

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE COLESTEROL SOBRE
EL METABOLISMO DE LA ARGININA Y EL ESTRÉS
OXIDATIVO. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON
ESTATINAS

MARÍA SERRA LLUCH

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 de Març de 2008 davant un tribunal format per:

- D. José Ricardo Cabo Soler
- D^a. Pilar Codoñer Franch
- D^a. Isabel Hernando Hernando
- D^a. Pilar Muñoz Rodríguez
- D. José Enrique O'Connor Blasco

Va ser dirigida per:

D^a. Eulalia Alonso Iglesias

©Copyright: Servei de Publicacions
María Serra Lluch

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7075-9

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA  Facultat de Medicina i Odontologia



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE COLESTEROL
SOBRE EL METABOLISMO DE LA ARGININA
Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.
EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON ESTATINAS

TESIS DOCTORAL

Doctoranda: D^a. María Serra Lluch

Directora: Dra. D^a. Eulalia Alonso Iglesias

Valencia, 2008

Dña. **Eulalia Alonso Iglesias**, Doctora en Ciencias Biológicas, y Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.



Certifica: Que Doña **María Serra Lluch**, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia la Tesis titulada "**Influencia de los niveles de colesterol sobre el metabolismo de la arginina y el estrés oxidativo. Efectos del tratamiento con estatinas**", que presenta para la obtención del grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste a los efectos oportunos, expido y firmo la presente certificación en Valencia, noviembre de 2007.

Fdo: Dra. Dña. Eulalia Alonso Iglesias

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA.....	1
1.2. HIPERCOLESTEROLEMIA: CAUSAS Y CONSECUENCIAS.....	3
1.2.1. Síntesis y metabolismo del colesterol y las lipoproteínas.....	3
Absorción.....	4
Síntesis.....	4
Transporte.....	7
Eliminación.....	9
1.2.2. Causas de hipercolesterolemia.....	10
1.2.3. Consecuencias de la hipercolesterolemia.....	12
1.3. CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES DEL ENDOTELIO VASCULAR.....	13
1.4. ÓXIDO NÍTRICO Y FUNCIÓN ENDOTELIAL.....	17
1.5. ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN ENDOTELIAL.....	21
1.6. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	28
1.7. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL E HIPERCOLESTEROLEMIA: PAPEL DE LA ADMA.....	30
1.7.1. Disminución de la actividad y/o expresión de la eNOS.....	30
1.7.2. Aumento de la producción de radicales libres de oxígeno a nivel vascular.....	33
1.7.3. Aumento de dimetil-arginina asimétrica (ADMA).....	39
1.7.4. Bases bioquímicas de las estrategias terapéuticas en la hipercolesterolemia.....	43
1.7.4.1. Arginina, antioxidantes e hipercolesterolemia.....	43
1.7.4.1.1. La paradoja de la arginina.....	43
1.7.4.1.2. Beneficios clínicos y efectos bioquímicos de la arginina.....	45
1.7.4.1.3. Beneficios clínicos y efectos bioquímicos de los antioxidantes.....	47
1.8. POLIAMINAS E HIPERCOLESTEROLEMIA.....	49
1.9. ESTATINAS.....	53
1.9.1. Generalidades.....	53
1.9.2. Efecto hipolipemiante.....	54
1.9.3. Efectos de las estatinas sobre la célula endotelial.....	57
1.9.4. Efectos pleiotrópicos de las estatinas.....	60
1.9.4.1. Efectos sobre la respuesta inflamatoria.....	60
1.9.4.2. Efectos sobre la inmunidad.....	62
1.9.4.3. Efectos sobre la célula del músculo liso arterial.....	62
1.9.4.4. Efecto sobre la estabilidad de la placa de ateroma.....	62
1.9.4.5. Efectos sobre la activación plaquetaria.....	63
1.9.4.6. Efectos sobre la coagulación.....	63
1.9.4.7. Efectos sobre las vías de señalización intercelular.....	64
1.10. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	65

MATERIAL Y MÉTODOS	67
2.1. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES.....	67
2.2. CAPTACIÓN DE LOS PACIENTES.....	67
2.3. TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	67
2.4. SEGUIMIENTO.....	68
2.5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS Y PROCESAMIENTO.....	68
2.6. MATERIAL.....	69
2.6.1. Aparatos.....	69
2.7. METODOLOGÍA.....	71
2.7.1. Determinaciones analíticas.....	71
2.7.1.1. Valoración del metabolismo de la arginina.....	71
2.7.1.1.1. Determinación de L-Arginina y sus derivados metilados.....	71
2.7.1.1.2. Determinación de nitrato y nitrito.....	73
2.7.1.1.3. Determinación de poliaminas en sangre total.....	76
2.7.1.2. Valoración del daño oxidativo a lípidos.....	78
2.7.1.2.1. Determinación de hidroperóxidos lipídicos (ROOHs).....	78
2.7.1.2.2. Determinación de material reactivo con ácido tiobarbitúrico.....	80
2.7.1.3. Valoración del daño oxidativo a proteínas.....	82
2.7.1.3.1. Determinación de grupos carbonilo en proteínas plasmáticas.....	82
2.7.1.3.2. Determinación de grupos sulfhidrilo en proteínas plasmáticas.....	83
2.7.1.4. Otras determinaciones.....	85
2.7.1.4.1. Determinación de proteínas.....	85
2.7.1.4.2. Determinación de creatinina.....	86
2.7.1.4.3. Determinaciones del laboratorio clínico de referencia.....	87
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	87
RESULTADOS	89
3.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA POBLACIONAL.....	89
3.2. METABOLISMO DE LA ARGININA.....	91
3.2.1. Niveles sanguíneos de poliaminas.....	91
3.2.2. Niveles plasmáticos de Arginina y sus derivados metilados.....	96
3.2.3. Niveles de nitrato en plasma y orina.....	101
3.3. PARÁMETROS DE DAÑO OXIDATIVO.....	104
3.3.1. Niveles de grupos sulfhidrilo (SH) plasmáticos.....	104
3.3.2. Niveles plasmáticos de grupos carbonilo proteicos.....	106
3.3.3. Niveles de hidroperóxidos lipídicos en plasma.....	108
3.3.4. Material reactivo con ácido tiobarbitúrico (TBARM) en plasma y orina.....	111

3.4. EFECTOS DEL TIPO DE ESTATINAS SOBRE LOS DIFERENTES PARÁMETROS ESTUDIADOS.....	113
3.5. CORRELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS.....	114
3.5.1. Metabolismo lipídico - parámetros experimentales de daño oxidativo y metabolismo de la arginina.....	114
3.5.2. Daño oxidativo – metabolismo de la arginina.....	116
DISCUSIÓN	131
4.1. HIPERCOLESTEROLEMIA Y METABOLISMO DE LA ARGININA.....	133
4.1.1. Hipercolesterolemia y producción de óxido nítrico.....	134
4.1.2. Hipercolesterolemia y niveles de arginina y sus derivados metilados.....	138
4.1.3. Hipercolesterolemia y niveles de poliaminas.....	142
4.2. HIPERCOLESTEROLEMIA Y DAÑO OXIDATIVO.....	151
4.2.1. Hipercolesterolemia y peroxidación lipídica.....	154
4.2.2. Hipercolesterolemia y oxidación proteica.....	161
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	173

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACAT	Acil-CoA-colesterol aciltransferasa
ABCG5	ATP binding cassette (casete de unión a ATP), subtipo G5
ABCG8	ATP binding cassette (casete de unión a ATP), subtipo G8
ADMA	Dimetil-arginina asimétrica
ADP	Adenosina difosfato
AFCAPS/TEXCAPS	Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (estudio de prevención de arteriosclerosis coronaria de las fuerzas aéreas/Texas)
AIR	Atherosclerosis and Insulin Resistance (arteriosclerosis y resistencia insulínica)
Akt	Proteín kinasa B
ANG II	Angiotensina II
ANOVA	Análisis de la varianza
ATC	Arteriosclerosis
ATP	Adenosina trifosfato
AP1	Activator protein-1 (factor de transcripción) (proteína activadora 1)
BH2	Dihidrobiopterina
BH4	Tetrahidrobiopterina
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albúmina de suero bovino
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase I (Proteín quinasa Ca ²⁺ /calmodulina dependiente I)
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CARE	Cholesterol And Recurrent Events (Colesterol y eventos recurrentes)
CD	Cluster of differentiation (grupo de diferenciación)
CETP	Cholesterol ester transfer protein (Proteína transferidora de ésteres de colesterol)
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
CMV	Citomegalovirus
CoA	Coenzima A
C. S.	Centro de salud
cSAT	Espermidina/espermina N-acetiltransferasa citosólica
CT	Colesterol total
dcSAM	S-adenosilmetionina descarboxilada
DDAH	Dimetil-arginina dimetilaminohidrolasa
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNFH	Dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ácido 5-5'-ditiobis[2-nitrobenzoico]
ECA	Enzima de conversión de la angiotensina
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor (Factor hiperpolarizante derivado del endotelio)
ELAM	Endothelial leukocyte adhesion molecule (molécula de adhesión del leucocito al endotelio)
ESM	Error estándar de la media
ET	Endotelinas
FOX-2	Ferrous Xylenol Orange 2 reagent (Xilenol ferroso naranja 2, reactivo de)
FAD	Flavin adenin dinucleótido (forma oxidada)
FGFb	Basic fibroblast growth factor (factor de crecimiento básico de fibroblastos)
FMN	Mononucleótido de flavina
FPP	Farnesilpirofosfato
GC	Guanilato ciclasa
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato
GPx	Glutation peroxidasa

GSH	Glutation reducido
HC	Hipercolesterolemia
HDL	High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad)
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1 (factor inducible por la hipoxia-1)
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
HPLC	High pressure liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)
HTA	Hipertensión arterial
HTGL	Human hepatic tryglyceride lipase (triglicérido lipasa hepática)
I-BABP	Ileal bile acid binding protein (proteína ileal de unión a ácidos biliares)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1 (molécula de adhesión intercelular-1)
IDL	Intermediate density lipoprotein (Lipoproteína de densidad intermedia)
IL-8	Interleuquina-8
IMC	Índice de masa corporal
INF- γ	Interferón gamma
Km	Constante de Michaelis-Menten
LCAT	Lecitina Colesterol acil-transferasa
LDL	Low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad)
LDL _n	Lipoproteína de baja densidad nativa
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LFA-1	Leukocyte-function antigen-1 (antígeno de función leucocitaria 1)
LIPID	Long Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (Intervención prolongada con pravastatina en enfermedades isquémicas)
L-NAME	L-nitroarginina monometil éster
L-NMMA	L-NG-monometil arginina
LOX-1	Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (receptor de LDLox similar a lectina-1)
LPL	Lipoprotein lipase
LPS	Lipopolisacárido
LSD	Mínima Diferencia Significativa
LXR	Liver X receptor (receptor X hepático)
LXR-RXR	Liver X receptor-retinoid X receptor (receptor heterodimérico hepático de retinoides)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (proteína quinasa activada por mitógenos)
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1 (proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1)
MDA	Malondialdehído
MHC-II	Major histocompatibility complex-II (complejo mayor de histocompatibilidad tipo II)
MMP	Matrix metalloproteinase (metaloproteinasas de la matriz)
MPO	Mieloperoxidasa
MRFIT	Multiple Risk Factor Intervention Trial (ensayo clínico de múltiples factores de riesgo)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NADPH	Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (forma reducida)
NF-kB	Nuclear factor kB (factor nuclear kB)
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
Nox	Familia de enzimas NADPH oxidasas
ns	No significativo

ODC	Ornitina descarboxilasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
p22phox	Subunidad proteica de NADPH oxidasa
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1 (Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1)
PCR	Proteína C reactiva
PDGF	Platelet-derived growth factor (factor de crecimiento derivado de plaquetas)
PDTC	Pyrrolidine dithiocarbamate (Ditiocarbamato pirridolínico)
PEG-SOD	Polietilenglicol conjugado con superóxido dismutasa
PGI2	Prostaciclina
PI3K	Fosfoinosítido-3-quinasa
PPAPs	Programa de Prevención en Atención Primaria de salud
PPARs	Peroxisome proliferator-activated receptors (receptores activados por proliferadores de peroxisomas)
PRMT	Protein arginine N-methyl transferasa (arginina metil transferasa)
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster (estudio prospectivo cardiovascular Münster)
p/v	Peso/volumen
RCV	Riesgo cardiovascular
RNA	Ácido ribonucleico
ROOHs	Hidroperóxidos lipídicos
ROS	Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SAT	Espermidina/espermina N-acetiltransferasa
sCD40L	CD40L soluble
SDS	Dodecil sulfato sódico
SMC	Smooth muscle cells (células del músculo liso)
SOD	Superóxido dismutasa
SPSS	Statistical Product for Service Solutions (Statistical Package for the Social Sciences)
SREBPs	Sterol regulatory element binding proteins (proteínas fijadoras del elemento regulador de esteroides)
T.A	Temperatura ambiente
TBA	Thiobarbituric acid (ácido tiobarbitúrico)
TBARM	Thiobarbituric acid reactive material (material reactivo con ácido tiobarbitúrico)
TCA	Trichloroacetic acid (ácido tricloroacético)
TGs	Triglicéridos
TGF- β	Transforming growth factor- β (factor de crecimiento transformador β)
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases (inhibidores tisulares de metaloproteinasas)
TMP	Tetrametoxipropano
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
TNF α	Tumor necrosis factor- α (factor de necrosis tumoral- α)
t-PA	Tissue plasminogen activator (activador del plasminógeno tisular)
TPP	Trifenilfosfina
TRPC	Transient receptor potential channels (canales catiónicos)
t-test	Test de la t de Student
TXA2	Tromboxano A2
UA	Unidades arbitrarias
VCAM-1	Vascular adhesion molecule-1 (molécula de adhesión vascular tipo 1)
VLDL	Very low density lipoprotein (lipoproteína de muy baja densidad)
WOSCOP	West of Scotland Coronary Prevention Study (estudio de prevención coronaria del oeste de Escocia)
X/XO	Sistema xantina oxidorreductasa

INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA

La hipercolesterolemia es considerada el principal factor de riesgo cardiovascular (RCV), especialmente cuando se habla de cardiopatía isquémica. Este hecho ha sido demostrado en estudios epidemiológicos, coronariográficos y de investigación clínica (Velasco JA y cols, 2000). La relación entre concentraciones elevadas de colesterol y arteriosclerosis fue demostrada por primera vez en los años 30 por varios investigadores (Muller C, 1938; Thannhauser SJ y Magendatz H, 1938), pero fueron Kannel y cols en 1971 quienes confirmaron estas observaciones desde el punto de vista epidemiológico al observar una fuerte correlación positiva entre las concentraciones de colesterol y el desarrollo de cardiopatía isquémica en el estudio Framingham (Kannel WB y cols, 1971). Estos datos se confirmaron en estudios posteriores como el MRFIT (Martin MJ y cols, 1986) y el PROCAM (Assman G y cols, 1998).

La fuerte asociación entre hipercolesterolemia y morbi-mortalidad por cardiopatía isquémica y otras enfermedades cardiovasculares se observa tanto en varones como en mujeres, independientemente de la edad y de la raza. Y todo lo expuesto para el colesterol total (CT) es válido también para la fracción LDL (Lipoproteínas de baja densidad).

En cuanto a la fracción HDL (Lipoproteínas de alta densidad), también está demostrada su asociación inversa con episodios isquémicos; concentraciones reducidas incrementan la mortalidad en personas sanas o con enfermedad coronaria preexistente (Bengston C, 1973; Klag MJ y cols, 1993; Aronow WS y Ahn C, 1994; Neaton JD y cols, 1984; Wong ND y cols, 1989). Por otro lado, los triglicéridos (TGs) representan un factor de riesgo cardiovascular independiente, y se asocian a un incremento del riesgo de un 30 % en el varón y hasta un 75 % en la mujer (Hokanson JE y Austin M, 1996).

La prevalencia de hipercolesterolemia (HC) en la población española es alta y se encuentra en aumento; se considera que un 18-20 % de personas entre 35-64 años tienen

un CT ≥ 250 mg/dL y más del 50 % ≥ 200 mg/dL (Muñiz J y cols, 1991; Rodríguez JC y cols, 1993; Masía R y cols, 1998).

El nivel de colesterol a partir del cual se considera HC es controvertido y, en la actualidad, se diferencia en función del RCV y el antecedente de evento cardiovascular (sea cardíaco o cerebrovascular). Para el cálculo del RCV se dispone de diferentes tablas o formularios en los cuales se introducen una serie de parámetros (edad, sexo, niveles de CT, cLDL, cHDL, TG, diabetes mellitus, consumo de tabaco, presencia de hipertrofia ventricular izquierda, etc.) y se obtiene un valor numérico que representa el riesgo de desarrollar un evento cardiovascular durante los diez años subsiguientes. Entre las tablas de cálculo del RCV se encuentra la de Framingham (Kannel WB y cols, 1971) que, en la actualidad, es la de uso más extendido. Sin embargo, dado que el estudio Framingham se realizó sobre población norteamericana, se cree que sobreestima el cálculo cuando se aplica a la población española. En este sentido se ha creado recientemente otra tabla de cálculo, la llamada Regicor (Marrugat J y cols, 2003; Ramos R y cols, 2003), realizada sobre población catalana que, parece ser, se ajusta más a nuestra población mediterránea.

