelante (Figuras 43).

Los mecanismos por los cuales las vitaminas antioxidantes regulan la NAD(P)H oxidasa, la SOD u otras enzimas antioxidantes, están por definirse, aunque se estima que estas vitaminas tienen un papel importante en la regulación a nivel transcripcional o post-translacional de estos sistemas enzimáticos²⁹¹. En este sentido se ha mencionado que vitaminas como la E, dado su carácter hidrofóbico, al ubicarse en las membranas celulares pueden interferir en el acoplamiento de sistemas enzimáticos como la NAD(P)H oxidasa^{238,291,292,293}.

Los mecanismos por los cuales los antioxidantes tienen influencia en la función vascular pueden estar relacionados con su papel de “scavengers” del $\bullet\text{O}_2^-$, ya que éste es capaz de reaccionar con el NO producido en el endotelio y disminuir su biodisponibilidad. Si la astaxantina es capaz de eliminar el $\bullet\text{O}_2^-$ y esto se relaciona con un aumento de la biodisponibilidad del NO, tal como se ha demostrado en el lecho vascular renal del modelo con ratas SHR, la astaxantina también puede influir en la actividad de la eNOS aumentando los niveles de BH_4 los cuales a su vez incrementan la síntesis de NO^{202,204,221}. Aunque en nuestro trabajo no determinamos los nitritos y los nitratos, hay estudios que demuestran que las vitaminas antioxidantes incrementan la actividad eNOS y la síntesis de NO en arterias de SHR²⁰³.

En los últimos años ha cobrado más fuerza la relación que existe entre la hipertensión y la pérdida del balance entre la producción de ERO y los antioxidantes⁹⁴. En este sentido los sistemas antioxidantes tanto endógenos como exógenos juegan un papel muy importante en la prevención y limitación de los daños provocados por una producción excesiva de ERO. No sólo se relaciona la hipertensión con las ERO sino que éstas también se han relacionado con el infarto de miocardio y con otras cardiopatías²⁹⁴.

Se ha propuesto que la hipertensión estimula la producción de diferentes tipos de ERO, que a su vez son mediadores del daño vascular y de la lipoperoxidación de las membranas celulares, lo que está implicado en la disfunción de las células endoteliales. Está demostrado que un incremento en

las ERO produce pérdida de dilatación en diversos tipos de vasos, por ejemplo en pacientes con hipertensión severa se ha observado que existe una pérdida de vasodilatación en arterias de resistencia²⁹⁵. Como se ha mencionado en los párrafos anteriores, el SRA es parte fundamental en el desarrollo y establecimiento de la hipertensión, por otro lado, también se ha mencionado la importancia de la Ang II como inductora de la generación de ERO^{296,297}. Por estas razones nos pareció importante determinar las relaciones entre el desarrollo de la hipertensión mediante la infusión de Ang II y el estado de algunos parámetros relacionados con el estrés oxidativo como la concentración de MDA en el plasma y en el hígado y las actividades enzimáticas en hígado de SOD, CAT y GPx.

En este modelo de hipertensión, encontramos que la infusión de Ang II producía un incremento del estrés oxidativo en los animales, ya que aumentó la concentración de MDA en el plasma del grupo experimental Sham de $4,8 \pm 1,0$ a $5,5 \pm 0,6$ nmol/ml en el grupo Ang II. Y aunque en el hígado este incremento fue mínimo, concuerda con los resultados de otros autores que observan un incremento en los valores de MDA cuya magnitud depende del modelo de hipertensión del que se trate^{298,299}. En este sentido la administración de astaxantina tuvo un efecto positivo, ya que disminuyó la concentración de MDA en plasma un 42% y un 20% en el hígado.

En el caso de la SOD se ha relacionado la hipertensión con una disminución en su actividad. Nosotros encontramos que el aumento de las PAS asociado a la infusión de Ang II produjo una reducción de la actividad de la SOD de $97,6 \pm 19,3\%$ en el grupo Sham a un $51,0 \pm 17,8\%$ en el grupo Ang II. Nuestros datos estarían en concordancia con datos publicados en modelos animales y en estudios clínicos^{298,300}. Además encontramos que la astaxantina revirtió el efecto negativo de la Ang II en la actividad de la SOD, ya que en el grupo experimental donde se administró la astaxantina la actividad SOD fue, inclusive, ligeramente superior a la del grupo Sham. Esta asociación entre la disminución de la actividad de la SOD con la hipertensión, y su posterior

recuperación mediante el tratamiento con antioxidantes, se ha asociado además a una mejora de la función endotelial de la PAS y del estado oxidativo total en modelos animales^{125,203}.

En lo que corresponde a la actividad de la catalasa, ésta prácticamente no se modificó por la infusión de Ang II, mientras que la administración de astaxantina la redujo significativamente. La literatura existente para esta enzima es en algunas ocasiones contradictoria ya que existen investigaciones que mencionan incrementos de la actividad de la catalasa en los animales hipertensos en relación a los normotensos^{298,301}, en tanto que otras dan valores superiores de actividad de la catalasa para las ratas SHR³⁰².

La respuesta en la actividad de la GPx fue similar a la anterior, ya que la infusión de Ang II no produjo un cambio significativo en ésta. Sin embargo en este caso, la astaxantina sí incremento significativamente la actividad de la GPx, este incremento fue del 44% con respecto al grupo experimental Ang II. Nuestros resultados concuerdan con la literatura en este sentido ya que la actividad de la GPx normalmente es menor en los grupos experimentales hipertensos, produciéndose un incremento en tratamientos con antioxidantes, según describen el grupo de Duarte^{303,304}.

Como hemos mencionado, la actividad de la catalasa fue la única que disminuyó con la administración de la astaxantina, aspecto que nos llamó la atención sobre todo pensando en que encontramos un incremento en la actividad de la SOD, y que ésta al dismutar el $\bullet\text{O}_2^-$ produce H_2O_2 que es el sustrato de la catalasa. Sin embargo, creemos que el incremento de la actividad de la GPx está relacionado con un efecto compensatorio, pues hay que recordar que la GPx es también capaz de utilizar el H_2O_2 como sustrato para producir H_2O y O_2 . Con los datos obtenidos, podemos decir que la infusión de Ang II produce un incremento del estado de oxidación, en tanto que la administración de astaxantina disminuye el estrés oxidativo producido por la Ang II e inclusive en algunos parámetros llega a revertirlo como en el caso de la actividad de la SOD.

Conclusiones

- La administración de astaxantina en la dieta en las distintas dosis ensayadas fue capaz de disminuir la PA en los tres modelos de HTA utilizados: ratas genéticamente hipertensas, ratones con hipertensión inducida por angiotensina II y ratones deficientes en la proteína Vav3.
- La hipertrofia cardíaca que caracteriza a estos modelos de hipertensión, disminuyó de manera estadísticamente significativa con la administración de astaxantina. La reducción de la fibrosis podría contribuir a este efecto.
- La astaxantina mejoró la funcionalidad vascular en arterias de resistencia pero no en arterias de conductancia.
- El tratamiento con astaxantina redujo, de manera significativa, la formación de $\bullet\text{O}_2^-$ estimulada con NADPH en anillos de aorta procedentes de los tres modelos de hipertensión.
- En las condiciones del estudio, la astaxantina redujo el remodelado en vasos de resistencia y de conductancia de ratas SHR. En la hipertensión inducida por angiotensina, la astaxantina redujo el estrés oxidativo y la fibrosis asociados a este modelo.