Se habla de *hipercolesterolemia límite* cuando existen valores de CT > 200 mg/dL, y de *hipercolesterolemia definida* cuando hay valores de CT > 250 mg/dL. En sujetos diabéticos y en prevención secundaria (sujetos que ya han sufrido un evento cardiovascular) se habla de hipercolesterolemia definida con valores de CT > 200 mg/dL (U.S. Preventive Task Force, 2000; semFYC-paaps, 2004; Lago F, 2002). Es decir que es deseable que el CT sea < 200 mg/dL. Por encima de 250 mg/dL siempre se considera HC, y valores entre 200-250 son los que hay que individualizar con el resto de factores RCV y hacer un cálculo del RCV para decidir la conveniencia del tratamiento. Los triglicéridos, en todos los casos, deben encontrarse por debajo de 200 mg/dL.

El tratamiento de la HC en la actualidad se basa en medidas generales (dieta, ejercicio, evitar consumo de tabaco o alcohol) y farmacológicas. Entre las segundas se encuentran las estatinas –inhibidores del enzima fundamental de la síntesis de colesterol (hidroximetilglutaril coenzima A reductasa)- como pilar fundamental, y se reserva para

casos refractarios su asociación con agentes secuestradores de grasas biliares, tales como resinas de intercambio iónico, buscando un efecto sinérgico (U.S. Preventive Task Force, 2000; semFYC, 2003; semFYC-paaps, 2004).

Existen nuevas opciones farmacológicas para bajar el colesterol, como son colesevelam (Armani A y Toth PP, 2006; Steinmetz KL y Schonder KS, 2005), un fármaco secuestrador de ácidos biliares, un polímero insoluble en agua y no absorbible que es efectivo en la disminución del colesterol total y LDL. Otra opción más reciente es ezetimibe (Burnett JR y Huff MW, 2006; Bissonnette S y cols, 2006), un fármaco que inhibe la absorción intestinal de colesterol y fitosteroles; estaría indicado introducirlo cuando la estatina, de forma aislada, no permite alcanzar las cifras de colesterol deseadas y como medida coadyuvante junto con la dieta. Todavía no existen ensayos clínicos que demuestren la disminución de morbi-mortalidad cardiovascular con esta asociación (Genest J, 2006). Otras drogas que se están ensayando para el manejo de la hiperlipemia son torcetrapib, inhibidor de la CETP (proteína transferidora de ésteres de colesterol) que cataliza la transferencia de ésteres de colesterol de las HDL a lipoproteínas que contienen la apolipoproteína B intercambiándolo por triglicéridos y que, por lo tanto, juega un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas (Clark RW, 2006); avasimibe y pactimibe, inhibidores de ACAT (acil-CoA-colesterol aciltransferasa); implitapide, un inhibidor de la transferasa microsomal de triglicéridos, y niacina (ácido nicotínico), cuyo poder hipocolesterolemiantes es conocido desde hace 50 años y que ha demostrado reducción de la morbi-mortalidad cardiovascular en ensayos clínicos, tanto de forma aislada como junto con estatinas (Ito MK, 2003).

1.2. HIPERCOLESTEROLEMIA: CAUSAS Y CONSECUENCIAS

1.2.1. Síntesis y metabolismo del colesterol y las lipoproteínas

La homeostasis del colesterol se logra gracias a un fino equilibrio entre los procesos de ingestión, absorción, síntesis, intercambio y excreción. Todos estos procesos se encuentran estrechamente interconectados y, cambios en cualquiera de ellos, pueden influenciar los otros de forma significativa. Consideraremos, a

continuación, los rasgos generales de los diferentes procesos que conforman el metabolismo del colesterol.

Absorción

El intestino delgado controla la absorción y excreción del colesterol dietético (una cuarta parte) y biliar (tres cuartas partes) (Dietschy JM, 1997). Los detalles que acontecen durante la absorción no son del todo conocidos. Los ácidos biliares emulsionan el colesterol y resto de grasas de la dieta formando micelas que permiten el transporte del colesterol al interior del enterocito yeyunal. Los receptores-transportadores que median este proceso no han sido caracterizados, si bien un reciente estudio (Hansen GH y cols, 2003) parece involucrar a SR-BI, un receptor que se expresa en la membrana luminal del enterocito, además de en el hígado y tejidos esteroideogénicos. Otros investigadores involucran en este proceso de transporte a la proteína Niemann-Pick C1-like 1 (Wang DQ, 2006).

El colesterol transportado al interior del enterocito puede ser devuelto de nuevo al lumen intestinal por medio de los transportadores ABCG5 y ABCG8 (subtipos de ATP binding cassette), cuya expresión en los enterocitos aumenta por la vía del receptor heterodimérico hepático de retinoides LXR-RXR, o esterificado por la ACAT y ensamblado en los quilomicrones.

Síntesis

Si bien se considera habitualmente que el hígado es el órgano más importante en el mantenimiento de los niveles circulantes de colesterol, sólo parece ser responsable del 15% de su síntesis *de novo* (Dietschy JM, 1997), corriendo el 85% restante a cargo de tejidos extrahepáticos. La síntesis hepática de colesterol es el resultado final de una larga serie de reacciones enzimáticas (**Figura 1.1**) cuya velocidad está controlada por el enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa que regula el paso de HMG-CoA a mevalonato. El colesterol sintetizado *de novo* es liberado a la circulación vía VLDL.

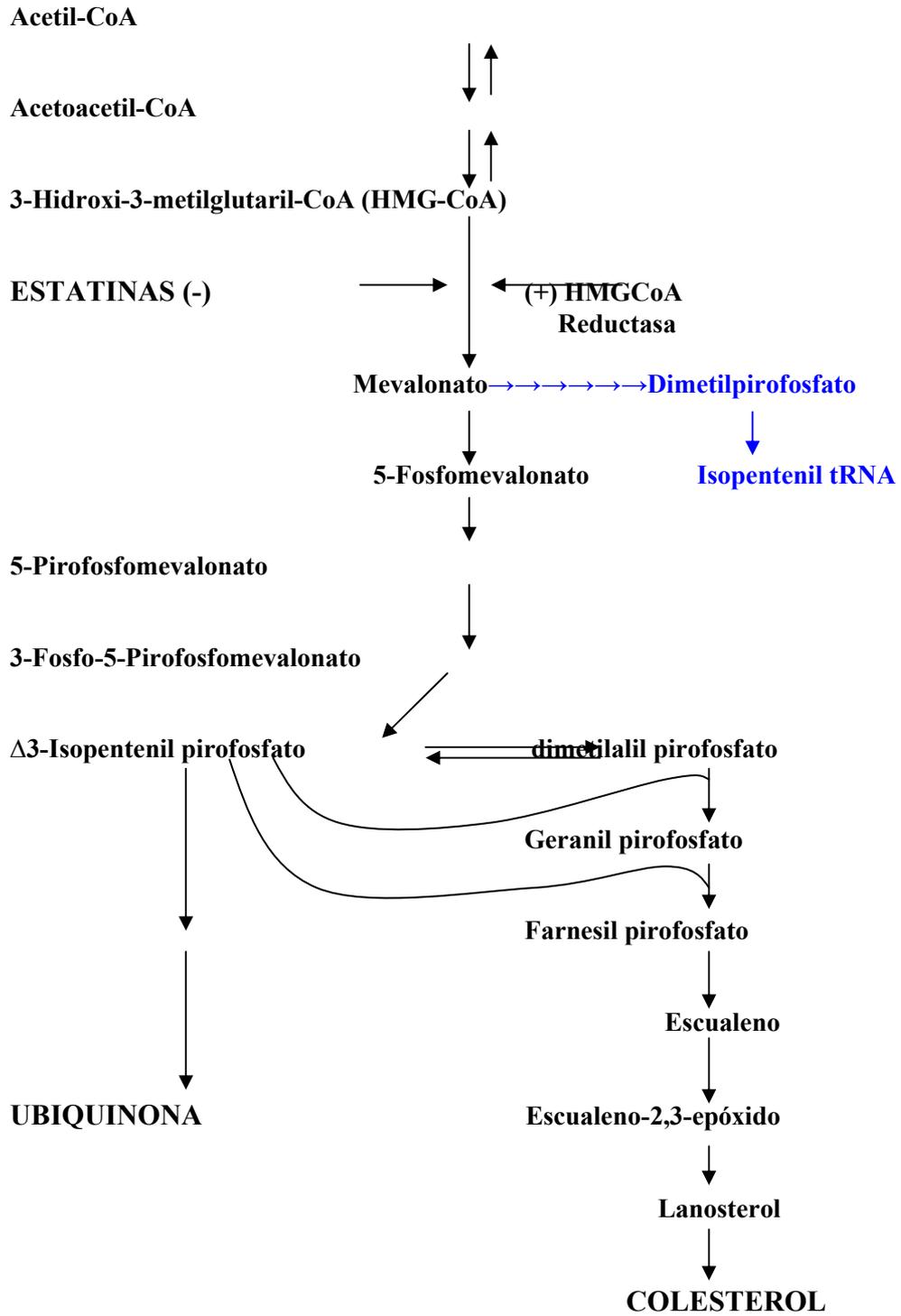


Figura 1.1. Vía de síntesis endógena de colesterol. Modificado de Palomäki A y cols, 1998.

Estudios recientes han demostrado que la familia de factores de transcripción SREBPs (proteínas fijadoras del elemento regulador de esteroides) juega un papel crucial en la regulación hepática de la síntesis de colesterol, ya que activan la expresión de más de 30 genes relacionados con la síntesis y absorción de colesterol, ácidos grasos, TGs y fosfolípidos (Horton y cols, 2002). La activación de los SREBPs estimula tanto la síntesis de lípidos como la expresión del receptor de LDL, y su efecto neto sobre los niveles plasmáticos de colesterol depende del balance entre estos dos efectos.

Entre los factores de transcripción que regulan genes implicados en la homeostasis del colesterol (incluidos los SREBPs) se encuentran los receptores X hepáticos LXRA y LXRh. En el hígado, los LXRs disminuyen la síntesis de colesterol a través de sus efectos sobre la expresión de SREBP-2 y otros genes colesterogénicos. En el intestino, los LXRs parecen jugar un papel importante en la absorción del colesterol dietario al aumentar la expresión de algunos miembros de la familia de transportadores ABC. La activación de LXRs también estimula la producción de LPL (lipoprotein lipasa), el enzima limitante en el metabolismo de las partículas ricas en TGs, y la expresión de I-BABP (proteína ileal de unión a ácidos biliares) que media el transporte de ácidos biliares desde el enterocito a la luz ileal. De esta forma, la regulación coordinada de múltiples genes vía LXRs resulta en un incremento de la eliminación de colesterol, aumento de la síntesis y disminución de la absorción. Se considera que el efecto neto de la activación de LXR sería el de proporcionar protección ante concentraciones elevadas de colesterol en los tejidos (Gylling H, 2004).

El contenido intracelular de colesterol libre refleja el balance entre colesterol sintetizado por la célula o transportado a ella, la tasa de conversión de colesterol libre en esterificado y la tasa de salida de la célula. El contenido de colesterol libre intracelular es el principal modulador de la síntesis de colesterol celular y de receptores para LDL. Cuando es alto, se inhibe tanto la síntesis de receptores como de colesterol por la enzima HMG-CoA reductasa. Además, el colesterol activa la enzima ACAT, promoviendo la esterificación y depósito del exceso de colesterol.

Transporte

El colesterol es transportado en sangre vía lipoproteínas. Las lipoproteínas son partículas globulares de alto peso molecular que transportan en su núcleo lípidos no polares (triglicéridos y colesterol) en proporción variable, rodeados por una envoltura que contiene fosfolípidos y unas proteínas específicas (apoproteínas). Las principales lipoproteínas son Quilomicrones, VLDL (Lipoproteína de muy baja densidad), IDL (Lipoproteína de densidad intermedia), LDL (Lipoproteína de baja densidad) y HDL (Lipoproteína de alta densidad) (Sánchez De Medina, 2000) (**Tabla 1.I**). Se clasifican en función de la densidad, y no son estáticas, sino que van transformándose unas en otras según van perdiendo o adquiriendo alguno de estos componentes (**Figura 1.2**).

Los quilomicrones son las lipoproteínas de menor densidad. Con un 80% de TGs, se forman en el intestino a partir de los TGs y colesterol de la dieta, y de aquí son segregados a la linfa intestinal que los transporta a la circulación general. En la pared endotelial de los tejidos, principalmente adiposo y muscular, la apo CII presente en los quilomicrones activa la LPL que disgrega los TGs en ácidos grasos y glicerol, que penetran en la célula. Los remanentes de quilomicrones, sin la apoproteína CII y con menor contenido de TGs, son captados por el hígado mediante la unión de la Apo E a un receptor específico de la superficie del hepatocito, siendo finalmente degradados en los lisosomas.

El exceso de hidratos de carbono de la dieta facilita la síntesis de TGs por el hígado, que convierte los azúcares en ácidos grasos y los esterifica con glicerol formando TGs. Estos TGs se liberan a la circulación general formando parte de las denominadas VLDL. Las VLDL liberan TGs en la pared de los vasos sanguíneos de los tejidos adiposo y muscular, al igual que los quilomicrones. Los remanentes de VLDL son las IDL, y pueden ser captadas y metabolizadas por el hígado o seguir perdiendo sus TGs, transformándose en LDL.

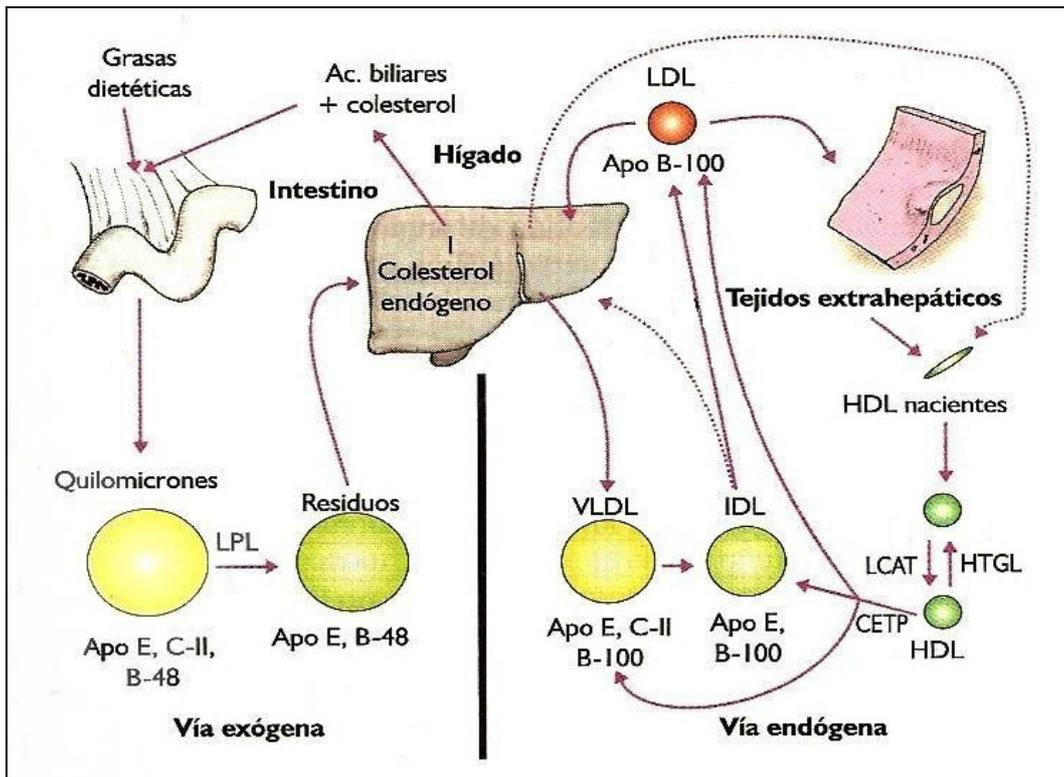


Figura 1.2. Representación esquemática del metabolismo de las lipoproteínas. (LDL: lipoproteínas de baja densidad; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; IDL: lipoproteínas de densidad intermedia; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LPL: lipoproteína Lipasa; Apo: apoproteína; LCAT: lecitina colesterol acil-transferasa; HTGL: triglicérido lipasa hepática; CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol). Tomado de CTO Medicina S.L., 2000.

Las LDL contienen mayoritariamente ésteres de colesterol y una única apoproteína B100. Son el principal transportador de colesterol hacia los tejidos para permitir su utilización metabólica que incluye, entre otros destinos, la síntesis de hormonas. Las LDL son particularmente susceptibles a la oxidación, proceso de crucial importancia en el inicio y progresión de la lesión aterosclerótica (véase más adelante).

Las HDL se forman en el hígado y en el intestino como partículas pequeñas, ricas en proteínas, que contienen relativamente poco colesterol. Son heterogéneas, habiéndose descrito varias subclases en función de su densidad y composición proteica. Tras liberarse al torrente sanguíneo, las HDL naciendo recolectan colesterol libre, fosfolípidos y apoproteínas de otras lipoproteínas como quilomicrones y VLDL, transformándose en HDL maduras. El colesterol libre es esterificado por la enzima plasmática lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) dentro de las HDL y transferido

hacia las VLDL mediante la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y, finalmente, de éstas a las LDL. A su vez los ácidos grasos libres son captados en el hepatocito por receptores de apolipoproteínas B y E o por acción de la triglicérido lipasa hepática (HTGL) para formar LDL.