Bibliografía

-
- ¹ Rodríguez-Amaya D. Carotenoids and food preparation: The retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. pp 3-13. OMNI Proyect. Office of Health and Nutrition. U.S. Agency for International Development. Washington DC, 1997.
- ² Krinsky N- Actions of carotenoids in biological systems. *Annu Rev Nutr.* 1993; 13:561-587.
- ³ Kull D and Phander H. Appendix: List of new carotenoids. pp 295-317. In Britton G, Liaaen-Jensen S, and Pfander, H (Eds) *Carotenoids: Isolation and Analysis. Volumen 1A.* 1995. Birkhäuser. Basel.
- ⁴ IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of carotenoides (Rules approved 1974). *Pure Appl Chem.* 1975. 41:407-431.
- ⁵ Weesie R, Askin D, Hansen F, de Groot H, Lugtenburg J and Britton G. Protein-chromophore interactions in crustacyanin, the mayor blue carotenoprotein from the carapace of the lobster *Homarus gammarus*. A study by ¹³C magic angle spinning NMR. *FEBS Lett.* 1995; 362:34-38.
- ⁶ Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine.* 2nd Edition. Clarendon. 1989. Oxford.
- ⁷ Coral G, Huberman A, De la Lanza G, Monroy-Ruiz J. Muscle pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on oil-extracted pigment from langostilla (*Pleuroncodes planipes*) compared with two commercial sources of astaxanthin. *J Aquatic Food Prod Tech.* 1998; 7:31-45.
- ⁸ Civera R, Goytortúa E, Rocha S, Nolasco H, Vega-Villasante F, Balart E, Amador E, Ponce G, Colado G, Lucero J, Rodríguez C, Solano J, Flores-Tom A, Monroy-Ruiz J, Coral G. Uso de la langostilla roja *Pleuroncodes planipes* en la nutrición de organismos acuáticos. pp 349-365 En: Civera-Cerecedo R, Pérez-Estrada C, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez E. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuicola IV.* 2000. México.

-
- ⁹ Terão J. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*. 1989; 24:659-661.
- ¹⁰ Coral-Hinostroza G, Ytrestbyl T, Ruyter B, Bjerkeng B. Plasma appearance of unesterified astaxanthin geometrical E/Z and optical R/S isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3'R/S isomers of astaxanthin fatty acyl diesters. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2004; 139:99-110.
- ¹¹ Mercke J, Lignell A, Pettersson A, Hoglund P. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *Eur J Pharm Sci*. 2003; 19:299-304.
- ¹² O'Connor I, O'Brien N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 1998;16:226-230.
- ¹³ Guerin M, Huntley M, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol*. 2003; 21:210-216.
- ¹⁴ Landrum J, Bone R, Moore L, Gómez C. Analysis of zeaxanthin distribution within individual human retinas. *Methods Enzymol*. 1999; 299:457-467.
- ¹⁵ Bennedsen M, Wang X, Willen R, Wadstrom T, Andersen L. Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunol Lett*. 1999; 70:185-189.
- ¹⁶ Tanaka T, Morishita Y, Suzui M, Kojima T, Okumura A, Mori H. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis*. 1994; 15:15-19.
- ¹⁷ Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res*. 1995; 55:4059-4064.
- ¹⁸ Tanaka T, Kawamori T, Ohnishi M, Makita H, Mori H, Satoh K, Hara A. Suppression of azomethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary administration of naturally occurring xanthophylls astaxanthin and canthaxanthin during the postinitiation phase. *Carcinogenesis*. 1995; 16:2957-2963.

-
- ¹⁹ Chew B, Park J, Wong M, Wong T. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice *in vivo*. *Anticancer Res.* 1999; 19:1849-1854.
- ²⁰ Anderson M. Method of inhibiting 5- α reductase with astaxanthin to prevent and treat benign prostate hyperplasia (BPH) and prostate cancer in human males. 2001. US Patent #6277417.
- ²¹ Bertram J. Carotenoids and gene regulation. *Nutr Rev.* 1999; 57:182-191.
- ²² Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol Chem Phys Med NMR.* 1990; 22:27-38.
- ²³ Gradelet S, Le Bon A, Berges R, Suschetet M, Astorg P. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis.* 1998; 19:403-411.
- ²⁴ Jyonouchi H, Zhang L, Tomita Y. Studies of immunomodulating actions of carotenoids. II. Astaxanthin enhances *in vitro* antibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal β -cell activation. *Nutr Cancer.* 1993; 19:269-280.
- ²⁵ Jyonouchi H, Zhang L, Gross M, Tomita Y. Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of *in vivo* and *in vitro* antibody production to T-dependent antigens. *Nutr Cancer.* 1994; 21:47-58.
- ²⁶ Okai Y, Higashi-Okai K. Possible immunomodulating activities of carotenoids *in vitro* cell culture experiments. *Int J Immunopharmacol.* 1996; 18:753-758.
- ²⁷ Jyonouchi H, Sun S, Tomita Y, Gross M. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *J Nutr.* 1995; 124:2483-2492.
- ²⁸ Grant W. Dietary links to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 1997; 2:42-55.

-
- ²⁹ Borlongan C, Kanning K, Poulos S, Freeman T, Cahill D, Sanberg P. Free radical damage and oxidative stress in Huntington's disease. *Folia Med.* 1996; 83:335-341.
- ³⁰ de Rijk M, Breteler M, den Breeijen J, Launer L, Grobbee D, van der Meche F, Hofman A. Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam Study *Arch Neurol.* 1997; 54:762-765.
- ³¹ Ferrante R, Browne S, Shinobu L, Bowling A, Baik M, MacGarvey U, Kowall N, Brown R, Beal M. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1997; 69:2064-2074.
- ³² Touyz R, Schiffrin E. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122:339-352.
- ³³ Praticò D. Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis.* 2005; 181:215-224.
- ³⁴ Gross G, Lockwood S. Cardioprotection and myocardial salvage by disodium diuccinate astaxanthin derivative (*Cardax*TM). *Life Sci.* 2004; 75:215-224.
- ³⁵ Gross G, Hazen S, Lockwood S. Seven day oral supplementation with *cardax*TM (disodium disuccinate astaxanthin) provides significant cardioprotection and reduces oxidative stress in rats. *Mol Cell Biochem.* 2006; 283:23-30.
- ³⁶ Hussein G, Nakamura M, Zhao Q, Iguchi T, Goto H, Sankawa U, Watanabe H. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28:967-971.
- ³⁷ Hussein G, Goto H, Oda S, Iguchi T, Sankawa U, Matsumoto K, Watanabe H. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: II. Vascular reactivity and hemorheology in spontaneously hypertensive rats effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28:47-52.
- ³⁸ Hussein G, Goto H, Oda S, Iguchi T, Sankawa U, Matsumoto K, Watanabe H. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. Antioxidant and histopathological effects in spontaneously hipertensive rats. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29:684-688.

-
- ³⁹ Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod.* 2006; 69:443-449.
- ⁴⁰ Williams B. Evolution of hypertensive disease: a revolution in guidelines. *Lancet.* 2006; 368:6-8.
- ⁴¹ Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. Guía española de hipertensión arterial 2005. *Hipertensión.* 2005; 22 :3-8.
- ⁴² European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee. European Society of Hypertension - European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens.* 2003; 21:1011-1053.
- ⁴³ Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty A, Kjeldsen S, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder R, Boudier S, Zanchetti A. 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; 25:1105-1111.
- ⁴⁴ Chobanian V, Bakris L, Black R, Cushman C, Green A, Izzo L, Jones D, Materson B, Oparil S, Wright J, Roccella E, 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.
- ⁴⁵ Kannel B. Risk stratification in hypertension: new insights from the Framingham Study. *Am J Hypertens.* 2000; 13 Suppl 1:S3-S10.
- ⁴⁶ Lahera V, Cachofeiro Ramos V. La alteración renal no es el principal mecanismo patogénico en el desarrollo de la hipertensión arterial. *Hipertensión* 2004; 21:251-255.

-
- ⁴⁷ Dustan H. Pathophysiology of systemic hypertension. pp 1140-1150. In: Hurst JW (ed). *The Heart, arteries and veins*. McGraw Hill. 1990. New York.
- ⁴⁸ Navar L. The kidney in blood pressure regulation and development of hypertension. *Med Clin North Am*. 1997; 81:1165-1197.
- ⁴⁹ Seravalle G, Cattaneo B, Giannattasio C, Perondi R, Saino A, Grassi G, Mancia G. RAA system and cardiovascular control in normal subjects, hypertensives and patients with congestive heart failure. *J Hum Hypertens*. 1993; 7:S13-S18.
- ⁵⁰ Esther R, Marino M, Howard E. The critical role of tissue angiotensin converting enzymes as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest*. 1997; 99:2375-2385.
- ⁵¹ Naftilan A. Role of the tissue renin-angiotensin system in vascular remodeling and smooth muscle cell growth. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1994; 3:218-227.
- ⁵² Saris J, van Dijk M, Kroon I, Schalekamp M, Danser A. Functional importance of angiotensin-converting enzyme-dependent in situ angiotensin II generation in the human forearm. *Hypertension*. 2000; 35:764-768.
- ⁵³ Urata H, Nishimura H, Ganten D Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens*. 1996; 9:277-284.
- ⁵⁴ Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczko W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol*. 2006; 57:529-539.
- ⁵⁵ Schwartz SM, Liaw L. Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries. *J Cardiovasc. Pharmacol*. 1993; 21:S31-49.
- ⁵⁶ Taubman MB, Berk BC, Izumo S, Tsuda T, Alexander RW, Nadal-Ginard B. Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. *J. Biol. Chem*. 1989; 264:526-530.
- ⁵⁷ Wagenaar L, Voors A, Buikema H, van Gilst W. Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can J Cardiol*. 2002; 18:1331-9.

-
- ⁵⁸ Nicholls M, Robertson J, Inagami T. The renin- Angiotensin system in the twenty-first century. *Blood Press*. 2001; 10:327-343.
- ⁵⁹ Schiffrin E. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med*. 2002; 113:409-418.
- ⁶⁰ Touyz R, Schiffrin E. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000; 52:639-672.
- ⁶¹ Siragy H. The role of the AT₂ receptor in hypertension. *Am J Hypertens*. 2000; 13:62S-67S.
- ⁶² Ferrario C. Role of angiotensin II in cardiovascular disease. Therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2006; 7:3-14.
- ⁶³ Joles J, Koomans H. Causes and Consequences of Increased Sympathetic Activity in Renal Disease. *Hypertension*. 2004; 43:699-706.
- ⁶⁴ Intengan D, Deng Y, Li J, Schiffrin E. Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension*. 1999; 33:569-574.
- ⁶⁵ Jia Z, Xiao L. Novel roles of intracrine angiotensin II and signaling mechanisms in kidney cells *JRAAS*. 2007; 8:23-33.
- ⁶⁶ Takizawa T, Gu M, Chobanian V, Brecher P. Effect of nitric oxide on DNA replication induced by angiotensin II in rat cardiac fibroblasts. *Hypertension*. 1997; 30:1035-1040.
- ⁶⁷ Lüscher TF, Barton M : Endothelins and endotelin receptor antagonists. Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000; 102:2434-2440.
- ⁶⁸ Teruhiko I, Michihiro Y, Shota N, Masafumi N, Yukio S, Eisaku H, Yuji M, Megumi Y, Masaki H, Yoshihiko S. Kazuwa N, Hiroki K, Hirofumi Y, Hisao O. Inhibitory effect of natriuretic peptides on aldosterone synthase. Gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation*. 2003; 107:807-810.

- ⁶⁹ Gimbrone M. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherogenesis. *Am J Cardiol.* 1995; 75:67B-70B.
- ⁷⁰ Vogel A. Heads and hearts. The endothelial connection. *Circulation* 2003; 107:2766-68.
- ⁷¹ Tran K, Ohashi K, Watanabe H. Calcium signaling in endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2000; 48:13-22.
- ⁷² Forman B, Puett W, Virmani R. Endothelial and myocardial injury during ischemia and reperfusion: pathogenesis and therapeutic implications. *J Am Coll Cardiol.* 1989; 13:450-459.
- ⁷³ Flemming I, Busse R. Endothelium-derived epoxyeicosatrienoic acids and vascular function. *Hypertension.* 2006; 47:629-633.
- ⁷⁴ Furchgott F, Zawadzki V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288:373-376.
- ⁷⁵ Palmer R, Ferrige A, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327(6122):524-526.
- ⁷⁶ Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Molecular aspects of medicine.* 2005; 26:3-31.
- ⁷⁷ McMicking J, Xie W. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15:323-350.
- ⁷⁸ Xu W, Charles G, Moncada S. Mapping of genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase in the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively. *Genomics.* 1994; 21:341-348
- ⁷⁹ Beckman S, Koppenol H. Nitric oxide, superoxide, and peroxyinitrite: the good, the bad and ugly. *Am. J. Physiol.* 1996; 271:C1424-C1437.
- ⁸⁰ Jourdain D, Jourdain L. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:28799-28805.

- ⁸¹ Lymar V, Hurst K. Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 1995; 117:8867-8868.
- ⁸² Goldstein S, Czapski G. Tyrosin nitration by simultaneous generation of NO \cdot and \cdot O₂⁻ under physiological conditions. How the radicals do the job. *J Biol Chem.* 2000; 275:3031-3036.
- ⁸³ Wink A, Mitchel B. The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic a cytoprotective mechanisms of nitic oxide. *Free Radical Biol Med.* 1998; 25: 434-456.
- ⁸⁴ Vanhoutte P, Boulanger C, Mombouli J. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol.* 1995; 76:3E-12E.
- ⁸⁵ Li P, Zou A, Campbell W. Regulation of potassium channels in coronary arterial smooth muscle by endothelial-derived vasodilators. *Hypertension.* 1997; 29:262-267.
- ⁸⁶ Vanhoutte P. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertension.* 1996; 14:S83-S93
- ⁸⁷ Schiffrin E, Touyz R. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32:S2-S13.
- ⁸⁸ Neylon B. Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin Exp Pharmacol physiol.* 1999; 26:149-153.
- ⁸⁹ Collins T, Cybulsky M. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest.* 2001; 107:255-264.
- ⁹⁰ Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A, Cassani G, Visioli O. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation.* 1995; 92:1479-1486.
- ⁹¹ Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 39:287-324.

-
- ⁹² Halcox J, Schenke W, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw M, Nour R, Quyyumi A. Prognostic value of coronary vascular endothelial function. *Circulation* 2002; 106:653-658.
- ⁹³ Gokce N, Keaney J, Vita J. Endotheliopathies: clinical manifestations of endothelial dysfunction. p. 901-24. In: Loscalzo J, Scafer A. editors. *Thrombosis and hemorrhage*. Williams and Wilkins; 1998. Baltimore.
- ⁹⁴ Cai H, Harrison D. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844.
- ⁹⁵ Ames, B.N., Shigenaga, M., Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci*. 1993; 90:7915-792.
- ⁹⁶ Martyn D, Frederick M, Von Loehneysen K, Dinauer C, Knaus G. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NAD(P)H oxidases. *Cell Signal*. 2006; 18:69-82.
- ⁹⁷ Rhee G. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006; 312:1882-1883.
- ⁹⁸ Faraci M. Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J Appl Physiol*. 2006; 100:739 -743.
- ⁹⁹ Suvorava T, Lauer N, Kumpf S, Jacob R, Meyer W, Kojda G. Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension *in vivo*. *Circulation*. 2005; 112:2487-2495.
- ¹⁰⁰ Miura H, Bosnjak J, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman D. Role of hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003; 92:e31- e40.
- ¹⁰¹ Chaytor T, Edwards H, Bakker M, Griffith M. Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H₂O₂ in NO-independent relaxations of rabbit arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:15212-15217.