Lipoproteína	Contenido	Origen	Destino	Apoproteína	Partícula residual
Quilomicrón	TG dieta	Intestino delgado	-Adipocito -Miocito	CII, E, B48	E, B48
VLDL	TG endógenos (Colesterol)	Hígado	-Adipocito -Miocito	CII, E, B100	IDL
IDL	TG endógenos	Adipocito	-Plasma: transf en LDL -(Hígado)	E, B100	
LDL	Ésteres colesterol	Plasma	-Hígado -Tejidos extrahepáticos	B100	
HDL	Ésteres colesterol	Tejidos extrahepáticos	-Hígado	AI, AII (E)	

Tabla 1.I. Resumen de las características principales de las lipoproteínas. (TG: triglicéridos; LDL: lipoproteínas de baja densidad; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; IDL: lipoproteínas de densidad intermedia; HDL: lipoproteínas de alta densidad)

Las HDL maduras entregan el colesterol al hígado y a los tejidos esteroideogénicos (glándula suprarrenal, ovarios y testículos). En el hígado, el colesterol se utiliza principalmente para la secreción biliar, tanto como colesterol libre o como sales biliares. Este fenómeno se denomina transporte reverso de colesterol y justifica el beneficio de niveles elevados de colesterol-HDL.

Eliminación

Aproximadamente la mitad del colesterol se elimina a través del hígado al formar ácidos biliares (Gylling H, 2004). Además, el hígado transporta el exceso de colesterol al intestino para excreción fecal y provoca la conversión de VLDL a LDL y TGs como fuente de energía para tejidos extrahepáticos.

1.2.2. Causas de hipercolesterolemia

La colesterolemia está influenciada por determinantes genéticos y alimentarios; es probable que éste último sea el responsable del incremento de su incidencia, por un abandono del patrón de la dieta mediterránea.

TRASTORNO GENETICO	DEFECTO BIOQUIMICO	LIPOPROTEINEMIA AUMENTADA	CLINICA	LIPOPROT. EN FAMILIAS AFECTADAS	TRATAMIENTO	
					1ª Elección	Otros
Déficit familiar L-P-Lipasa	Lipo-proteín-lipasa	Qm	Xantomas eruptivos pancreáticos	Qm (1)	Ninguno	NO
Déficit familiar de Apo CII	Apo CII	Qm, VLDL	Pancreatitis	Qm (1 ó 5) VLDL	NO	NO
Hiperlipoproteinemia familiar 3	Apo E de las VLDL	Partículas residuales, IDL	Xantomas palmares, tuberosos Aterosclerosis	Resid. e IDL (3) LDL (2a) VLDL (4) LDL y VLDL (2b)	Gemfibrozil Clofibrato	A. nicotínico
Hipercolesterolemia familiar	Receptor LDL	LDL raro LDL + VLDL	Xantomas tendinosos Aterosclerosis	LDL (2a) raro 2b	Resina + Lovastatina	A. nicotínico Probucol
Hiper TRG familiar	Desconocido	VLDL raro Qm + VLDL		VLDL (4) raro 5	Gemfibrozil A. nicotínico	Clofibrato
Hiperlipidemia múltiple (familiar combinada)	Desconocido	LDL + VLDL	Xantomas eruptivos Aterosclerosis	LDL (2a) LDL o VLDL (2b) VLDL (4) raro 5	Gemfibrozil A. nicotínico	Lovastatina

Tabla 1.II. Clasificación de las principales dislipemias primarias. Tomado de CTO Medicina S.L., 2000.

Entre las dislipemias genéticas o primarias (**Tabla 1.II**) se encuentran la hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia poligénica, hiperlipemia familiar combinada, hipertrigliceridemia familiar e hipoalfalipoproteinemia. Las más frecuentes son la hipercolesterolemia familiar y la hiperlipemia familiar combinada que, en general son infradiagnosticadas, por lo que asumimos que algunos de nuestros pacientes podrían padecerlas. Sin embargo no es objeto de nuestro estudio caracterizar las alteraciones bioquímicas que subyacen en estas patologías.

Otra forma de clasificar las dislipemias, la más clásica, es la descrita por Fredrickson DS y cols en 1967, aplicando métodos electroforéticos en gel de agarosa para separar las lipoproteínas. Posteriormente fue adaptada y modificada por la OMS en 1970 (Beamunt JL y cols, 1970). En la actualidad su uso es bastante limitado ya que no aporta datos etiológicos acerca de su origen primario o secundario. Nosotros hemos

incluido pacientes afectados de hipercolesterolemia, con o sin hipertrigliceridemia; por tanto fenotipos II (a y b) o V (**Tabla 1.III**).

Fenotipo	Alteración lipoproteica	Colesterol	Triglicéridos
I	Quilomicrones aumentados	=, - ↑	↑↑↑↑
IIa	LDL aumentadas	↑↑↑	=
IIb	LDL y VLDL aumentadas	↑↑↑	↑
III	IDL aumentadas	↑↑	↑↑↑
IV	VLDL aumentadas	=, ↑	↑↑
V	VLDL y quilomicrones aumentados	↑↑	↑↑↑

Tabla 1.III. Clasificación fenotípica clásica de las dislipemias. Las flechas indican aumentado (↑) o disminuido (↓). Modificado de Fredickson DS y cols, 1967.

Como causas secundarias de HC se encuentran numerosas patologías. Así, el pobre control glucémico, la resistencia a la acción periférica de la insulina y la obesidad van a determinar la aparición de alteraciones lipídicas en la diabetes mellitus. Entre ellas, la más frecuente es la hipertrigliceridemia, por aumento en la síntesis hepática de VLDL y disminución de la actividad de la LPL debido al defecto de insulina, lo que provocará un menor aclaramiento de VLDL y quilomicrones plasmáticos. En el hipotiroidismo, la base patogénica de la dislipemia parece residir en una alteración de la actividad de los receptores LDL, que disminuye ante los bajos niveles de tiroxina. Durante el embarazo o en el consumo excesivo de alcohol es frecuente la hipertrigliceridemia a expensas de VLDL; además, si la concentración de triglicéridos es elevada, se producirá un aumento del colesterol total y de sus fracciones. En la obesidad, la ingesta elevada de ácidos grasos saturados y colesterol reducirá la actividad de los receptores de LDL, al tiempo que la hiperproducción de VLDL favorecerá su transformación en LDL. En el síndrome nefrótico la dislipemia está relacionada con el incremento en la síntesis de apo B que acompaña al descenso en la concentración de albúmina sérica. A medida que la hipoalbuminemia se intensifica, la secreción hepática de VLDL se incrementa en respuesta a la llegada masiva de ácidos grasos libres al hígado. En la insuficiencia renal crónica, colestasis hepática y disfunción hepatocelular se produce un déficit progresivo de la actividad de la LCAT que genera HC, a expensas del colesterol no esterificado. Por otro lado, la elevación del cLDL que se observa

cuando se determina por los métodos habituales, suele corresponder a la presencia de una lipoproteína anormal (LpX) originada en la regurgitación de la lecitina biliar hacia el plasma, donde se asocia con el colesterol libre, la albúmina y la apo C. De forma paralela se suele producir un marcado descenso de las HDL. Las dislipemias son también frecuentes en otras situaciones clínicas como paraproteinemia, toma simultánea de fármacos como β -bloqueantes, diuréticos tiazídicos, hormonas esteroideas, derivados del ácido retinoico o fármacos inhibidores de las proteasas (terapia anti VIH). (<http://www.medynet.com/elmedico/aula/tema12/hiper2.htm>)

1.2.3. Consecuencias de la hipercolesterolemia

Como ya se ha comentado en el apartado 1.1. la principal consecuencia clínica de la hipercolesterolemia es el desarrollo de cardiopatía isquémica en cualquiera de sus formas: infarto agudo de miocardio o angina de pecho. La segunda entidad clínica en importancia sería la enfermedad cerebrovascular, cuya causalidad no está tan demostrada de forma directa. Otras entidades clínicas serían la disección y aneurismas de aorta, isquemia intestinal, insuficiencia renal, patología vascular periférica, tromboembolismo, disfunción eréctil, xantomas tendinosos y xantelasmas cutáneos.

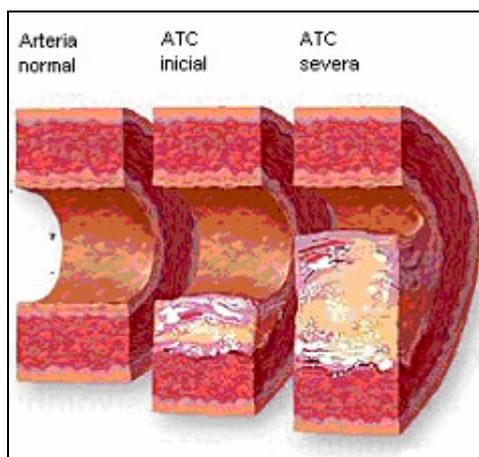


Figura 1.3. Representación esquemática del desarrollo de una placa de ateroma. Tomada de www.fda.gov/.../conditions/atherosclerosis.html

La base anatomo-patológica de todas estas formas clínicas radica en la placa de ateroma: una acumulación de células y partículas lipídicas que provoca un

estrechamiento del vaso de forma significativa y una alteración del endotelio vascular que favorecerá su disfunción y progresión de la patología (**Figura 1.3**). Los eventos bioquímicos, fisiopatológicos y celulares implicados en su aparición y progresión serán ampliamente considerados en apartados posteriores de esta Introducción.

Dada la importancia de la funcionalidad endotelial como base de las consecuencias clínicas de la hipercolesterolemia haremos, en primer lugar, una revisión del endotelio vascular normofuncionante, para describir, posteriormente, las alteraciones que sufre como consecuencia del aumento de los niveles de colesterol.

1.3. CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES DEL ENDOTELIO VASCULAR

Durante muchos años el endotelio vascular, la capa monocelular en contacto directo con la sangre, se consideró un límite liso e inerte entre el fluido hemático y la pared vascular, que sólo servía para impedir la libre difusión de macromoléculas. Sin embargo, las investigaciones realizadas en los últimos años han demostrado para el endotelio acciones endocrinas, paracrinas y autocrinas que, unidas a su privilegiada posición anatómica, le convierten en el más importante regulador del tono vascular y de la homeostasis.

Formado por una sola capa de células planas, alineadas en la misma dirección del flujo sanguíneo, el endotelio constituye una superficie lisa que retarda la adhesión de plaquetas, monocitos y leucocitos; participa en el catabolismo de los triglicéridos y de las partículas ricas en lípidos a través de la LPL extrahepática; ejerce, además, una influencia reguladora sobre el remodelado vascular, la fibrinólisis, la adhesión al endotelio de plaquetas activadas y leucocitos, y los procesos inflamatorios (Drexler H, 1997; Lüscher TF y cols, 1993; Rubanyi GM, 1993; Gibbons GH y Dzau VJ, 1994; Loscalzo J y Welch G, 1995; Vane JR y cols, 1990; Cooke JP y Dzau VJ, 1997). La participación del endotelio en estos procesos es posible gracias a que las células endoteliales sintetizan y liberan, en respuesta a estímulos mecánicos y químicos, gran número de sustancias vasoactivas, moduladoras del crecimiento y de la adhesión celular, entre otras funciones (**Tabla 1.IV**).

Sustancias liberadas por el endotelio	
<p>Vasodilatadores</p> <ul style="list-style-type: none"> • Óxido nítrico (NO) • Bradiquinina • Prostaciclina • Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) • Serotonina*, histamina, sustancia P 	<p>Vasoconstrictores</p> <ul style="list-style-type: none"> • Angiotensina II • Endotelina • Tromboxano A₂, serotonina*, ácido araquidónico, prostaglandina H₂, trombina, nicotina
<p>Promotores del crecimiento de las células del músculo liso</p> <ul style="list-style-type: none"> • Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) • Factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGFb) • Endotelina, angiotensina II 	<p>Inhibidores del crecimiento de las células del músculo liso</p> <ul style="list-style-type: none"> • Óxido nítrico, prostaciclina, bradiquinina • Heparán sulfato • Factor de crecimiento transformador β (TGF-β)
<p>Moléculas de adhesión</p> <ul style="list-style-type: none"> • Molécula de adhesión de leucocitos endotelial • Molécula de adhesión intercelular • Molécula de adhesión de células vascular 	<p>Factores trombolíticos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Activador del plasminógeno tisular (t-PA) • Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) • Trombomodulina

Tabla 1.IV. Sustancias liberadas por el endotelio. *: La serotonina funciona como vasodilatador en los vasos sanguíneos normales, pero produce vasoconstricción paradójica cuando el endotelio está alterado por hipertensión, hipercolesterolemia u otros factores de riesgo cardiovascular. Modificado de Drexler H, 1998.

El endotelio vascular induce la relajación del músculo liso subyacente en respuesta a la estimulación por diversas hormonas, neurotransmisores y compuestos vasoactivos derivados de las plaquetas y del sistema de coagulación. Los estímulos neurohormonales interactúan con receptores de la superficie endotelial y, a través de incrementos de la concentración de calcio intracelular, promueven la síntesis y liberación de compuestos vasodilatadores como la prostaciclina (PGI₂), el óxido nítrico (NO) y, muy probablemente, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) (Drexler H, 1998; González I, 1997).

El primero y mejor conocido de los vasodilatadores endoteliales es la PGI₂, cuya acción vasorrelajante sobre la musculatura lisa vascular implica la activación de la adenilato ciclasa y el consiguiente incremento de la formación de cAMP. La liberación de PGI₂ puede ser estimulada por un gran número de sustancias entre las que destacan

ATP, ADP, acetilcolina, trombina, serotonina y diversos neurotransmisores. La PGI₂ también aumenta la formación de cAMP en las plaquetas con importantes efectos antiagregantes (Drexler H, 1998; González I, 1997).

Pero, sin duda, el más conocido e importante factor relajante derivado del endotelio es el óxido nítrico (EDRF; NO). Su liberación se promueve por estrés tangencial (fuerzas de cizalla o de arrastre del flujo sanguíneo), adecuando así la luz de los vasos a su flujo. La serotonina, la bradiquinina, la acetilcolina, la sustancia P y la trombina son potentes estímulos para la producción y liberación de NO por el endotelio (Drexler H, 1998; González I, 1997). Dada su importancia en la patología vascular, los detalles sobre la síntesis, funcionalidad y derivaciones fisiopatológicas del NO serán referidos ampliamente en relación a los mecanismos implicados en la disfunción endotelial (véase epígrafe 1.4).

La relajación del músculo liso vascular por el NO implica la estimulación de la guanilato ciclasa soluble y el incremento de la formación de cGMP. Pero dado que el NO liberado por el endotelio difunde tanto hacia el interior de la pared vascular como hacia la luz del vaso, su acción sobre las plaquetas incrementa también su contenido en cGMP reduciendo tanto la adhesividad como la agregación plaquetarias. Así, la PGI₂ y el NO interactúan sinérgicamente en la vasodilatación de los vasos sanguíneos y en la inhibición de la agregación plaquetaria. Otras funciones establecidas para el NO que difunde hacia la superficie luminal del endotelio son la captación de radicales superóxido, la modulación de la permeabilidad endotelial y la regulación de la función de los leucocitos (Drexler H, 1998; González I, 1997).

La identidad química del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) permanece controvertida, aunque es probable que sea un metabolito muy lábil del ácido araquidónico formado a través de la vía del citocromo P-450. Su existencia se deduce al no poder bloquearse todos los efectos vasodilatadores endotelio dependientes por la administración de inhibidores de la síntesis de NO (L-N^G-monometil arginina (L-NMMA) y L-nitroarginina monometil éster (L-NAME)). El EDHF parece ser, además,

uno de los pocos agentes fisiológicos capaces de abrir los canales de potasio (Drexler H, 1998; González I, 1997).

Pero las células endoteliales también producen agentes vasoconstrictores como el tromboxano A₂ (TXA₂), la endotelina (ET), la prostaglandina H₂ y el anión superóxido. El endotelio regula, además, los niveles de angiotensina II (ANG II), pues la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) se expresa en la membrana de las células endoteliales. La ECA participa también en la degradación de la bradiquinina, que ejerce su acción vasodilatadora promoviendo la liberación de NO por el endotelio (Drexler H, 1998; González I, 1997).

La producción de ET se estimula por las fuerzas mecánicas tangenciales, la presencia de trombina, la ANG II, el factor de crecimiento transformador β (TGF- β) y la hipoxia. La única isoforma, de las tres descritas, producida en el endotelio es la endotelina 1 (ET-1) que se libera fundamentalmente hacia el interior de la pared vascular actuando principalmente de forma para y autocrina. El acoplamiento de la ET-1 con sus receptores en el músculo liso incrementa el calcio intracelular tanto por apertura de los canales de calcio voltaje-dependientes como por activación de la fosfolipasa C, provocando contracción del músculo liso vascular (efecto vasoconstrictor). Además, la ET-1 potencia el efecto vasoconstrictor de otras sustancias como la serotonina, catecolaminas y la ANG II. Por el contrario, la interacción de la ET-1 con sus receptores de la célula endotelial tiene efectos vasodilatadores mediados por un incremento de la formación de cGMP. Aunque se han descrito niveles elevados de ET-1 en plasma de pacientes con infarto de miocardio, angina inestable, insuficiencia cardíaca o enfermedad coronaria severa, su papel fisiopatológico en estos procesos no está suficientemente aclarado y podría tratarse de un modulador local del tono vascular más que de un modulador general (González I, 1997).