-
- ¹⁰² Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi C, Gutterman D. Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circulation Res.* 2003; 93:573-580.
- ¹⁰³ Paravicini M, Miller A, Drummond R, Sobey G. Flow-induced cerebral vasodilatation *in vivo* involves activation of n-phosphatidylinositol-3 kinase, NAD(P)H-oxidase, and nitric oxide synthase. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26:836-845.
- ¹⁰⁴ Feletou M, Vanhoutte M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. Where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:1215-1225.
- ¹⁰⁵ Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res.* 2004; 528:543-549.
- ¹⁰⁶ Fischer S, Wiesnet M, Renz D, Schaper W. H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. *Europ J Cell Biol.* 2005; 84:687-697.
- ¹⁰⁷ Csiszar A, Smith E, Koller A, Kaley G, Edwards G, Ungvari Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells. Role of nuclear factor- κ B activation by tumor necrosis factor, H₂O₂ and high intravascular pressure. *Circulation.* 2005; 111:2364-2372.
- ¹⁰⁸ Han J, Kwon G, Chung T, Lee K, Simmons L, Billiar R, Kim M. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF- κ B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Nitric Oxide.* 2001; 5:504 -513.
- ¹⁰⁹ Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba S, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, Hess J, Gorkach A. The expression of the NAD(P)H oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radical Biol Med.* 2005; 38:616-630.
- ¹¹⁰ Yang H, Roberts J, Shi J, Zhou C, Ballard R, Richardson A, Guo M. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutases and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res.* 2004;95:1075-1081.

- ¹¹¹ Thengchaisri N, Hein W, Wang W, Xu X, Li Z, Fossum W, Kuo L. Upregulation of arginase by H₂O₂ impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:2035-2042.
- ¹¹² Morris M. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83:508S-512S.
- ¹¹³ Fridovich I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:18515-18517.
- ¹¹⁴ Babior M, Lambeth D, Nauseef W. The neutrophil NAD(P)H oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2002; 397:342-344.
- ¹¹⁵ Hilenski L, Clempus E, Quinn T, Lambeth D, Griendlin K. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1-8
- ¹¹⁶ Duerschmidt N, Wippich N, Goetsch W, Broemme J, Morawietz H. Endothelin-1 induce NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 269:713-717.
- ¹¹⁷ Vasquez-Vivar J, Duquaine D, Whitsett J, Kalyanaraman B, Rajagopalan S. Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1655-1661.
- ¹¹⁸ Bagi Z, Koler A. Lack of nitric oxide mediation of flow-dependent arteriolar dilation in type I diabetes is restored by sepiapterin. *J Vas Res.* 2003; 40:47-57.
- ¹¹⁹ Viridis A, Iglarz M, Neves F, Amiri F, Touyz R, Schiffrin E. Effect of hyperhomocystinemia and hipertensión on endothelial function in methylenetetrahydrofolate reductase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:1352-1357.
- ¹²⁰ Landmesser U, Dikalov S, Price R, McCann L, Fukai T, Holland M, Mitch E, Harrison D. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003; 111:1201-1209.

-
- ¹²¹ Ohara Y, Peterson T, Harrison D. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide production. *J Clin Invest*. 1993, 91:2546-2551.
- ¹²² Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2001; 82:47-95.
- ¹²³ Luft C. Mechanisms and cardiovascular damage in hypertension. *Hypertension*. 2001; 37:594-598.
- ¹²⁴ Zalba G, Beaumont F, San Jose G, Fortuno A, Fortuno M, Etayo J, Diez J. Vascular NADH/NAD(P)H oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2000; 35:1055-1061.
- ¹²⁵ Chen X, Touyz R, Park J, Schiffrin E. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NAD(P)H oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*. 2001; 38:606-611.
- ¹²⁶ Chabrashvili T, Tojo A, Onozato M, Kitiyakara C, Quinn M, Fujita T, Welch W, Wilcox C. Expression and cellular localization of classic NAD(P)H oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension*. 2002; 39:269-274.
- ¹²⁷ Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland S, Harrison D. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 2002; 40:511-515.
- ¹²⁸ Zhan C, Sindhu R, Vaziri N. Up-regulation of kidney NAD(P)H oxidase and calcineurin in SHR: reversal by lifelong antioxidant supplementation. *Kidney Int*. 2004; 65:219-227.
- ¹²⁹ Sharma R, Hodis H, Mack W. Probucol suppresses oxidant stress in hypertensive arteries. Immunohistochemical evidence. *Am J Hypertens*. 1996; 9:577-590.
- ¹³⁰ Wilcox C. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep*. 2002; 4:160-166.

-
- ¹³¹ Laursen J, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman B, Harrison D. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*. 1997; 95:588-593.
- ¹³² Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari M, Lombardi S, Corrocher R. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 1998; 16:1267-1271.
- ¹³³ Manning R, Meng S, Tian N. Renal and vascular oxidative stress and salt-sensitivity of arterial pressure. *Acta Physiol Scand*. 2003; 179:243-250.
- ¹³⁴ Lip G, Edmunds E, Nuttall S, Landray M, Blann A, Beevers D. Oxidative stress in malignant and non-malignant phase hypertension. *J Hum Hypertens*. 2002; 16:333-336.
- ¹³⁵ Lee V, Quinn P, Jennings S, Ng L. Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in preeclampsia. *Hypertension*. 2003; 21:395-402.
- ¹³⁶ Touyz R, Yao G, Schiffrin E. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:981-987.
- ¹³⁷ Ghiadoni L, Magagna A, Versari D, Kardasz I, Huang Y, Taddei S, Salvetti A. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. *Hypertension*. 2003; 41:1281-1286.
- ¹³⁸ Cai H, Griendling K, Harrison D. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24:471-478.
- ¹³⁹ Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-2012.
- ¹⁴⁰ Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma O. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol*. 1995; 7:601-617.
- ¹⁴¹ Chan H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cerebral Blood Flow Metabol*. 2001; 21:2-14.

-
- ¹⁴² Darley-USmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters*. 1995; 369:131-135.
- ¹⁴³ MacMillan-Crow A, Cruthirds L. Manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radical Res*. 2001; 34:325-336.
- ¹⁴⁴ Oliver J, Murcia M, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet C, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- κ B activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J*. 1999; 18:4446-4454.
- ¹⁴⁵ Cooke L, Davidge T. Peroxynitrite increases iNOS through NF- κ B and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. *Am J Physiol*. 2002; 282:C395-C402.
- ¹⁴⁶ Laursen B, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman A, Tarpey M, Fukai T, Harrison D. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice. Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001; 103:1282-1288.
- ¹⁴⁷ Zou H, Shi C, Cohen A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002; 109:817-826.
- ¹⁴⁸ Blanc A, Pandey R, Srivastava K. Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease. *International J Molec Med*. 2003; 11:229-234.
- ¹⁴⁹ Sobey G, Heistad D, Faraci M. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation: evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke*. 1997; 28:2290-2295.
- ¹⁵⁰ Matoba T, Shimokawa H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci*. 2003; 92:1-6.
- ¹⁵¹ Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, Kubota H, Akaike T, Talukder H, Hatanaka M, Fujiki T, Maeda H, Takahashi S, Takeshita A. Pivotal role of Cn,Zn-

superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J Clin Invest.* 2003; 112:1871-1879.

¹⁵² Marklund L. Extracellular superoxide dismutase. *Methods Enzymol.* 2002; 349:74-80.

¹⁵³ Didion P, Ryan J, Didion A, Fegan E, Sigmund D, Faraci M. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res.* 2002; 91:938-944.

¹⁵⁴ Veerareddy S, Cooke L, Baker N, Davidge T. Gender differences in myogenic tone in the superoxide dismutase knockout mouse: an animal model of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287:H40-H45.