Numerosos factores endoteliales contribuyen también a regular el proceso de coagulación sanguínea. El endotelio produce factor activador del plasminógeno, que activa la plasmina y promueve la trombolisis, y sintetiza trombomodulina, una glucoproteína que se sitúa en la cara luminal del endotelio y actúa como receptor

endotelial de la trombina. Cuando la trombina se une a la trombomodulina pierde su capacidad hemostática y activa la proteína C que, a su vez, inhibe los factores de coagulación V y VIII. Además, el endotelio produce proteína S, un cofactor para la proteína C, reforzando así su acción anticoagulante. El EDHF contribuye a mantener la carga electronegativa de la superficie endotelial gracias a la cual se previene el depósito de las plaquetas activadas. Las nucleotidasas producidas en las células endoteliales degradan rápidamente el ADP producido por las plaquetas activadas que estimula la activación y el depósito de más plaquetas. La inhibición de la agregación plaquetaria se completa por la vía de la PGI₂ y del NO. Pero el endotelio también produce agentes que promueven la coagulación como el factor tisular, el factor de Von Willebrand y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) (Drexler H, 1998; González I, 1997).

De lo mencionado para los diferentes compuestos que regulan el tono vasomotor, la agregación plaquetaria, la fibrinólisis y el remodelado vascular, se deduce que su interacción es compleja y su efecto depende, en ocasiones, no tanto del metabolito en sí como de su acoplamiento a un tipo determinado de receptor en un tipo celular concreto (Drexler H, 1998; González I, 1997). Por ello debe considerarse desde un punto de vista integrado el papel de los diferentes sistemas o vías que participan en estos procesos, así como su posible interacción.

1.4. ÓXIDO NÍTRICO Y FUNCIÓN ENDOTELIAL

En 1980, un factor relajante derivado del endotelio (EDRF) era propuesto como mediador responsable de la relajación del músculo liso vascular causada por acetilcolina, un proceso que requería un endotelio intacto (Furchgott RF y Zawadzki JV, 1980). Más tarde se demostró que el EDRF era farmacológicamente idéntico al óxido nítrico (NO) y que su acción vasodilatadora estaba mediada por el incremento de la concentración de cGMP, y reducción consiguiente del calcio intracelular, tras su estimulación de la guanilato ciclasa (Moncada S y cols, 1998a; Moncada S y cols, 1998b).

El óxido nítrico es un radical libre ($\cdot\text{NO}$), un derivado gaseoso e inestable del nitrógeno con un número impar de electrones que le confiere una extraordinaria reactividad química. Es un compuesto extremadamente lábil, de vida efímera (2-30 segundos) (Lowenstein CJ y cols, 1994) y con una alta afinidad por la hemoglobina que lo inactiva e inhibe sus efectos. Como consecuencia de su reacción con oxígeno y agua se convierte en nitrato y nitrito, los productos finales estables de excreción del NO en el organismo (Ånggard E, 1994).

El NO es sintetizado, dependiendo de las necesidades fisiológicas, a partir de uno de los nitrógenos del grupo guanidino terminal de la L-arginina mediante una compleja reacción oxidativa catalizada por una familia de isoenzimas denominadas genéricamente óxido nítrico sintasas (NOSs; E.C. 1.14.13.39) (**Figura 1.4**).

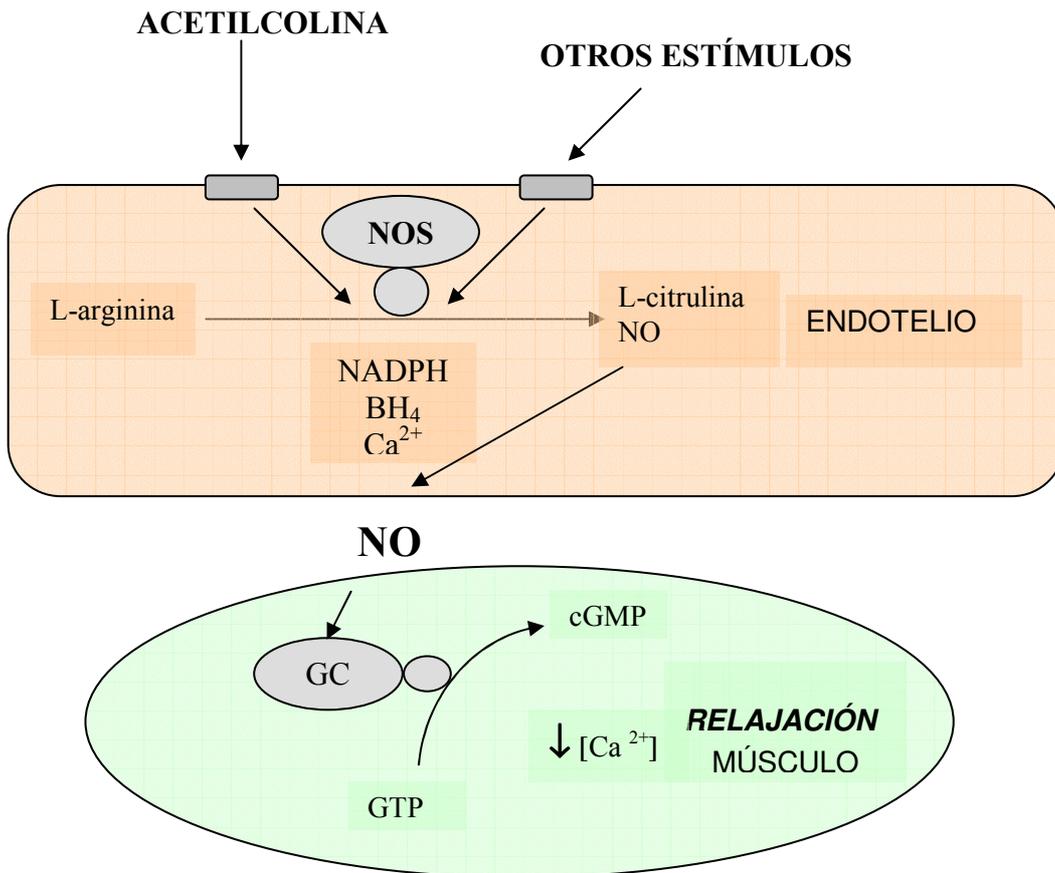


Figura 1.4. Mecanismo de la vasodilatación mediada por el óxido nítrico (NO). Modificado de Baron AD, 1996. (GC: guanilato ciclasa)

Hay al menos tres isoformas diferentes de NOSs (**Tabla 1.V**). Todas requieren oxígeno molecular, NADPH, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactores. Las NOS endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) son constitutivas, calcio/calmodulina dependientes, y generan pequeñas cantidades de NO con funciones fisiológicas diversas. Una tercera isoforma (iNOS) es calcio/calmodulina independiente y está implicada en la producción de grandes cantidades de NO durante periodos prolongados siendo un mediador esencial en la defensa del organismo. La actividad de las iNOSs es regulada por control transcripcional actuando como señales inductoras ciertas citoquinas (interferon- γ , TNF α , IL-1) o sustancias proinflamatorias de origen bacteriano (LPS). Las tres isoformas han sido purificadas, secuenciadas, clonadas y expresadas, y todas ellas son inhibidas por análogos competitivos de la L-arginina (Moncada S y Higgs A, 1993; Singh S y Evans TW, 1997). De hecho, dada la importancia de la vía L-arginina-NO en diferentes procesos patológicos, la búsqueda de inhibidores selectivos de las diferentes isoenzimas constituye uno de los objetivos prioritarios del diseño farmacológico actual.

nNOS	eNOS	iNOS
<i>Sistema nervioso</i>	<i>Sistema cardiovascular</i>	<i>Inmunidad no específica</i>
Neurotransmisor/ Neuromodulador del SNC: - respuestas al glutamato - plasticidad sináptica - nocicepción Función patológica: - Daño isquémico cerebral Transmisor nervios periféricos no adrenérgicos no colinérgicos: - Tracto gastrointestinal - Erección - Esfínter de vejiga - Flujo sanguíneo	Relajación del músculo liso vascular: - regulación del flujo sanguíneo - regulación de la presión arterial Inhibición de la agregación y reactividad plaquetaria	Resistencia a: - bacterias - hongos - protozoos - tumores? Funciones patológicas: <i>Estados de shock causados por:</i> - Endotoxinas/sepsis - Citoquinas Enfermedad inflamatoria y autoinmune: - Inflamación aguda - Colitis ulcerosa - Rechazo trasplantes - Artritis? - Esclerosis múltiple? - Asma?

Tabla 1.V. Localización y funciones de las NOSs. Modificado de Knowles R, 1994.

Compuestos químicamente relacionados con la arginina como la L-N^G-monometil arginina (L-NMMA) y el monometil éster de la L-nitroarginina (L-NAME) pueden abolir la respuesta vasodilatadora dependiente del NO endotelial al competir con el precursor natural del NO, la L-arginina, a nivel de su síntesis por la eNOS. El uso de estos compuestos ha sido clave para establecer el papel fisiopatológico del NO, y su acumulación en situaciones como la hipercolesterolemia o la diabetes puede jugar un importante papel en la disfunción endotelial que acompaña a estas patologías (Moncada S y Higgs A, 1993; Knowles R, 1994).

Aunque las células endoteliales fueron las primeras en las que se demostró la producción de NO en mamíferos, numerosos tipos celulares son capaces de realizar una síntesis activa de esta molécula (Moncada S y Higgs A, 1993; Knowles R, 1994). Los inhibidores de las NOSs causan un rápido aumento de la presión sistémica y cambios en el flujo sanguíneo regional en humanos y animales de experimentación, sugiriendo que uno de los principales papeles del NO bajo condiciones fisiológicas es regular el flujo sanguíneo (Curzen NP y cols, 1996). Específicamente, la cantidad de NO producido depende del tono vascular basal. El aumento del flujo y, por lo tanto, la fuerza de cizalla, puede provocar un aumento de agonistas relajantes dependientes del endotelio (Curzen NP y cols, 1994).

ACCIONES VASCULARES DEL ÓXIDO NÍTRICO
Potente vasodilatador del músculo liso
Inhibición de agregación y adhesión plaquetaria
Inhibición de la adhesión de leucocitos al endotelio activado
Inhibición de la proliferación y migración de las células del músculo liso vascular
Reducción de la oxidación de las LDL dependiente de macrófagos
Inhibición de la expresión de endotelina y del factor de crecimiento derivado de plaquetas por el endotelio vascular

Tabla 1.VI. Acciones vasculares del óxido nítrico. Modificado de Nadler JL y Winer L, 1996.

Numerosas enfermedades están asociadas con la síntesis reducida y/o con la degradación incrementada del NO vascular. Entre ellas se encuentran la hipercolesterolemia (Stroes ES y cols, 1995), la diabetes (Williams SB y cols, 1996), la hipertensión (Panza JA y cols, 1995), y el tabaquismo (Heitzer T y cols, 1996). La

reducción en la actividad del NO vascular contribuye a la disfunción endotelial y a las alteraciones en la reactividad vascular observadas en estas condiciones, además de jugar un importante papel en el desarrollo de arteriosclerosis (Li H y Förstermann U, 2000) (Tabla 1.VI).

1.5. ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN ENDOTELIAL

El estrés oxidativo, definido como un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes en favor de los primeros, está implicado en numerosos procesos fisiopatológicos (Drexler H, 1998; Betteridge J, 2000; Ceriello A, 2000; Cracowski JL y cols, 2000; Inouye M y cols, 2000; Borcea V y cols, 1999) ya que afecta la regulación del flujo sanguíneo, la inhibición de la agregación plaquetaria y de la adhesión leucocitaria y el control del crecimiento celular (Harrison DG, 1997; Alexander RW, 1995). La desregulación de estos procesos, como ya hemos comentado, está relacionada con la disfunción endotelial que media la enfermedad vascular asociada a hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes, arteriosclerosis, shock séptico y síndrome de distrés respiratorio del adulto (Sinclair DG y cols, 1994; Davies MG y cols, 1995).

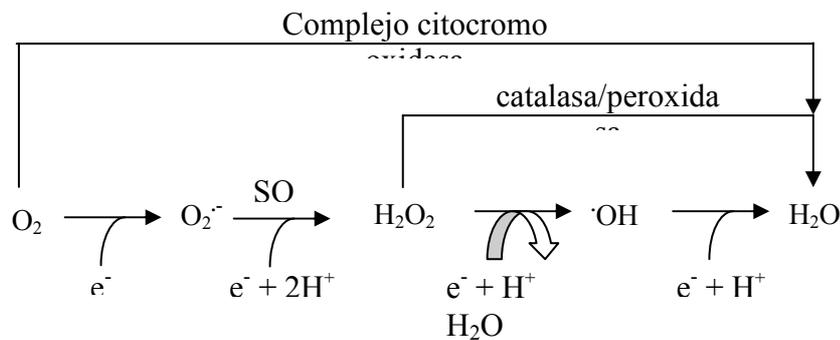


Figura 1.5. Reacciones de generación de radicales libres del oxígeno. Modificado de McIntyre M y cols, 1999. (SOD: superóxido dismutasa).

Los radicales libres son una consecuencia inevitable del metabolismo celular (Betteridge J, 2000; McIntyre M y cols, 1999). Son entidades químicas, comúnmente fragmentos de moléculas, con electrones desapareados que les confieren una extraordinaria reactividad. En los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) el

electrón no apareado se sitúa sobre el átomo de oxígeno (McIntyre M y cols, 1999) (**Figura 1.5**).

Entre los radicales libres mejor estudiados se encuentra el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), el más potente de los oxidantes conocidos. De vida extremadamente corta y elevada reactividad, el radical hidroxilo reacciona en su lugar de formación con la mayoría de las moléculas biológicas mediando la propagación de reacciones en cadena. El anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) no es en sí particularmente reactivo aunque puede actuar como oxidante débil o como agente reductor relativamente potente de complejos de hierro como el citocromo c. Su importancia fundamental radica en ser fuente de radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, otra especie oxidante aunque sin estructura de radical. Otros radicales libres son el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), un ejemplo de radical fisiológico de considerable interés por su papel como mediador del tono vascular; los metales de transición como el hierro y el cobre; y el peroxinitrito (ONOO^-), especie altamente oxidante generada por reacción entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el NO .

Diferentes procesos bioquímicos pueden generar radicales libres (Betteridge J, 2000). Pueden originarse dentro de las células como intermediarios reaccionales, tales como los implicados en la actuación de los enzimas redox y en la transferencia bioenergética de electrones. La reducción parcial del oxígeno molecular durante la respiración aeróbica genera anión superóxido y radical hidroxilo; los electrones liberados en la oxidación de las catecolaminas y en la cascada del ácido araquidónico pueden reducir el oxígeno molecular a superóxido; los fagocitos activados producen superóxido y ácido hipocloroso, otro potente oxidante; el endotelio vascular y numerosas células generan de forma habitual NO y son capaces de formar superóxido (NOSs y oxidasas). Además, los radicales libres pueden producirse en respuesta a radiaciones electromagnéticas externas, como los rayos gamma, que pueden descomponer el agua para producir radicales hidroxilo (Betteridge J, 2000; Ceriello A, 2000). Pueden aparecer también bajo circunstancias menos controladas y provocar, dada su gran reactividad, daños reversibles o irreversibles en proteínas, lípidos o DNA (Halliwell B, 1987).

La elevada inestabilidad química de los radicales libres les hace reaccionar localmente con las macromoléculas biológicas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos) produciendo reacciones encadenadas de radicales libres. El incremento de grupos carbonilo en las cadenas laterales de los aminoácidos, el descenso de grupos SH, el entrecruzamiento o la fragmentación son algunos de los efectos de la modificación oxidativa de las proteínas por radicales libres. Esta oxidación puede dar lugar a una pérdida o modificación de la actividad biológica de las proteínas y alterar su recambio. Los efectos de los radicales libres sobre el DNA incluyen roturas de cadenas, modificaciones de bases y entrecruzamientos DNA-proteína (Betteridge J, 2000; Ceriello A, 2000; Cracowski JL y cols, 2000).

Pero la consecuencia más extensamente estudiada del ataque por radicales libres es la peroxidación lipídica debido, probablemente, a su repercusión en el daño vascular (Betteridge J, 2000). El radical hidroxilo tiene la capacidad de abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno ($-CH_2-$) de los ácidos grasos dejando un electrón no apareado en el carbono ($-CH\cdot$). Los ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles al ataque por radicales libres debido a que la presencia de dobles enlaces debilita el enlace carbono-hidrógeno en el átomo de carbono adyacente. El radical generado sobre el carbono sufre un reajuste molecular para formar un dieno conjugado que es capaz de combinarse con el oxígeno para formar un radical peroxilo que puede abstraer un nuevo átomo de hidrógeno y empezar una reacción en cadena que continua hasta el agotamiento del sustrato o la interrupción del proceso por un antioxidante como la vitamina E (Drexler H, 1998; Cracowski JL y cols, 2000). Los peróxidos lipídicos resultantes son compuestos bastante estables pero su descomposición puede ser catalizada por metales de transición y complejos de metales dando lugar a nuevos radicales capaces de estimular más la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica puede tener efectos profundos sobre las funciones celulares pues afecta a las membranas produciendo cambios en fluidez, aumento de permeabilidad, disminución del potencial de membrana y, finalmente, su rotura. En el mismo sentido, la oxidación de las partículas LDL parece jugar un papel central en el proceso aterogénico (Drexler H, 1998; Betteridge J, 2000; Ceriello A, 2000; Cracowski JL y cols, 2000; Inouye M, 2000), tal y como comentaremos más adelante en el apartado 1.7.2.

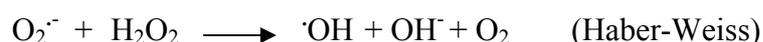
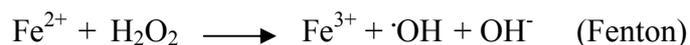
La toxicidad potencial de los radicales libres ha llevado a los organismos a desarrollar mecanismos defensivos contra ellos (Frei B, 1999; Oliva MR y Sáez GT, 1996), las denominadas defensas antioxidantes. De acuerdo con Gutteridge, antioxidante es cualquier sustancia que estando presente a bajas concentraciones, en relación a las del sustrato oxidable, retrasa considerablemente o inhibe la oxidación de dicho sustrato. Los sistemas defensivos contra la acción pro-oxidante de los intermediarios reactivos del oxígeno (ROS) incluyen varios grupos de moléculas y mecanismos diferentes que contribuyen al unísono a mantener el frente antioxidante celular (**Tabla 1.VII**).

Defensas antioxidantes
Proteínas antioxidantes
<u>No enzimáticas</u> Proteínas de unión a Fe y Cu (albúmina, transferrina, ceruloplasmina, etc.)
<u>Enzimáticas</u> Superóxido dismutasa, catalasa, GSH peroxidasas (principalmente intracelulares)
Pequeñas moléculas antioxidantes
<u>Hidrosolubles</u> Ácido úrico Ácido ascórbico (Vitamina C) Bilirrubina unida a albúmina Glutation (GSH)
<u>Liposolubles</u> α,γ -Tocoferol (Vitamina E) Ubiquinol-10 (coenzima Q ₁₀) β -Caroteno (Pro-Vitamina A)

Tabla 1.VII. Defensas antioxidantes en el plasma humano. Modificado de Frei B, 1999.

El sistema intracelular más efectivo es la triada enzimática formada por la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx) responsables de la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y de la reducción de éste y de otros peróxidos, respectivamente, a especies más estables. Se trata de metaloproteínas conjugadas con distintos metales de transición como el cobre, el hierro, el manganeso y el selenio. La estrategia antioxidante de estas actividades enzimáticas va encaminada claramente a evitar la interacción del $O_2^{\cdot-}$ o de metales de transición con el H_2O_2 evitándose así la

formación de radicales $\cdot\text{OH}$ generados por la reacción de Haber-Weiss y/o Fenton respectivamente. Además, la habilidad de la citocromo oxidasa mitocondrial para funcionar catalíticamente en la cadena de transporte electrónico, sin prácticamente liberar especies reactivas del oxígeno, disminuye considerablemente la potencial producción intracelular de radicales libres (Oliva MR y Sáez GT, 1996).



Antioxidantes lipofílicos como la vitamina E, el β -caroteno y el coenzima Q₁₀ actúan a nivel de las membranas celulares interrumpiendo la reacción en cadena de peroxidación lipídica. La regeneración de la vitamina E es llevada a cabo por la vitamina C. Los principales antioxidantes extracelulares son proteínas que unen metales (transferrina, lactoferrina y ceruloplasmina) y compuestos de bajo peso molecular con propiedades antioxidantes (bilirrubina, glutatión, vitamina C, urato). También se han descrito formas extracelulares de glutatión peroxidasas y superóxido dismutasas (Betteridge J, 2000; Borcea y cols, 1999; Cracowski JL y cols, 2000; Inouye M, 2000).

Junto a estos sistemas se encuentran mecanismos defensivos enzimáticos coadyuvantes o de soporte de los anteriores (Oliva MR y Sáez GT, 1996). Son los sistemas reparadores de moléculas previamente afectadas, como las DNA glicosilasas y endonucleasas, o bien proteínas encargadas de la degradación de regiones polipeptídicas oxidadas. También contribuyen a la acción antioxidante otros sistemas enzimáticos para el suministro de cofactores apropiados como el GSH regenerado a través de la glutatión reductasa a expensas de NADPH producido en la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenada (Oliva MR y Sáez GT, 1996).

El hecho de que la sobreproducción de ROS (estrés oxidativo) bajo condiciones patológicas sea una parte integral en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, se debe a que diferentes procesos vasculares son regulados por los ROS bajo condiciones fisiológicas. Así, el normal funcionamiento vascular depende de un fino equilibrio entre sistemas pro y antioxidantes, ya que los ROS modulan diferentes vías de señalización

celular y numerosas funciones vasculares. Particularmente sensibles al estado redox celular son los sistemas de transporte de iones, la fosforilación de proteínas y la expresión génica, procesos que regulan funciones celulares tan importantes como el crecimiento, apoptosis, migración, angiogénesis y adhesión celular (**Tabla 1.VIII**). (Rojas A y cols, 2006).

Vías de señalización dependientes de ROS			
	Transporte iónico	Fosforilación proteica	Expresión génica
Dianas moleculares	<ul style="list-style-type: none"> • Canales K⁺ (Ca⁺⁺ dependientes) • Ca⁺⁺ intracelular • Canales TRPC 	<ul style="list-style-type: none"> • P42/p44 MAPK • P38 MAPK • c-jun quinasa • CaMKII • Akt • PI3K 	<ul style="list-style-type: none"> • AP-1 • NFkB • HIF-1 • PPARs
Funciones en la pared vascular	<ul style="list-style-type: none"> • Vasorrelajación • Hiperpolarización • “Sensing” del oxígeno 	<ul style="list-style-type: none"> • Apoptosis • Crecimiento celular • Supervivencia celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Adhesión celular • Activación celular

Tabla 1.VIII. Vías de señalización de radicales libres en la pared vascular. A través de múltiples vías de señalización red-ox las ROS interactúan con múltiples dianas proteicas modificando el fenotipo celular. (ROS: especies reactivas de oxígeno; TRPC: canales catiónicos; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; CaMKII: quinasa Ca²⁺/calmodulina dependiente tipo II; Akt: proteína quinasa B; PI3K: fosfoinosítido-3-quinasa; AP1: proteína activadora 1 (factor de transcripción); NF-kB: factor nuclear kB (factor de transcripción); HIF-1: factor inducible por la hipoxia-1 (factor de transcripción); PPARs: receptores activados por proliferadores de peroxisomas). Modificado de Rojas A y cols, 2006.

Numerosos sistemas enzimáticos contribuyen a la generación de ROS (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, ácido hipocloroso y radical hidroxilo) en la pared vascular (**Tabla 1.IX**). Entre ellos destacan las NAD(P)H oxidasas (NOXs), al parecer, la principal fuente de O₂⁻ endotelial y vascular, y con gran protagonismo en la enfermedad cardiovascular. Su actividad se encuentra regulada por factores humorales (citoquinas, factores de crecimiento y agentes vasoactivos) y físicos (tensión, fuerza de cizalla), además de por otros radicales libres o productos de peroxidación lipídica. En arterias coronarias humanas de pacientes diabéticos (Guzik TJ y cols, 2002)

y ateroscleróticos (Sorescu D y cols, 2002) se ha demostrado un aumento de la producción de O_2^- junto con niveles incrementados de p22phox y subunidades de Nox, elementos necesarios en la actividad NAD(P)H oxidasa. Sin embargo, según indican otros estudios, varias vías de señalización podrían mediar la activación de este enzima en respuesta a diferentes estímulos en la enfermedad cardiovascular (Mollnau H y cols, 2002; Touyz RM y cols, 2002).

Otras fuentes importantes de O_2^- a nivel vascular serían el sistema xantina oxidoreductasa (X/XO), las óxido nítrico sintasas desacopladas (NOSs; véase más adelante), la ciclooxigenasa (COX), la mieloperoxidasa (MPO) y la actividad mitocondrial. La relevancia de los sistemas mencionados en la enfermedad cardiovascular podría variar en función de la patología de base desencadenante (diabetes, HTA, tabaquismo, hipercolesterolemia...) (Rojas A y cols, 2006).

	Fuentes de ROS NADP(H) oxidasa, COX, X/XO, mitocondria, NOS desacoplada	
	Efectos fisiológicos de los ROS	
Células diana en la pared vascular	Células endoteliales	Células del músculo liso
Efectos principales	<ul style="list-style-type: none"> • Vasorrelajación • Apoptosis/Anoikis • Moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) • Angiogénesis • Permeabilidad vascular 	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento celular • Migración celular • Regulación matriz • Remodelación vascular

Tabla 1.IX. Principales fuentes de ROS en la pared vascular y sus efectos sobre células endoteliales y musculares. (ROS: especies reactivas de oxígeno; NADP(H): nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (forma reducida); COX: ciclooxigenasa; X/XO: sistema xantina oxidoreductasa; NOS: óxido nítrico sintasa). Modificado de de Rojas A y cols, 2006.

1.6. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Bajo condiciones normales existe un equilibrio entre los factores producidos por el endotelio, lo que implica un equilibrio entre la contracción y la relajación de la musculatura de los vasos, entre los procesos de coagulación y de proliferación celular. Sin embargo, la edad, los factores de riesgo cardiovascular y diversos procesos patológicos, entre los que se encuentran la hipercolesterolemia, la HTA y la diabetes, pueden alterar la compleja función endotelial. Esta situación, denominada disfunción endotelial, contribuye fuertemente a la enfermedad vascular y en su prevención y/o corrección se perfilan los futuros tratamientos de las enfermedades vasculares, la primera causa de muerte en los países industrializados.

El equilibrio fisiológico entre agentes vasodilatadores y vasoconstrictores depende de la integridad funcional del endotelio. Sin embargo, la función endotelial se deteriora con el tiempo. La continua influencia de la presión tangencial, el estrés oxidativo y los numerosos factores de riesgo cardiovascular aceleran el envejecimiento de las células endoteliales y afectan su proceso de regeneración. A medida que se incrementa el número de células endoteliales regeneradas disminuye la capacidad endotelial de impedir la agregación plaquetaria y la formación de trombina, además de fracasar en el control del tono vascular (González I, 1997).

Los hombres manifiestan antes el proceso de envejecimiento endotelial que las mujeres (Celermajer DS y cols, 1994). Se ha comprobado que el 17β -estradiol inhibe la apoptosis en cultivos de células endoteliales (Gips SJ y cols, 1996), que la administración continuada de estrógenos en mujeres postmenopáusicas disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular (Manolito TA y cols, 1993) y que la administración de estrógenos, incluso en hombres, mejora la relajación coronaria dependiente del endotelio (Blumenthal RS y cols, 1996). Los estrógenos circulantes pueden mejorar el perfil lipídico y reducir los niveles de fibrinógeno, inhiben la hiperplasia de la íntima, reducen la biosíntesis de colágeno, aumentan la producción de PGI₂ e, incluso, manifiestan un cierto efecto bloqueante de los canales de calcio. Pero su

mecanismo protector más interesante es el incremento directo de la actividad del EDRF (NO), favoreciendo la vasodilatación y el aumento de la perfusión distal.

El endotelio intacto, normofuncionante, permite también una exquisita homeostasis de los fenómenos trombóticos y antitrombóticos y del transporte de lípidos. La lesión endotelial condiciona la disfunción de estos procesos alterando el complejo equilibrio entre sustancias con efectos contrapuestos. Se favorece la agregación plaquetaria, y se estimula la producción del factor de crecimiento plaquetario (PGF) que estimula la proliferación de las células musculares lisas y de los macrófagos. Tanto las células musculares como los macrófagos y las células del propio endotelio son capaces de sintetizar PGF (González I, 1997), perpetuándose el proceso. El endotelio lesionado también permite una mayor infiltración lipídica, favoreciendo la formación de LDL modificada y la captación de β VLDL por parte de los macrófagos, procesos que acentúan las alteraciones del endotelio y contribuyen a cerrar el círculo de progresión del proceso arteriosclerótico.

La disfunción endotelial está presente tanto en pacientes con aparente arteriosclerosis como en aquellos con factores de riesgo cardiovascular como hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial, etc. Tal es así que estudios recientes demuestran que el estudio de la función endotelial en la circulación coronaria y general puede ofrecer información pronóstica sobre un futuro desarrollo de eventos cardiovasculares (Heitzer T y cols, 2001).

Las alteraciones funcionales y/o estructurales del endotelio vascular que inician el proceso arteriosclerótico tienen, al margen de las diferencias en el estímulo inicial desencadenante, características comunes en las distintas patologías de riesgo cardiovascular (dislipemia, resistencia a la insulina, diabetes, hipertensión arterial). En estos procesos, la respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente está alterada, de forma que estímulos que normalmente inducen vasodilatación, generan ahora vasoconstricción o vasodilatación muy pobre. Esta respuesta anormal puede deberse a insuficiente producción de compuestos vasodilatadores o a su inactivación. Sea cual fuere el mecanismo inicialmente desencadenante, se altera el equilibrio fisiológico con

claro predominio de los agentes vasoconstrictores. Consideraremos, dadas las características de este trabajo, los mecanismos implicados en la disfunción endotelial en el caso concreto de la hipercolesterolemia. Sin embargo, es más que probable que los mecanismos señalados sean, en mayor o menor grado, aplicables a otras patologías de riesgo cardiovascular.

1.7. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL E HIPERCOLESTEROLEMIA: PAPEL DE LA ADMA

Entre los principales factores que contribuyen a la disfunción endotelial en la hipercolesterolemia se encuentran: (1) la disminución de la actividad y/o expresión de la eNOS y/o (2) el aumento de la producción de radicales libres del oxígeno a nivel vascular y/o (3) el aumento de la dimetil-arginina asimétrica (ADMA). Dado que los tres fenómenos están íntimamente relacionados, es difícil explicar sus acciones de forma individual; por este motivo en el cuarto apartado se comentan, como nexo de unión, el efecto de diferentes aproximaciones terapéuticas (arginina, antioxidantes, estatinas) sobre las diferentes manifestaciones clínicas de la arteriosclerosis así como sobre el estrés oxidativo, la concentración de ADMA y el desacoplamiento de la eNOS.

1.7.1. Disminución de la actividad y/o expresión de la eNOS

Los estudios en modelos animales y humanos han demostrado que la enfermedad vascular y la arteriosclerosis inducidas por la hipercolesterolemia se caracterizan por una precoz y selectiva disminución de la relajación dependiente del endotelio, consecuencia de un descenso en la biodisponibilidad de NO. En la fase inicial del proceso existe una pérdida selectiva de respuesta de la síntesis de NO a estímulos extracelulares mediados por receptor (p.e. acetilcolina), sin afectación de la capacidad de activación máxima de la enzima ni de la degradación del NO. A medida que la enfermedad progresa, se produce una inhibición inespecífica de la biodisponibilidad de NO que, aunque probablemente de origen multifactorial, implica un bloqueo acelerado de esta molécula por aniones superóxido. Como resultado de estos procesos se incrementan la adhesión de neutrófilos al endotelio, la agregación plaquetaria y la

proliferación de células del músculo liso, eventos clave en el desarrollo de arteriosclerosis. (Hamilton CA , 1997; Itabe H y Takano T, 2000; Scott J, 2004).