¹⁵⁵ Cooke L, Davidge T. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003; 60:635-642.

¹⁵⁶ Baumbach L, Didion P, Faraci M. Deficiency of copper-zinc superoxide dismutase promotes cerebral vascular hypertrophy. *FASEB J.* 2003; 17:A63-A64.

¹⁵⁷ Ishibashi M, Hiasa K, Zhao Q, Inoue S, Ohtani K, Kitamoto S, Tsuchihashi M, Sugaya T, Charo F, Kura S, Tsuzuki T, Ishibashi T, Takeshita A, Egashira K. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling. *Circulation Res.* 2004; 94:1203-1210.

¹⁵⁸ Zanetti M, Sato J, Katusic S, O'Brien T. Gene transfer of superoxide dismutase isoforms reverses endothelial dysfunction in diabetic rabbit aorta. *Am J Physiol.* 2001; 280:H2516-H2523.

¹⁵⁹ Miller J, Gutterman D, Rios D, Heistad D, Davidson L. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res.* 1998; 82:1298-1305.

¹⁶⁰ Packer L, Ed. *Methods in Enzymology, Volume 349.* San Diego, California Academic Press; 2002.

-
- ¹⁶¹ Suzuki K, Tatsumi H, Satoh S, Senda T, Nakata T, Fujii J, Taniguchi N. Manganese-superoxide dismutase in endothelial cells: localization and mechanism of induction. *Am J Physiol.* 1993; 265:H1173-H1178.
- ¹⁶² Napoli C, Witztum L, de Nigris F, Palumbo G, D'Armiento P, Palinski W. Intracranial arteries of human fetuses are more resistant to hypercholesterolemia-induced fatty streak formation than extracranial arteries. *Circulation.* 1999; 99:2003-2010.
- ¹⁶³ Michelakis D, Hampl V, Nsair A, Wu C, Harry G, Haromy A, Gurtu R, Archer L. Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. *Circulation Res.* 2002; 90:1307-1315.
- ¹⁶⁴ Zanetti M, Sato J, Jost J, Gloviczki P, Katusic S, O'Brien T. Gene transfer of manganese superoxide dismutase reverses vascular dysfunction in the absence but not in the presence of atherosclerotic plaque. *Human Gene Therapy.* 2001; 12:1407-1416.
- ¹⁶⁵ Li L, Fink D, Watts W, Northcott A, Galligan J, Pagano J, Chen F. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NAD(P)H oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation.* 2003; 107:1053-1058.
- ¹⁶⁶ Marklund L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J.* 1984; 222:649-655.
- ¹⁶⁷ Sandström J, Carlsson L, Marklund L, Edlund T. The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase C and formation of variants with reduced heparin affinity. *J Biol Chem.* 1992; 267:18205-18209.
- ¹⁶⁸ Fukai T, Folz J, Landmesser U, Harrison D. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002; 55:239-249.
- ¹⁶⁹ Stralin P, Marklund L. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am J Physiol.* 2001; 281:H1621-H1629.
- ¹⁷⁰ Davis E, Cai H, McCann L, Fukai T, Harrison D. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *Am J Physiol.* 2003; 284:H1449-1453.

- ¹⁷¹ Wolin S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1430-1442.
- ¹⁷² Jung O, Marklund L, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes P. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability. *In vivo* and *ex vivo* evidence from ecSOD-deficient mice. *Circulation Res.* 2003; 93:622-629.
- ¹⁷³ Liu Q, Folz J. Extracellular superoxide enhances 5-HT induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287:L111-L118.
- ¹⁷⁴ Demchenko T, Oury D, Crapo D, Piantadosi A. Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circulation Res.* 2002; 91:1031-1037.
- ¹⁷⁵ Chu Y, Iida S, Lund D, Weiss R, DiBona G, Watanabe Y, Faraci F, Heistad D. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of the heparin binding domain. *Circulation Res.* 2003; 92:461-468.
- ¹⁷⁶ Morgenstern R, Cotgreave I, Engman L. Determination of the relative contributions of the diselenide and selenol forms of ebselen in the mechanism of its glutathione peroxidase-like activity. *Chem Biol Interactions.* 1992; 84:77-84.
- ¹⁷⁷ d'Uscio L, Milstien S, Richardson D, Smith L, Katusic Z. Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 2003; 92:88-95.
- ¹⁷⁸ Levine G, Frei B, Koulouris S, Gerhard M, Keaney J, Vita J. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1996; 93:1107-1113.
- ¹⁷⁹ Ting H, Timimi F, Boles K, Creager S, Ganz P, Creager M. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1996; 97:22-28.

-
- ¹⁸⁰ Solzbach U, Horning B, Jeserich M, Just H. Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. *Circulation*. 1997; 96:1513-1519.
- ¹⁸¹ McBride M, Charchar F, Graham D, Miller W, Strahorn P, Carr F, Dominicczak A. Functional genomics in rodent models of hypertension. *J Physiol*. 2003; 554:56-63.
- ¹⁸² Sauzeau V, Sevilla M, Rivas-Elena J, Montero M, López-Novoa J, Bustelo X. Vav 3 proto-oncogene deficiency leads to sympathetic hyperactivity and cardiovascular dysfunction. *Nat Med*. 2006; 12:841-845.
- ¹⁸³ American Institute of Nutrition. American Institute of Nutrition (AIN) report of the AIN ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr*. 1977; 107:1340-1348.
- ¹⁸⁴ Kurtz T, Griffin A, Bidani A, Davisson R, Hall J. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. *Hypertension*. 2005; 45:299-310.
- ¹⁸⁵ Fulton R, Hutchinson E, Morgan-Jones A. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J*. 1952; 14:413-420.
- ¹⁸⁶ Faulkner K, Fridovich I. Luminol and lucigenin as detectors for $\bullet\text{O}_2^-$ Free Radic Biol Med. 1993; 15:447-451.
- ¹⁸⁷ Münzel T, Afanas'ev I, Kleschyov A, Harrison D. Detection of superoxide in vascular tissue. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 22:1761-1768.
- ¹⁸⁸ Jamal I, Finelli V, Que S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem*. 1981; 112:70-75.
- ¹⁸⁹ Fort J, Pilette C, Oberti F, Veal N, Gallois Y, Douay O, Calès P. Long-term administration of PGE1 increases liver fibrosis and collateral blood flow in bile-duct-ligated rats. *J Hepatol*. 1999; 30:70-76
- ¹⁹⁰ Draper H, Squires E, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Rad Biol Med*. 1993; 15:353-363.

- ¹⁹¹ Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95:351-358.
- ¹⁹² Peskin V, Winterbourn C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta.* 2000; 293:157-166.
- ¹⁹³ Aebi H. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed. (Bergmeyer, H.U., ed.). Verlag Chemie, Weinheim, Germany. 1974. 673-684.
- ¹⁹⁴ Lawrence R, Burk R. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 71:952-958.
- ¹⁹⁵ Kearny P, Whelton M, Reynolds K, Munter P, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005; 365:217-223.
- ¹⁹⁶ Landmesser U, Harrison D. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis.* 2001; 12:455-46.
- ¹⁹⁷ Zalba G, San José G, Moreno M, Fortuno A, Beaumont F, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of the NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 2001; 38:1395-1399.
- ¹⁹⁸ Zafari A, Ushio-Fukai M, Akers M, Griendling K. Role of the NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1998; 32:488-495.
- ¹⁹⁹ Touyz R, Schiffrin E. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999; 34:976-982.
- ²⁰⁰ Harrison D. Cellular and molecular mechanism of endothelial dysfunction. *J Clin Invest.* 1997; 99:2153-2157.
- ²⁰¹ Williams T, Chambers J, May O, Henderson R, Rashotte M, Overton J. Concurrent reductions in blood pressure and metabolic rate during fasting in the unrestrained SHR. *Am J Physiol regulatory Comp physiol.* 2000; R255-R262.