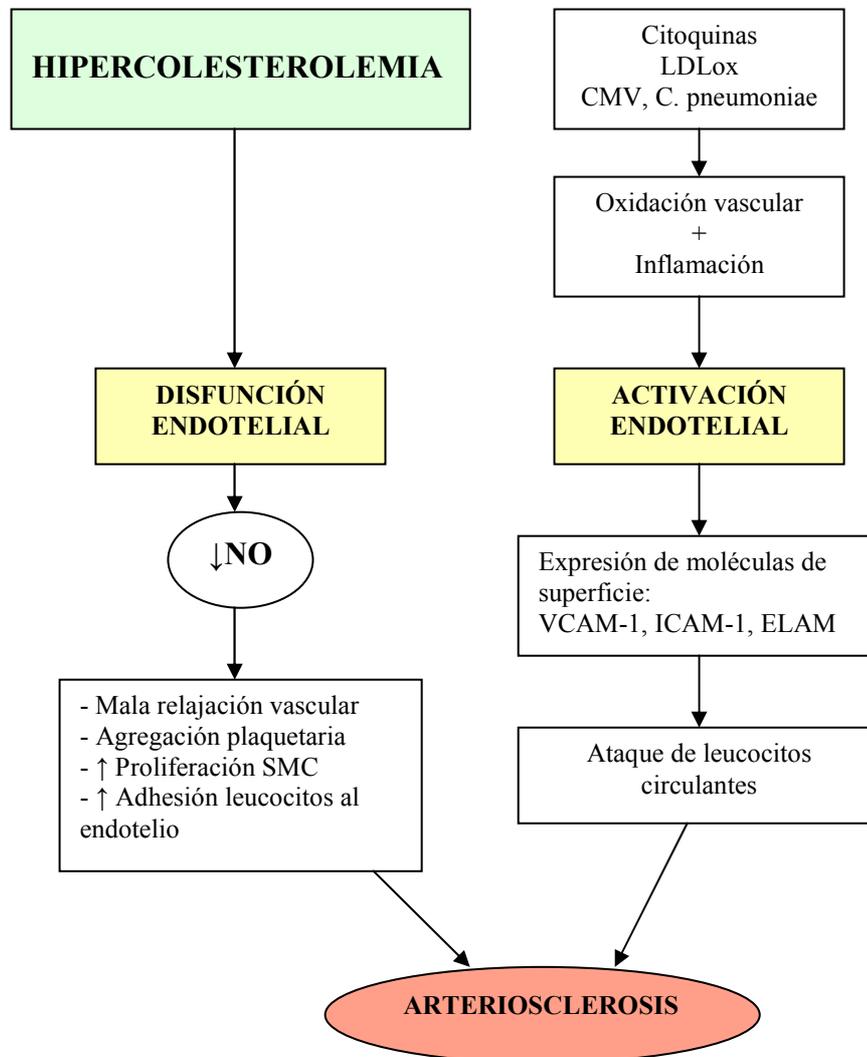


Figura 1.6. Papel de la hipercolesterolemia en las alteraciones endoteliales que conducen al desarrollo de arteriosclerosis. (NO: óxido nítrico; SMC: células músculo liso; LDLox: lipoproteínas de baja densidad oxidadas; CMV: Citomegalovirus; C. pneumoniae: Chlamidia pneumoniae)

La disfunción de la vasodilatación dependiente del endotelio se incrementa por la coexistencia de diferentes factores de riesgo cardiovascular, dentro de los cuales los niveles de LDL y HDL colesterol en plasma se consideran determinantes (Böger RH y cols, 1998). La relación directa entre el LDL colesterol y el desarrollo de enfermedad coronaria está ya bien descrito, así como el papel protector frente a ella de la elevación

del HDL colesterol. Sin embargo, la contribución del LDL colesterol al desarrollo de ATC es particularmente compleja (**Figura 1.6**), y no aclarada en su totalidad, ya que existen pacientes con alto riesgo de desarrollar enfermedad coronaria que no presentan cifras elevadas de LDL. Tal es el caso de pacientes con elevado estrés oxidativo, hipertensión arterial, diabetes tipo 2, fracaso renal o fumadores, que presentan niveles normales de LDL. En este sentido, numerosos estudios han contribuido a establecer que el potencial aterogénico de las LDL se incrementa considerablemente como consecuencia de su modificación oxidativa (Rosenson RS, 2004).

Una relación entre niveles de HDL y LDL colesterol y actividad de la eNOS (clave en los estadios iniciales de la disfunción endotelial, como se ha señalado previamente) ha podido establecerse gracias a recientes estudios realizados en células endoteliales, fracciones membranosas y animales de experimentación genéticamente modificados (Uittenbogaard A y cols, 2000; Blair A y cols, 1999; Mineo C y Shaul PW, 2003; Puddu GM y cols, 2005). La eNOS se encuentra normalmente localizada en caveolas ricas en colesterol (**Figura 1.7**) donde forma parte de un módulo completo de señalización que incluye desde receptores extracelulares (entre los que se encuentran los de acetilcolina y estrógenos) hasta sistemas efectores intracelulares que regulan el nivel local de calcio. El microambiente lipídico y, concretamente, el contenido en colesterol de las caveolas, resulta fundamental tanto para la permanencia en ellas de la eNOS como para una actividad óptima del enzima (Uittenbogaard A y cols, 2000).

Experimentos “*in vitro*” han demostrado que el LDL oxidado (LDL_{ox}) inhibe la activación de eNOS por acetilcolina disminuyendo, así, las respuestas mediadas por el NO (Blair A y cols, 1999). De acuerdo con estos resultados, se ha comprobado que el LDL_{ox}, a través de su interacción con el receptor de clase B CD36, provoca una depleción de colesterol en las caveolas que lleva al desplazamiento selectivo de la eNOS (sin afectar su grado de fosforilación, palmitoilación o miristoilación) y, en consecuencia, a un descenso en su susceptibilidad a la activación (Blair A y cols, 1999).

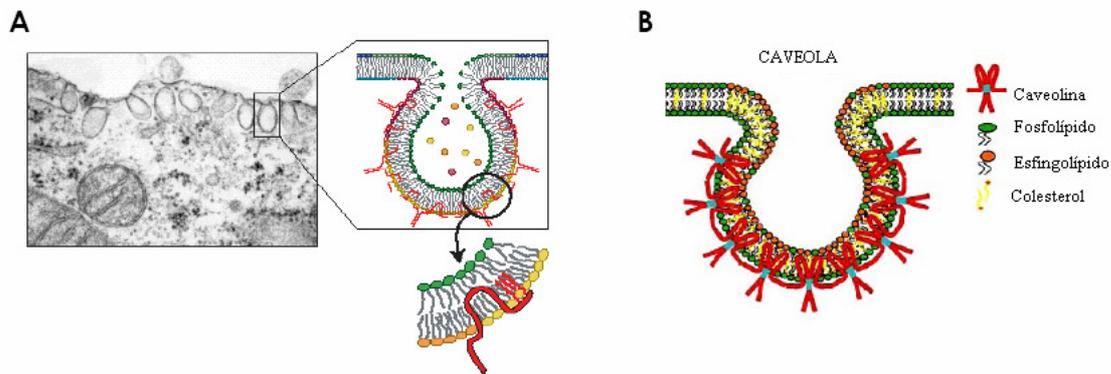


Figura 1.7. A. Micrografía electrónica de una caveola en la membrana plasmática de un fibroblasto humano. B. Diagrama que muestra la composición de una caveola. Modificado de Razani B y cols, 2002.

Los efectos adversos del LDLox se previenen completamente por el HDL a través de su interacción con el receptor SR-BI, colocalizado con la eNOS en las caveolas (Uittenbogaard A y cols, 2000; Mineo C y Shaul PW, 2003). Vía esta interacción, el HDL repone el colesterol de las caveolas y restaura el microambiente lipídico necesario para la actividad de eNOS, al tiempo que la activa promoviendo su fosforilación vía quinasas src, PI3 y akt. De acuerdo con esta observación, el HDL es un potente activador de la eNOS en células endoteliales, favoreciendo fuertemente la vasorelajación dependiente de NO. Este mismo mecanismo explicaría el papel protector del HDL “*per se*” en la aterogénesis bajo condiciones en las que no existe elevación del LDL colesterol (Uittenbogaard A y cols, 2000; Mineo C y Shaul PW, 2003).

1.7.2. Aumento de la producción de radicales libres de oxígeno a nivel vascular

A pesar de la relevancia del estrés oxidativo en el proceso de aterogénesis, no se han establecido claramente los eventos bioquímicos iniciales que desencadenan la hiperproducción de radicales libres en la hipercolesterolemia. Es posible que el propio descenso en la biosíntesis de NO, característico de las etapas iniciales de la disfunción endotelial, permita un aumento de la expresión regulada por citoquinas de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, ELAM) que faciliten la adhesión de neutrófilos al endotelio, la agregación plaquetaria y la proliferación de células del músculo liso, eventos clave en el desarrollo de arteriosclerosis (Sydow K y Münzel T, 2003; Rosenson RS, 2004; Hayashi T y cols, 2006). La acumulación de células de la

inflamación puede aumentar el nivel de estrés oxidativo ya que son una rica fuente de radicales superóxido. Otros eventos desencadenantes de la hiperproducción temprana de ROS en la hipercolesterolemia serían la activación de NF- κ B y de sistemas enzimáticos generadores de superóxido como la NAD(P)H oxidasa, sensibles tanto a los niveles de colesterol como al estado redox (Rojas A y cols, 2006); otra fuente de superóxido sería la actividad de la eNOS “desacoplada” (véase más adelante).

A medida que la enfermedad progresa se instaura claramente la situación de estrés oxidativo como consecuencia de un proceso de amplificación al que contribuyen, por un lado, la generación de LDLox, mucho más efectivo que el LDLn en producir daño endotelial y, por otro, el bloqueo acelerado del NO por los aniones superóxido generando peroxinitrito (Rosenson RS, 2004; Cominacini L y cols, 2001).

La oxidación de las partículas LDL parece jugar un papel central en el proceso aterogénico (Rosenson RS, 2004). Diferentes factores determinan la especial susceptibilidad a la oxidación de las LDL; entre ellos se encuentran el tamaño y composición de las partículas LDL y la relación especies prooxidantes/antioxidantes, tanto de la propia partícula como del medio circundante. Las partículas LDL muestran una gran heterogeneidad en tamaño, densidad y composición. Las pequeñas y densas son las de mayor potencial ateroesclerótico, debido a su mayor facilidad para atravesar la pared vascular y quedar atrapadas en la matriz extracelular, tras adherirse a proteoglicanos (Rosenson RS, 2004; Anber V y cols, 1996). Además las partículas pequeñas de LDL, con un diámetro de 25’5 nm o inferior, son más susceptibles a la oxidación como consecuencia de su menor contenido en antioxidantes (particularmente α -tocoferol y ubiquinona) en su superficie (Rosenson RS, 2004). Bajo tales condiciones, las partículas LDL son una diana fácil para el ataque por los radicales libres generados por células endoteliales y macrófagos a nivel de las lesiones ateroescleróticas, tal y como se ha observado en la íntima de vasos ateroescleróticos de humanos (Rosenson RS, 2004). Las HDL podrían prevenir parcialmente la oxidación de LDL debido, probablemente, a los enzimas que lleva asociados, como paraoxonasa (Navab M y cols, 2000).

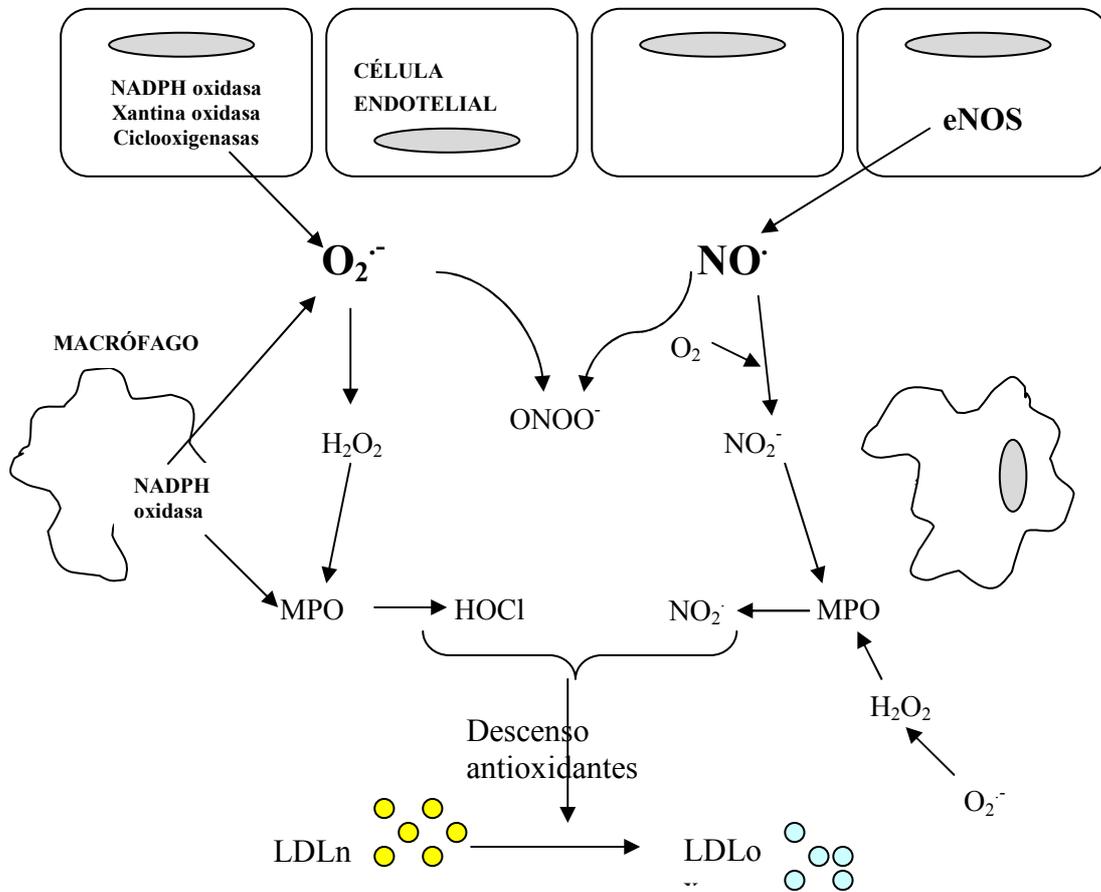


Figura 1.8. Esquema que representa los diversos enzimas identificados en la ATC que se han relacionado con la oxidación de LDL. Estos enzimas, presentes en células endoteliales y macrófagos, producen distintas especies reactivas de oxígeno que oxidan a LDL. (eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; NO: óxido nítrico; LDLn: LDL nativa; LDLox: LDL oxidada, MPO: mieloperoxidasa). Modificado de Rosenson RS, 2004.

La oxidación de las LDL incrementa su capacidad para unirse a la matriz extracelular, siendo retenidas en la íntima para formar la placa de ateroma (**Figura 1.8**). Así, se ha descrito una relación directa entre niveles de LDLox y grosor de las capas íntima y media de carótidas en sujetos clínicamente sanos (Hulthe J y Fagerberg B, 2002). En el mismo sentido, el aumento del cociente LDLox/LDLn se ha relacionado con la severidad de las placas ateroscleróticas coronarias en humanos (Vasankari T y cols, 2001), lo que ha llevado a sugerir que el nivel de anticuerpos frente a LDLox podría predecir la progresión o regresión de la ATC (Inoue T y cols, 2001).

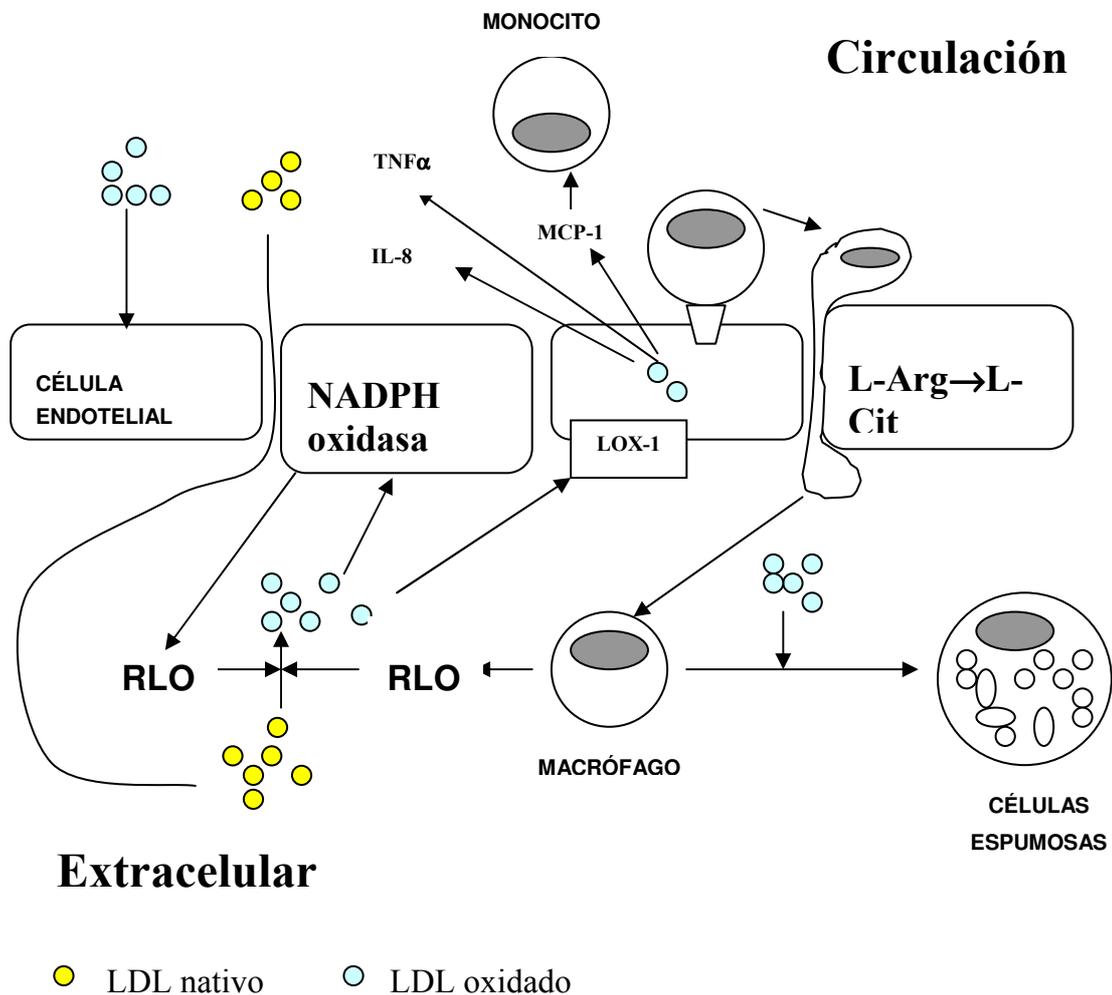


Figura 1.9. Esquema de los efectos del LDL oxidado en el desarrollo de la placa de ateroma. (TNF α : factor de necrosis tumoral α ; IL-8: interleuquina-8; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1; LOX-1: receptor de LDLox similar a lectina-1; L-Arg: L-arginina; L-Cit: L-citulina). Modificado de Rosenson RS, 2004.

Como puede observarse en la **Figura 1.9**, el LDLox provoca la liberación de sustancias pro-inflamatorias como MCP-1 e IL-8 por células endoteliales y/o macrófagos. De esta forma provoca la quimiotaxis de monocitos dentro de la pared del vaso para convertirse en macrófagos que, una vez cargados de lípidos, se transforman en células espumosas, componentes celulares muy abundantes en las placas ateroscleróticas. En el estudio AIR (Arteriosclerosis y resistencia insulínica), el LDLox

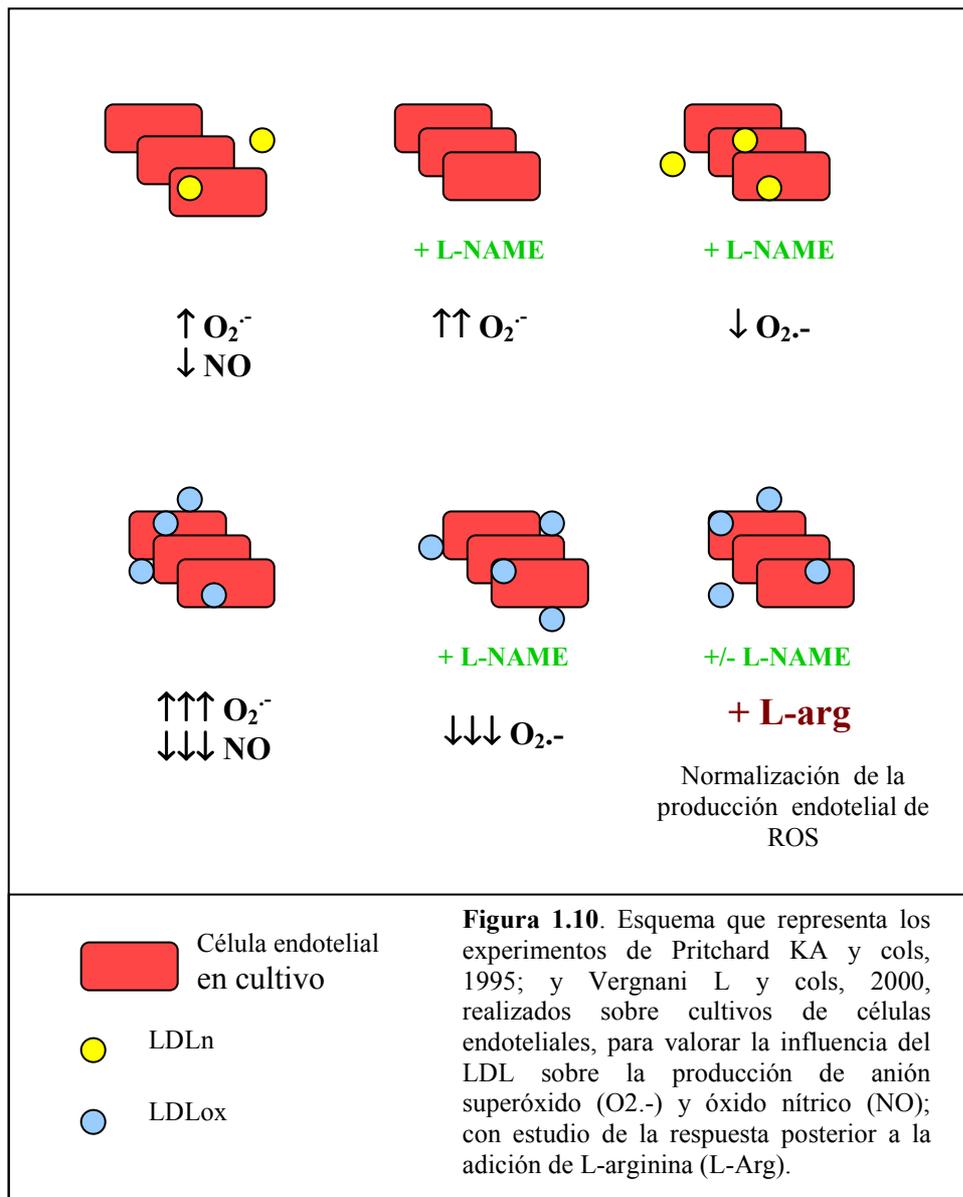
se asoció a ATC subclínica y niveles elevados de mediadores de la inflamación como TNF α y PCR (proteína C reactiva) (Rosenson RS, 2004).

Tal y como hemos indicado previamente, otro mecanismo que contribuye a la amplificación y diversificación de radicales reactivos durante el progreso de la lesión arteriosclerótica implica a la NOS. Los macrófagos activados presentes en el área lesionada expresan el isoenzima inducible (iNOS), capaz de producir grandes cantidades de NO, que rápidamente interactúa con el anión superóxido para formar peroxinitrito, un intermediario altamente reactivo. La reacción para formar peroxinitrito se produce a una elevada velocidad, tres o cuatro veces más rápida que la dismutación de superóxido por la superóxido dismutasa. El peroxinitrito, además de reducir la disponibilidad de NO, a elevadas concentraciones es citotóxico y produce daño oxidativo a proteínas, lípidos y DNA, que suele evaluarse por la presencia de residuos de nitrotirosina. El aumento de iNOS y nitrotirosina en las lesiones arterioscleróticas de conejos hipercolesterolémicos evidencia la importancia de este mecanismo en la ATC (Hayashi T y cols., 2006).

Numerosas evidencias indican que, bajo ciertas condiciones experimentales, tanto la eNOS como la iNOS pueden ser también una fuente importante de iones superóxido. Para ello se requiere el “desacoplamiento” del enzima. En el estado desacoplado, los electrones que fluyen desde el dominio reductasa hasta el dominio oxigenasa de la NOS son desviados al oxígeno molecular en lugar de a la arginina (el sustrato normal), resultando en la producción de superóxido en lugar de NO. El desacoplamiento de la NOS se ha observado habitualmente bajo condiciones de limitada disponibilidad de arginina o del cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄) (Cosentino F y cols, 1998; Stroes E y cols, 1997; Heitzer y cols, 2000).

El desacoplamiento de NOS podría ser importante en la hipercolesterolemia y otras situaciones de riesgo cardiovascular, ya que está perfectamente establecido que la administración exógena de arginina o BH₄ mejora la disfunción endotelial e, incluso, retrasa o revierte la progresión de las lesiones ateroscleróticas en éstas situaciones (Böger RH y cols, 1998; Hayashi T y cols, 2006). Respecto a los factores implicados en el desacoplamiento de la NOS, estudios en células endoteliales han establecido que

tanto el LDLn (Pritchard KA y cols, 1995) como, y principalmente, el LDLox (Vergnani L y cols, 2000), son capaces de estimular la producción endotelial de anión superóxido (y disminuir la de NO) vía interacción con el receptor LOX-1 (Cominacini L y cols, 2001). En todos estos estudios, los efectos fueron revertidos por la adición de L-NAME, un inhibidor de la eNOS, o arginina, el sustrato habitual del enzima (**Figura 1.10**).



El aumento de peroxinitrito podría mediar la oxidación del cofactor de la NOS, tetrahidrobiopterina (BH_4) (Cosentino F y cols, 1998; Stroes E y cols, 1997; Heitzer y

cols, 2000), e inactivarlo como cofactor al producir dihidrobiopterina (BH₂) (Laursen JB y cols, 2001; Milstien S y Katusic Z, 1999), o podría oxidar directamente el núcleo zinc-tiolato de la eNOS, produciendo la liberación de zinc desde la enzima (Zou MH y cols, 2002). Cualquiera de las dos posibilidades conduciría al desacoplamiento de la NOS (Sydow K y Münzel T, 2003). Al hilo de estos resultados, el aumento de ADMA (dimetilarginina asimétrica) observado durante la incubación de células endoteliales con LDLn u LDLox podría contribuir al desacoplamiento de la NOS (Böger RH y cols 2000a), tal y como se comenta seguidamente.

1.7.3. Aumento de dimetil-arginina asimétrica (ADMA)

La ADMA es un inhibidor endógeno de la NOS que, en la actualidad, está recibiendo considerable interés por su posible contribución a la disfunción endotelial. La concentración normal de ADMA en plasma es del orden de 1-2 µM, habiéndose descrito elevaciones en distintas patologías tales como hipertensión, hiperlipemia, hiperhomocisteinemia, enfermedad coronaria, oclusión arterial periférica, fallo cardíaco congestivo, accidentes cerebrovasculares, hipertensión pulmonar, enfermedad renal avanzada, etc. Además, la ADMA parece ser un predictor de mortalidad cardiovascular o mortalidad por cualquier causa en pacientes con insuficiencia renal crónica y eventos coronarios agudos. No está claro si la ADMA es un marcador de enfermedad cardiovascular o, por el contrario, es un factor predisponente (Sydow K y Münzel T, 2003).

El origen del posible aumento de ADMA en la hipercolesterolemia todavía es desconocido. A nivel metabólico, los diferentes derivados metilados de la arginina derivan de la degradación de proteínas con residuos de arginina metilados (**Figura 1.11**), que posteriormente son degradados enzimáticamente y eliminados vía renal. En este sentido, la elevación de ADMA podría ser debida a un aumento de su síntesis o disminución de su degradación, a una disminución de su eliminación y/o a una modificación en los niveles de metabolitos precursores.

Diferentes estudios han demostrado que la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de ADMA (proteína-arginina N-metiltransferasas (PRMTs) y dimetil-arginina dimetilaminohidrolasa (DDAH), respectivamente) es regulada por las condiciones redox. Así, la expresión génica de PRMTs en células endoteliales en cultivo se incrementa en presencia de LDLn y LDLox de forma dosis-dependiente (Böger RH y cols, 2000), y la activación génica se bloquea en presencia de pirrolidina ditiocarbamato, un antioxidante intracelular.

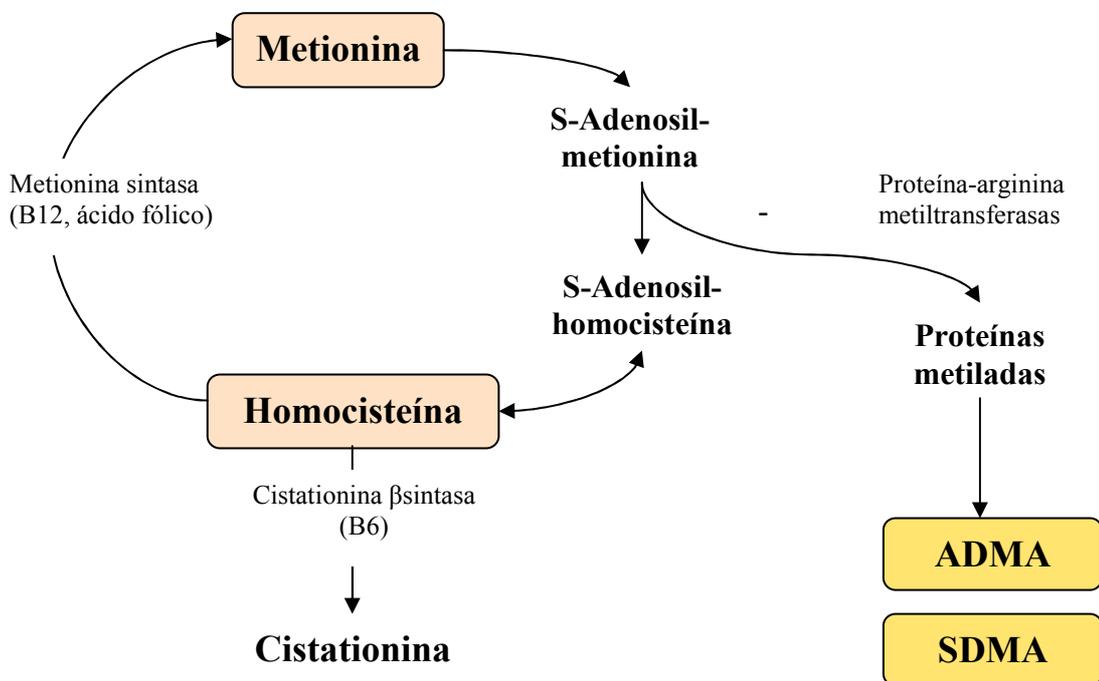


Figura 1.11. Esquema que representa las vías que unen la desmetilación de metionina para formar homocisteína y argininas metiladas. (ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica). Modificado de Böger RH y cols, 2000.

Por lo que respecta a la enzima desmetiladora de ADMA, la DDAH, ésta disminuye sensiblemente su actividad por S-nitrosilación u oxidación por radicales libres del oxígeno de la cisteína 249 de su centro activo (Leiper J y cols, 2002). En el mismo sentido, la incubación de células endoteliales con glucosa eleva los niveles de ADMA al disminuir la actividad de la DDAH, siendo el efecto revertido por la presencia de antioxidantes (Lin KY y cols, 2002). Un efecto similar se ha observado en ratones diabéticos en los que el antioxidante polietilenglicol conjugado con superóxido

dismutasa (PEG-SOD), al disminuir las concentraciones de O_2^- , revierte el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la DDAH (Böger RH y cols, 1998). Destacar que la inhibición de la DDAH provoca vasoconstricción gradual de los segmentos vasculares, efecto que se revierte con arginina (Böger RH y cols, 1998).

Respecto a la posible afectación de la eliminación de ADMA, se ha observado una elevación de este derivado de la arginina en enfermedades renales, ya que las dimetilargininas se eliminan vía renal. La producción de NO está disminuída en las enfermedades renales, por dos motivos. El primero es una disminución del sustrato precursor, arginina, por afectación de la biosíntesis renal de este aminácido, y por una inhibición del transporte de arginina hacia la célula endotelial, destinándose a otras rutas metabólicas. En segundo lugar, por las elevadas concentraciones de ADMA cuya eliminación está disminuida, al igual que su catabolismo por la enzima DDAH (Baylis C, 2006; Vallance P y cols, 1992).

Como se puede apreciar en la **Figura 1.11**, y como ya se ha comentado, los derivados metilados de la arginina (entre los que se encuentra la ADMA) se producen por liberación de residuos de arginina previamente metilados en las proteínas. La S-adenosilmetionina actúa como donadora de grupos metilo en el proceso de metilación. La incubación de células endoteliales con elevadas concentraciones de metionina u homocisteína (precursores de la S-adenosilmetionina), aumenta considerablemente la concentración de ADMA en el sobrenadante (Sydow K y Münzel T, 2003). Este efecto es comparable al observado en pacientes con hiperhomocisteinemia (Böger RH y cols, 2000a) y en animales de experimentación sometidos a dietas con un contenido elevado de homocisteína o colesterol (Böger RH y cols, 2000b), condiciones en las que se ha descrito una elevación plasmática de los niveles de ADMA. Además, la incubación con homocisteína disminuye la actividad de la DDAH, cuya consecuencia sobre la concentración de ADMA es la misma, y se revierte aplicando al cultivo el antioxidante PDTC (Pyrrolidine dithiocarbamate) que preserva la actividad de la DDAH y reduce el acúmulo de ADMA (Stühlinger MC y cols, 2001). Los mismos resultados se observan al incubar “in vitro” DDAH recombinante humana en presencia de homocisteína,

condiciones que disminuyeron la actividad de la enzima de forma dosis-dependiente (Stühlinger MC y cols, 2001).