-
- ²⁰² Newaz M, Nawal N. Effect of γ -tocotrienol on blood pressure, lipid peroxidation and total antioxidant status in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Clin Exp Hypertens*. 1999; 21:1297-1313.
- ²⁰³ Newaz M, Nawal N. Effect of α -tocopherol on lipid peroxidation and total antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Amer J Hypertens*. 1998; 11:1480-1485.
- ²⁰⁴ Newaz M, Nawal N, Rohaizan C, Muslim N, Gapor A. α -Tocopherol increased nitric oxide synthase activity in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Amer J Hypertens*. 1999; 12:839-844.
- ²⁰⁵ Koba K, Abe K, Ikeda I, Sugano M. Effects of alpha tocopherol and tocotrienols on blood pressure and linoleic acid metabolism in the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Biosc Biotechnol Biochem*. 1992; 56:1420-1423.
- ²⁰⁶ Yoshioka M, Aoyama K, Matsushita T. Effects of ascorbic acid on blood pressure and ascorbic acid metabolism in spontaneously hypertensive rats (SH rats). *Int J Vitam Nutr Res*. 1985; 55:301-307.
- ²⁰⁷ Vasdev S, Ford C, Parai S, Longerich L, Gadag V. Dietary vitamin C supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Biol Mol Cell*. 2001; 218:97-103.
- ²⁰⁸ Ülker S, McKeown P, Bayraktutan U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension*. 2003; 41:534-539.
- ²⁰⁹ Hemila H. Vitamin C and lowering of blood pressure: Need for intervention trials? *J Hypertens*. 1991; 9:1076- 107.
- ²¹⁰ Feldman B. The role of vitamin C and antioxidants in hypertension. *Nutr MD*. 1998; 24:1-4.
- ²¹¹ Enster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1271:195-204.

-
- ²¹² Gale R, Martyn N, Winter D, Cooper C. Vitamin C and risk of death from stroke and coronary heart disease in a cohort of elderly people. *BMJ*. 1995; 310:1563-1566.
- ²¹³ Egan A, Garg R, Wilt J, Pettinger B, Davis B, Crouse J, Herd A, Hunninghake B, Sheps S, Kostis B, Probstfield J, Waclawiw A, Applegate W, Elam MB. Rationale and design of the Arterial Disease Multiple Intervention Trial (ADMIT) pilot study. *Am J Cardiol*. 1999; 83:569- 575.
- ²¹⁴ Block G, Mangels R, Norkus P. Ascorbic acid status and subsequent diastolic and systolic blood pressure. *Hypertension*. 2001; 37:261-267.
- ²¹⁵ Paran E, Engelhard Y. Effect of tomato's lycopene on blood pressure, serum lipoproteins, plasma homocysteine and oxidative stress markers in grade I hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2001; 14:141A.
- ²¹⁶ List M, Kolsch B, Volker C, Gorren C, Sessa C, Werner R, Kukovetz R, Schmidt K, Meyer B. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J*. 1997; 323:169-165.
- ²¹⁷ Somers J, Harrison D. reactive oxygen species and the control of vasomotor tone. *Curr Hipertens Rep*. 1999; 1:102-108.
- ²¹⁸ Szabo C. Multiple pathways in peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett*. 2003; 140:105-112.
- ²¹⁹ Viridis A, Iglarz M, Neves M, Amiri F, Touyz M, Schiffrin E. Effect of hyperhomocystinemia and hypertension on endothelial function in methylenetetrahydrofolate reductase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 1352-1357.
- ²²⁰ Mitchel M, Dorrance M, Ergul A, Webb C. Sepsipaterin decreases vasorelaxation in nitric oxide synthase inhibition induced hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 43:93-98.

-
- ²²¹ Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 1998; 97:2222-2229.
- ²²² Si H, Heyken W, Wölfle S, Tysiac M, Schubert R, Grgic I, Vilianovich L, Giebing G, Maier T, Gross V, Bader M, Wit C, Hoyer J, Köhler R. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Circ Res*. 2006; 99:537-544.
- ²²³ Riganti C, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 212:179-187.
- ²²⁴ Touyz R. Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells. A complex matter. *Hypertension*. 2008; 51:172-174.
- ²²⁵ Heumüller S, Wind S, barbosa-Sicard E, Schmidt H, Busse R, Schröder K, Brandes R. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension*. 2008; 51:211-217.
- ²²⁶ Vejrazka M, Mícek R, Stípek S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1722:143-147.
- ²²⁷ Villalobos-Medina R, López-Guerrero J, Ibarra M. Functional evidence of α 1-D adrenoreceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1999; 126:1534-1536.
- ²²⁸ Küng F, Lüscher F. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension*. 1995; 25:194-200.
- ²²⁹ Chu C, Kunitake T, Kato K, Watanabe S, Qiu D, Tanoue A, Kannan H. The α_{1D} -adrenergic receptor modulates cardiovascular and drinking responses to central salt loading in mice. *Neurosci Lett*. 2004; 356:33-36.
- ²³⁰ Vecchione C, Fratta L, Rizzoni D, Notte A, Poulet R, Porteri E, Frati G, Guelfi D, Trimarco V, Mulvany M, Agabiti-Rosei E, Trimarco B, Cotecchia S, Lembo

G. Cardiovascular influences of α_{1b} adrenergic receptor defect in mice. *Circulation*. 2002; 105:1700-1707.

²³¹ Silan C. The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetics rats. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31:897-902.

²³² Touyz R, Endemann D, He G, Li J-S, Schiffrin E. Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small arteries in young SHR. *Hypertension*. 1999; 33:366-373.

²³³ Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998; 32:467-472.

²³⁴ Lifton P, Gharavi G, Geller S. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 2001; 104:545-556.

²³⁵ DiBona, G.F. The sympathetic nervous system and hypertension: recent developments. *Hypertension*. 2004; 43:147-150.

²³⁶ Otsuka F, Yamauchi T, Ogura T, Takahashi M, Kageyama J, Makino H. Renal c-fos expression induced by angiotensin II is enhanced in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 1998; 63:2089-2095.

²³⁷ Schiffrin E, Thome' S, Genest J. Vascular angiotensin II receptors in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1984; 6:682-688.

²³⁸ Pashkow F, Watumull D, Campbell C. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2008; 101 (suppl):58D-68D.

²³⁹ Matsumoto T, d'Uscio L, Eguchi D. Protective effect of chronic Vitamin C treatment on endothelial function of apolipoprotein E-deficient mouse carotid artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 306:103-108.

²⁴⁰ Viridis A, Neves M, Amiri F, Touyz R, Schiffrin E. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hipertens*. 2004; 22:535-542.

- ²⁴¹ Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman A, Griending K, Harrison D. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NAD(P)H oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996; 97:1916-1923.
- ²⁴² Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant L, Lambeth D, Griending K. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.* 2001; 88:888-894.
- ²⁴³ Hamilton A, Brosnan J, McIntyre M, Graham D, Dominiczak F. Superoxide excess in hypertension and aging. A common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 37:529-534.
- ²⁴⁴ Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl A, Wamholtz A, Meinertz T, Griending K, Harrison D. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001; 88:E14-E22.
- ²⁴⁵ Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T, Münzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2000; 87:999-1005.
- ²⁴⁶ Cohn J, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac Remodeling—Concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35:569-582.
- ²⁴⁷ Sánchez M, Galisteo M, Vera R, Villar I, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2006; 24:75-84.
- ²⁴⁸ Pérez-Sepulveda R, Jimenez R, Romero M, Zarzuelo A, Sánchez M, Gómez-Guzman M, Vargas F, O'Valle F, Duarte J. Wine polyphenols improve endothelial function in large vessels of females spontaneously hypertensive rats. *Hipertension.* 2008; 51:1088-1095.

- ²⁴⁹ Sevilla M, Voces F, Carrón R, Guerrero E, Ardanaz N, San Roman L, Arévalo M, Montero M. Amlodipine decreases fibrosis and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: persistent effects after withdrawal. *Life Sci.* 2004; 75:881-891.
- ²⁵⁰ Pechánová O. Contribution of captopril thiol to the prevention of spontaneous hypertension. *Physiol Res.* 2007; (suppl. 1):S41-S48.
- ²⁵¹ Zhai P, Galeotti J, Liu J, Holle E, Yu X, Wagner T, Sadoshima J. An angiotensin II type 1 receptor mutant lacking epidermal growth factor receptor transactivation does not induce Angiotensin II-mediated cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2006; 99:528-536.
- ²⁵² Graiani G, Lagrasta C, Migliaccio E, Spillmann F, Meloni M, Madeddu P, Quaini F, Martin I, Lanfrancone L, Pelicci P, Emanuelli C. Genetic deletion of the p66^{Shc} adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage. *Hypertension.* 2005; 46:433-440.
- ²⁵³ Lu Z, Hu X, Zhu G, Zhang P, van Deel E, French J, Fassett J, Oury T, Bache R, Chen Y. Extracellular superoxide dismutase deficiency exacerbates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction. *Hypertension.* 2008; 51:19-25.
- ²⁵⁴ Kasea H, Hashikabea Y, Uchida K, Nakanishi N, Hattoria Y. Supplementation with tetrahydrobiopterin prevents the cardiovascular effects of angiotensin II-induced oxidative and nitrosative stress. *J Hypertens.* 2005; 23:1375-1382.
- ²⁵⁵ Paul A, Wilson S, Belham C, Robinson C, Scott P, Gould G, Plevin R. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal.* 1997; 9:403-410.
- ²⁵⁶ Ushio-Fukai M, Alexander W, Akers M, Griending K. p38 Mitogen activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 1998; 271:15022-15029.

-
- ²⁵⁷ Wenzel S, Rohde C, Wingerning S, Roth J, Kojda G, Schlüter S. Lack of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide formation favors hypertrophy in adult ventricular cardiomyocytes. *Hypertension*. 2007; 49:193-200.
- ²⁵⁸ Kojima M, Shiojima I, Yamazaki T, Komuro I, Yunzeng Z, Ying W, Mizuno T, Ueki K, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y. Ventricular hypertrophy: angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Circulation*. 1994; 89:2204-221.
- ²⁵⁹ Varo N, Etayo C, Zalba G, Beaumont J, Iraburu J, Montiel C, Gil J, Monreal I, Diez J. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hipertens*. 1999; 17:107-111.
- ²⁶⁰ Rossi M. Pathological fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. *J Hypertens*. 1998; 16:1031-1041.
- ²⁶¹ Cardounel A, Dumitrescu C, Zweier J, Lockwood S. Direct superoxide anion scavenging by disodium disuccinate astaxanthin derivative: Relative efficacy of individual stereoisomers versus the statistical mixture of stereoisomers by electron paramagnetic resonance imaging. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 307:704-712.
- ²⁶² Lijnen P, Papparella I, Petrov V, Semplicini A, Fagard R. Angiotensin II stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species. *J Hipertens*. 2006; 24:757-766.
- ²⁶³ Block K, Assaad E, Griendling K, Lee D, Wittrant Y, Gorin Y. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II. Role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression. *J Biol Chem*. 2008; 283:24061-24076.
- ²⁶⁴ Folkow B. Structural factor in primary and secondary hypertension. *Hypertension*. 1990; 16:89-101.

-
- ²⁶⁵ Chamiot-Clerc P, Renaud J, Safar E. Pulse pressure, aortic reactivity, and endothelium dysfunction in old hypertensive rats. *Hypertension*. 2001; 37:313-21
- ²⁶⁶ Levy B, Duriez M, Phillippe M, Poitevin P, Michel J. Effect of chronic dihydropyridine (isradipine) on the large arterial walls of spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 1994; 37:3024-3033.
- ²⁶⁷ Benetos A, Poitevin P, Prost L, Safar E, Levy I. Life survival and cardiovascular structures following selective beta-blockade in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1994; 7:186-92.
- ²⁶⁸ Guerrero E, Ardanaz N, Sevilla M, Arevalo M, Montero M. Cardiovascular effects of nebivolol in spontaneously hypertensive rats persist after treatment withdrawal. *J Hypertens*. 2006; 24:151-158.
- ²⁶⁹ Griffin A, Brown C, MacPherson F, MacGrath C, Wilson G, Korsgaard N, Mulvany J, Lever F. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*. 1991; 17:626-635.
- ²⁷⁰ Neves M, Viridis A, Schiffrin E. Resistance artery mechanics and composition in angiotensin II infused rats: effects of aldosterone antagonism. *J Hypertens*. 2003; 21:189-198.
- ²⁷¹ Schiffrin E. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens*. 2004; 17:1192-1200.
- ²⁷² Duprez DA. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *J Hypertens*. 2006; 24:983-991.
- ²⁷³ Rizzoni D, Porteri E, Guefi D, Piccoli A, Castellano M, Pasini G, Muiesan L, Mulvany J, Rosei A. Cellular hypertrophy in subcutaneous small arteries of patients with renovascular hypertension. *Hypertension*. 2000; 35:931-935.
- ²⁷⁴ Heerkens H, Izzard S, Heagerty M. Integrins, vascular remodeling, and hypertension. *Hypertension*. 2007; 49:1-4.
- ²⁷⁵ Loirand G, Rolli-Derkinderen M, Pacaud P. RhoA and resistance artery remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288:H1051-1056.

-
- ²⁷⁶ Touyz R. Intracellular mechanisms involved in vascular remodeling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol*. 2005; 90:449-455.
- ²⁷⁷ Griendling K, Minieri A, Ollerenshaw D, Alexander W. Angiotensin II stimulates NADH and NAD(P)H oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994; 74:1141-1148.
- ²⁷⁸ Intengan D, Schiffrin E. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001; 38:581-587.
- ²⁷⁹ Touyz R, He G, El Mabrouk M, Schiffrin E. p38 Map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but no in WKY. *Hypertension*. 2001; 37:574-580.
- ²⁸⁰ Korsgaard N, Aalkjaer C, Heagerty M, Izzard S, Mulvany J. Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1993; 22:523-526.
- ²⁸¹ Rizzoni D, Rodella L, Porteri E, Rezzani R, Guelfi D, Piccoli A, Castellano M, Muiesan L, Bianchi R, Rosei A. Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2000; 18:885-891.
- ²⁸² Mulvany J. Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2002; 4:49-55.
- ²⁸³ Lassègue B, Clempus E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 285:R277-R297.
- ²⁸⁴ Zhou S, Jaimes A, Raij L. Vascular but not cardiac remodeling is associated with superoxide production in angiotensin II hypertension. *J Hypertens*. 2005; 23:1737-1743.
- ²⁸⁵ Zimmerman M, Lazartigues E, Sharma R, Davisson R. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res*. 2004; 95:210-216

-
- ²⁸⁶ Carter O, Narayanan K, Robinson P. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 1994; 55:253-258.
- ²⁸⁷ Poliozio A, Balestrasse K, Yannarelli G, Noriega G, Gorzalczany S, Taira C, Tomaro M. Angiotensin II regulates cardiac hypertrophy via oxidative stress but not antioxidant enzyme activities in experimental renovascular hypertension. *Hypertens Res.* 2008; 31:325-334.
- ²⁸⁸ Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric Oxide/cGMP signaling. *Circ Res.* 2002; 90:58-65.
- ²⁸⁹ Kerr S, Brosnan J, McIntyre M, Reid J, Dominiczak A, Hamilton A. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension. Role of endothelium. *Hypertension.* 1999; 33:1353-1358.
- ²⁹⁰ Ying C, Xu J, Ikeda K, Takahashi K, Nara Y, Yamori Y. Tea polyphenols regulate nicotinamide dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II induced hyperpermeability in endothelial cells. *Hypertens Res.* 2003; 26:823-828.
- ²⁹¹ Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 1999; 37:949-962.
- ²⁹² Carr A, Frei B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Rad Biol Med.* 2000; 28:1806 - 1814.
- ²⁹³ Carr A, Zhu Z, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res.* 2000; 87:349 -354.
- ²⁹⁴ Singhal K, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in genesis of heart disease. *Cardiovas Res.* 1998; 40:426-432.
- ²⁹⁵ De Bruyn H, Nuns W, Cappelli-Biggazzi M, Dole R, Lamping G. Effect of acute hypertension in the coronary vessels. *J Hypertens.* 1994; 12:163-172.

-
- ²⁹⁶ Pravicini T, Touyz R. Redox signaling in hypertension. *Cardiovas Res.* 2006; 71:247-258.
- ²⁹⁷ Touyz R. Oxidative stress in vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Reports.* 2000; 2:98-105.
- ²⁹⁸ Hong H , Johnson P. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in exercised and hypertensive rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995; 27:923-931.
- ²⁹⁹ Binda D, Nicod L, Viollon-Abadie C, Rodriguez S, Berthelot A, Coassolo P, Richert L. Strain difference (WKY, SPRD) in the hepatic antioxidant status in rat and effect of hypertension (SHR, DOCA). Ex vivo and in vitro data. *Mol Cell Biochem* 2001; 218:139-146.
- ³⁰⁰ Kashyap M, Yadav V, Sherawat B, Jain S, Kumari S, Khullar M, Sharma P, Nath R. Different antioxidants status, total antioxidant power and free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2005; 277:89-99.
- ³⁰¹ Kabell K, Ma L, Johnson P. Effects of antihypertensive drugs on rat tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels. *Biochem Pharmacol.* 1977; 54:133-141.
- ³⁰² Elhaïmeur F, Courderot-Masouyer C, Nicod L, Guyon C, Richert L, Berthelot A. Dietary vitamin C supplementation decreases blood pressure in DOCA-salt hypertensive male Sprague-Dawley rats and this is associated with increased liver oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 2002; 237:77-83.
- ³⁰³ Galisteo M, García-Saura M, Jiménez R, Villar I, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2004; 259(1-2):91-99.
- ³⁰⁴ Duarte J, Galisteo M, Ocete M, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, Tamargo J: Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2001; 221:155-160.

Anexo 1

Sustancias utilizadas.

- Soluciones nutricias

1. Solución Krebs. En todas las preparaciones aisladas se utiliza esta solución nutricia, preparada con componentes de calidad de análisis (Merck o Panreac) que se disuelven en agua ultrapura (Labconco-Water Pro, P.S.). Su composición (mM) es la siguiente: NaCl, 118,7; KCl, 4,7; CaCl₂, 2,5; KH₂PO₄, 1,2; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄·7H₂O, 1,2; Glucosa, 11,1. Una vez gaseada con carbógeno se ajusta el pH a 7,4.

2. Solución tampón HEPES. Esta solución se prepara con componentes de calidad de análisis (Merck o Panreac) que se disuelven en agua ultrapura (Labconco-Water Pro, P.S.). Se utilizó en los métodos de cuantificación de la producción de •O₂⁻ por quimioluminiscencia e “in situ”; su composición (mM) es: NaCl 119; HEPES 20; KCl 4,6; MgSO₄ 1,0; Na₂HPO₄ 0,15; KH₂PO₄ 0,4; NaHCO₃ 5,0; CaCl₂ 1,2 y glucosa 5,5 a un pH de 7,4.

- Sustancias utilizadas

1. Agonistas. Para los estudios de funcionalidad de vasos sanguíneos se preparan soluciones madre (1×10^{-1} - 1×10^{-2} M) de los agonistas utilizados que se congelan en alícuotas. Las soluciones usadas en los experimentos se preparan diariamente a partir de éstas. Ver lista de sustancias en la parte inferior de este anexo.

2. El resto de sustancias utilizadas se preparan diariamente de acuerdo a las necesidades de los experimentos y en las concentraciones mencionadas en el

capítulo de métodos y resultados. Las sustancias usadas aparecen a continuación:

- 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Sigma-Aldrich
- 4-dimetilaminobenzaldehído. Sigma-Aldrich
- 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona (Apocinina). Sigma-Aldrich
- 4,5-dihidroxi-1,3-benceno ácido disulfónico (Tirón). Sigma-Aldrich
- Acetato de angiotensina II. Sigma-Aldrich
- Acetato de sodio trihidrato. Panreac
- Ácido acético. Sigma-Aldrich
- Ácido cítrico monohidrato. Panreac
- Ácido tiobarbitúrico. Sigma-Aldrich
- Ácido tricloroacético. Merck
- Alcohol etílico. VWR
- Alcohol polivinílico /carbowax (O.C.T). Sakura Tissue Tek
- Azida sódica. Sigma-Aldrich
- Benceno. Merk
- Bitartrato de noradrenalina. Sigma-Aldrich
- cis-4 Hidroxi L prolina. Fluka
- Citrato de sodio .Panreac
- Cloramina T. Sigma-Aldrich
- Clorhidrato de fenilefrina. Sigma-Aldrich
- Cloruro de acetilcolina. Sigma-Aldrich
- Cloruro potásico. Merk
- Dihidroetidio (DHE). Sigma-Aldrich
- Dimetil sulfóxido.VWR
- Dinitrato de N,N'-dimetil 9,9'biacridinio (lucigenina). Sigma-Aldrich
- Dodecilsulfato de sodio (SDS). Fluka
- EDTA de sodio. Sigma-Aldrich
- Eosina. Panreac
- Fosfato sódico. Panreac
- Glutación reductasa. Sigma-Aldrich
- HCl. J T Baker
- Hematoxilina. Panreac
- Hidroperóxido de cumeno. Sigma-Aldrich
- Indometacina. Sigma-Aldrich
- Isopropanol. Panreac
- L-glutación reducido. Sigma-Aldrich

- N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Sigma-Aldrich
- N, N-ácido dietil-ditiocarbamato de amonio (DDC). Sigma-Aldrich
- NADPH. Sigma-Aldrich
- NaOH. VWR
- Nitroprusiato sódico dihidratado. Sigma-Aldrich
- Reactivo de Bradford. Sigma-Aldrich
- Xilol. VWR

Anexo 2

Expresión y análisis estadístico de los resultados

Todos los resultados se expresan como media aritmética \pm el error estándar de la media (EEM) del número de experimentos especificado en cada caso.

1. Para comparar los valores obtenidos entre dos grupos se empleó una prueba t de Student para datos no pareados considerándose diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$ y diferencias altamente significativas cuando $p \leq 0,01$.

2. Para comparar los valores obtenidos entre más de dos grupos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba post hoc de Newman-Keuls. Considerándose diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$ y diferencias altamente significativas cuando $p \leq 0,01$.

3. Para ajustar las curvas dosis respuesta, se utilizó el ajuste a un modelo logístico no lineal utilizando el programa Graph Pad Prism versión 4 (GraphPad software Inc. EEUU). En todas las curvas se obtuvo el valor del efecto máximo (E_{\max}) y pD_2 (logaritmo cambiado de signo de la concentración del agonista que provoca el 50% del efecto máximo). Para comparar las curvas y sus parámetros se utilizó una prueba F de Snedecor.