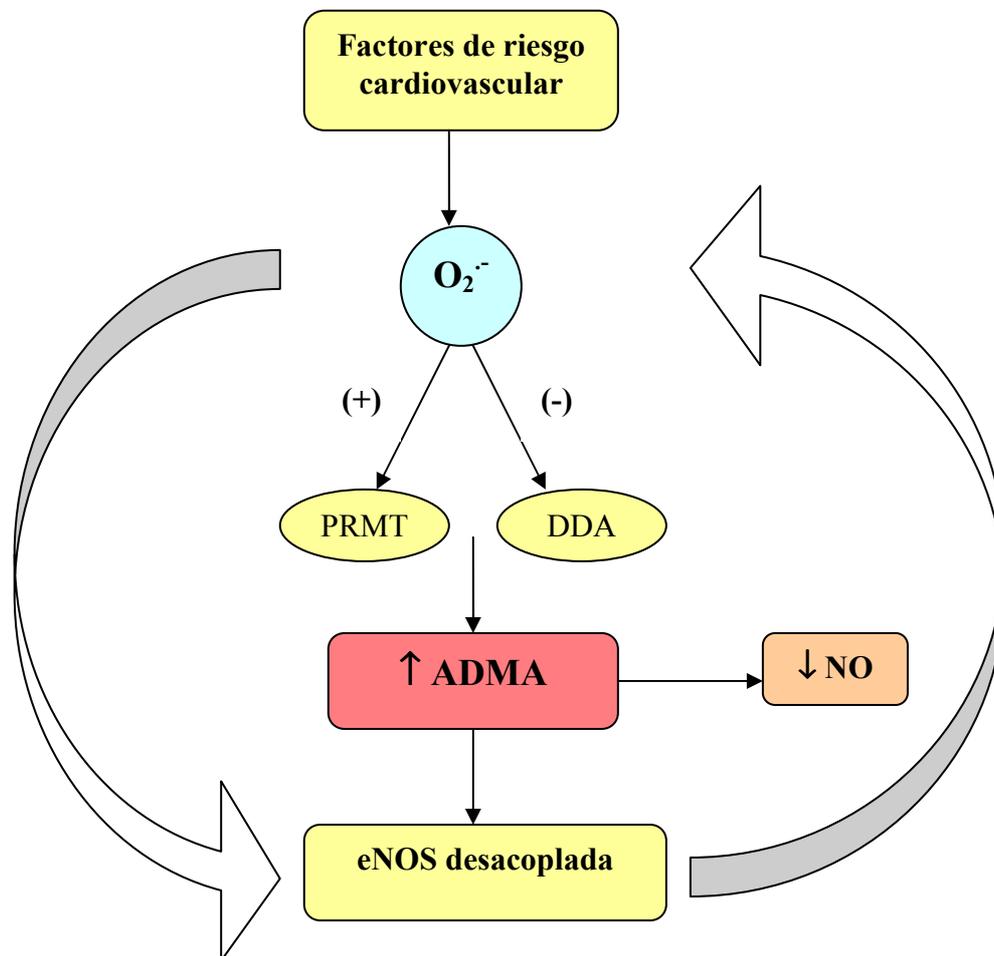


Figura 1.12. Mecanismos propuestos para explicar la elevación de ADMA. Los distintos factores de riesgo cardiovascular, como la hipercolesterolemia, incrementarían la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que activaría a la arginina metil transferasa (PRMTs; la enzima biosintética de ADMA) e inhibiría a la dimetil-arginina dimetilaminohidrolasa (DDHA; la enzima que degrada ADMA), dando como resultado final un aumento de la concentración de ADMA. La disminución de la biodisponibilidad del NO (óxido nítrico) sería debida a un aumento de su degradación inducida por superóxido, formación de peroxinitrito, oxidación de BH4 (tetrahidrobiopterina) –cofactor de la eNOS- y/o limitada biodisponibilidad de arginina intracelular. La producción de anión superóxido por parte de la eNOS retroalimentaría positivamente el proceso. Modificado de Sydow K y Münzel T, 2003.

El aumento de la concentración de ADMA en células endoteliales en cultivo o en pacientes con disfunción endotelial se asocia con aumento de la producción de radicales libres del oxígeno (Sydow K y Münzel T, 2003). Se desconoce si la elevación de ADMA es causa o consecuencia del aumento del estrés oxidativo (**Figura 1.12**). Como ya se ha comentado la actividad de las enzimas PRMTs y DDAH es sensible al

estado redox. Por lo tanto, el estrés oxidativo a nivel endotelial podría estimular la producción de ADMA y/o inhibir su degradación. A su vez, tanto el estrés oxidativo como el aumento de ADMA podrían contribuir al desacoplamiento de la eNOS, facilitando su participación en la generación de superóxido con una consiguiente retroalimentación positiva (Cooke JP, 2000). Aún debe establecerse la concentración de ADMA mínima capaz de interactuar con la eNOS “*in vivo*”.

1.7.4. Bases bioquímicas de las estrategias terapéuticas en la hipercolesterolemia

1.7.4.1. Arginina, antioxidantes e hipercolesterolemia

1.7.4.1.1. La paradoja de la arginina

La arginina es el sustrato endógeno de la NOS. Se habla de la “*paradoja de la arginina*” para referir a la observación experimental de que la producción celular de NO depende críticamente del aporte exógeno de arginina, a pesar de encontrarse la NOS teóricamente saturada con las concentraciones de arginina intracelulares. Puesto que el Km de la eNOS para la arginina es del orden de 2-3 μM , y la concentración de este sustrato en la célula endotelial es del orden de 1-2 mM, la eNOS debería estar continuamente saturada por la arginina y no modificar la producción de NO ante cambios en el nivel extracelular del aminoácido (0’1-10 mM). Contrariamente a lo esperado, dichos cambios se traducen “*in vivo*” en un incremento en la síntesis endotelial de NO dosis dependiente. Este efecto se ha demostrado en la hipercolesterolemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus, fracaso renal crónico y pacientes con enfermedad coronaria y enfermedad arterial periférica (Bode-Böger SM y cols, 1996a).

Se han propuesto diferentes hipótesis, no excluyentes, para explicar esta paradoja de la arginina (**Figura 1.13**). La primera de ellas apuesta por la inhibición endógena de la eNOS (o de su sistema transportador γ^+) por compuestos como ADMA o L-NMMA, condiciones que serían antagonizadas por el aporte de arginina (aumentaría el cociente arginina/inhibidores), con el consiguiente beneficio en la producción de NO.

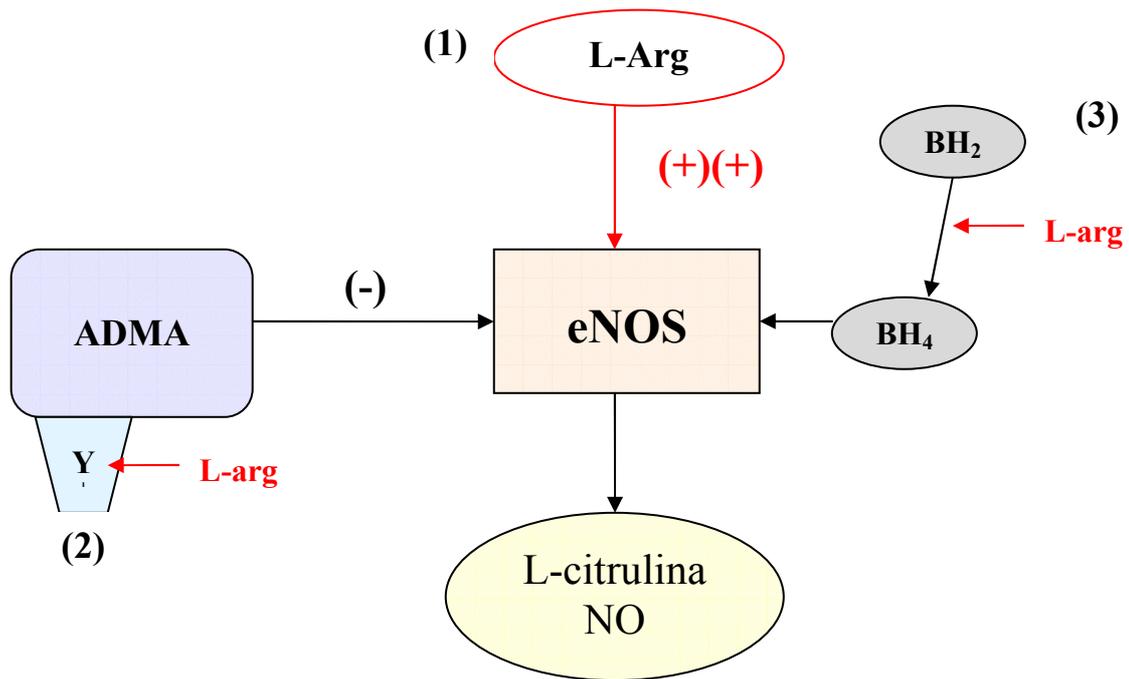


Figura 1.13. Esquema que representa los tres niveles posibles de actuación de la L-arginina exógena: (1) Vencer el efecto inhibitorio de ADMA en la producción de NO por parte de eNOS. (2) Competir con ADMA por el sistema transportador y+. (3) Actuando como antioxidante, puede eliminar superóxido o reducir BH₂ (dihidrobiopterina) a BH₄ (tetrahidrobiopterina).

Otra posibilidad considera una competencia entre la eNOS y la arginasa por la arginina como sustrato común. La arginasa cataliza la conversión de arginina en ornitina con un Km del orden de 2-20 mM y a una velocidad considerablemente superior a la de la eNOS. Por tanto, es más que probable que, bajo ciertas circunstancias, la arginasa pueda actuar como elemento de control de la biodisponibilidad de arginina para la síntesis de NO. En este sentido se ha observado que ciertos componentes de las lipoproteínas aterogénicas pueden modular de forma inversa la actividad de eNOS y arginasa e, incluso, la del propio transportador de arginina (Hayashi T y cols, 2006). Las implicaciones fisiológicas del consumo de arginina por la arginasa, en detrimento de su derivación hacia NO, se discutirán más adelante en relación a la síntesis de poliaminas (véase apartado 1.8.).

Una tercera hipótesis considera como principal efecto para explicar la paradoja de la arginina el desacoplamiento de la actividad eNOS. El desacoplamiento podría deberse a la depleción intracelular de arginina, en términos absolutos o relativos (competición con ADMA de la propia eNOS (Boger RH y cols, 2004) o de su sistema

y⁺-transportador), o por deficiencia de BH₄ (Cosentino F y cols, 1998; Stroes E y cols, 1997; Heitzer y cols, 2000). Como ya se ha comentado, diferentes estudios realizados en condiciones de hipercolesterolemia parecen confirmar el desacoplamiento de la eNOS y su reversión por arginina, si bien no han permitido establecer claramente la naturaleza bioquímica de los mediadores del desacoplamiento (Böger RH y cols, 1998a; Vergnani L y cols, 2000; Böger RH y cols, 1995; Kawano H y cols, 2002). Destacar, en este sentido, la constancia de los niveles circulantes de arginina en las diferentes patologías de riesgo cardiovascular, incluida la hipercolesterolemia (Böger RH y cols, 1995; Böger RH y cols, 1998a).

Los efectos de la arginina sobre la producción endotelial de NO podrían deberse, de acuerdo con una última hipótesis, a sus propiedades antioxidantes. Actuando como tal la arginina podría secuestrar el superóxido y/u otros radicales libres del oxígeno, interrumpir la cascada de peroxidación lipídica, o reducir BH₂ a BH₄ (Cosentino F y cols, 1998; Stroes E y cols, 1997; Heitzer y cols, 2000) con los consiguientes beneficios para la síntesis de NO y, en general, para la prevención del daño endotelial. Esta posibilidad estaría apoyada por un amplio cuerpo de evidencias experimentales a favor de los efectos antioxidantes de la arginina y algunos de sus metabolitos (poliaminas; véase más adelante el apartado 1.8.) que ha crecido considerablemente en los últimos años (Kawano H y cols, 2002; Böger RH y cols, 1995; Böger RH y cols, 1998a).

1.7.4.1.2. Beneficios clínicos y efectos bioquímicos de la arginina

Los efectos del aporte exógeno de arginina han sido ampliamente estudiados en humanos y diferentes modelos animales (genéticos o nutricionales) afectados de diferentes patologías de riesgo cardiovascular, incluida la hipercolesterolemia. El resultado común de estas investigaciones es el beneficio clínico evidente de la arginina sobre la función endotelial e, incluso, sobre la progresión de la lesión arteriosclerótica. Las diferencias estriban, principalmente, en los cambios bioquímicos asociados a la administración del aminoácido. Comentaremos seguidamente algunos de los estudios más relevantes realizados en este campo.

La administración de arginina revierte la disfunción endotelial en conejos hipercolesterolémicos. La administración oral de arginina durante un tiempo prolongado restaura la producción endotelial de NO, disminuye la adhesión de monocitos al endotelio, inhibe la agregación plaquetaria, retrasa el desarrollo de aterogénesis e incluso induce la regresión de las placas de ateroma ya formadas. En cambio, la administración prolongada de antagonistas de la NOS a animales de laboratorio, acelera la aterogénesis (Böger RH y cols, 1995).

En humanos hipercolesterolémicos, la administración oral o intravenosa de arginina mejora la vasodilatación endotelial inducida por acetilcolina (Creager MA y cols, 1992; Clarkson P y cols, 1996). También se ha observado mejora de la vasodilatación tras la inyección intravenosa de arginina en pacientes con oclusión arterial periférica (Bode-Böger SM y cols, 1996a). Los pacientes hipercolesterolémicos presentan elevación de ADMA circulante que se relaciona con la disminución de la vasodilatación de la arteria braquial mediada por óxido nítrico dependiente del endotelio y la reducción de la excreción urinaria de nitrato (Böger RH y cols, 1998). El cociente arginina/ADMA se encuentra disminuido debido a la constancia de los niveles circulantes de arginina. Los efectos de ADMA se revierten con la administración de L-arginina. Según el grupo de Böger, el beneficio de la arginina sería debido a que, probablemente, compite directamente con la ADMA por la eNOS en el mantenimiento de la síntesis de NO, ya que la infusión intravenosa de L-arginina no afecta al aclaramiento renal de ADMA (Böger RH y cols, 1998).

El trastorno de la vía de la óxido nítrico sintasa, con una elevación de ADMA, que ocurre en la hipercolesterolemia se asocia con un defecto de la angiogénesis, que se revierte con la administración oral de arginina, y puede ser simulada en animales normocolesterolémicos con la administración de antagonistas de la NOS, como la nitroarginina (Jang JJ y cols, 2000). El mecanismo por el cual el NO promueve la angiogénesis no está del todo aclarado. Podría ser debido a su actuación como factor de supervivencia endotelial, inhibiendo la apoptosis y/o estimulando la proliferación endotelial; podría igualmente estimular la migración endotelial promoviendo la podoquinesis de células endoteliales y/o, podría actuar como factor hemodinámico. Es

conocido que el aumento de flujo, inducido por prazosina, en la microcirculación esquelética se asocia con aumento de la proliferación endotelial (Jang JJ y cols, 2000). Recientemente se ha visto que la actividad de DDAH está perjudicada en la hipercolesterolemia, condición en la que se responsabiliza al LDLox de la elevación de ADMA (Ito A y cols, 1999).

En la misma línea se encuentran los estudios de Duan J y cols (2000) sobre la limitación de la angiogénesis provocada por la hipercolesterolemia en ratas. La disminución de la angiogénesis se asoció con una reducción de la producción de NO y GMPc, que se normalizó con la suplementación de arginina. La reversión de las anomalías en la angiogénesis por la arginina se comprobó mediante angiografías de los miembros isquémicos, antes y después del tratamiento con arginina (Duan J y cols, 2000).

La inyección intra-arterial de ADMA disminuye la circulación sanguínea del antebrazo y produce disfunción endotelial en voluntarios sanos (Vallance P y cols, 1992). En cobayas, la inyección de ADMA se asocia con una elevación de su concentración en plasma (hasta nueve veces) y con un aumento de la presión sanguínea (Váyanse P y cols, 1992). Incluso pequeñas dosis de ADMA administradas a voluntarios sanos (2'6 μ M) son capaces de producir importantes efectos hemodinámicas como aumento de las resistencias vasculares periféricas y de la presión sanguínea (Achan V y cols en 2003). En todos los casos, los efectos del ADMA revirtieron por la administración de arginina.

1.7.4.1.3. Beneficios clínicos y efectos bioquímicos de los antioxidantes

Los estudios con antioxidantes realizados en animales son muy prometedores en cuanto a su eficacia en la detención del proceso arteriosclerótico (Leborgne L y cols, 2003; Prasad K y Lee P, 2003). Sin embargo, dado que el LDLox no es el único factor que influye en el desarrollo de ATC, la habilidad de los distintos antioxidantes en prevenir la ATC no siempre es predecible.

Los estudios en humanos con hipercolesterolemia muestran resultados dispares sobre la eficacia de los antioxidantes en la detención o regresión del desarrollo de ATC. El α -tocoferol no ha mostrado eficacia sobre la función microvascular, ni siquiera cuando se asocia a otros antioxidantes como ácido ascórbico o β -caroteno. Sin embargo, sí produce efectos beneficiosos sobre la función endotelial cuando se administra en fases tempranas del desarrollo de la ATC. Éste es el motivo por el cual los estudios en animales suelen encontrar resultados tan prometedores, ya que suelen ser aterosclerosis inducidas experimentalmente y, por ello, se encuentra en estadios tempranos (Rosenson RS, 2004).

Estudios epidemiológicos demuestran que una dieta rica en vitaminas antioxidantes disminuye el riesgo de eventos cardiovasculares. Sin embargo, ensayos randomizados con antioxidantes dan resultados dispares, en función del estadio evolutivo en el que se encuentren las lesiones ateroscleróticas y las dosis de antioxidantes administradas, que no fueron suficientes para atravesar la pared vascular o dosis inferiores a las demostradas eficaces en estudios observacionales (Rosenson RS, 2004).

Napoli C y cols (2002) estudiaron el efecto del tratamiento crónico con ácido acetilsalicílico (aspirina) conteniendo óxido nítrico, en comparación con aspirina sola o placebo, en el desarrollo de aterosclerosis en ratones hipercolesterolémicos deficientes para el receptor LDL. Tras doce semanas de tratamiento observaron que se reducía la lesión aórtica acumulativa en el grupo tratado con NO-aspirina, comparado con el resto de grupos. Además, en dicho grupo se producía una disminución significativa del nivel de LDLox. Por tanto, la restauración del NO, deficitario en la hipercolesterolemia, con NO-aspirina, confiere propiedades antiateroscleróticas y antioxidantes a la pared arterial de ratones hipercolesterolémicos (Napoli C y cols, 2002).

El probucol, fármaco retirado del mercado usado en terapia hipolipemiente, es uno de los más potentes antioxidantes lipofílicos. En un estudio en ratas tratadas con LDL intravenoso que habían sido pretratadas con probucol, se observó una mejoría de

la relajación del endotelio y una disminución de los niveles de ADMA (Jiang JL y cols, 2002). Un efecto similar se observó en ratas pretratados con vitamina E.

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) se han propuesto como fármacos que pueden mejorar la disfunción endotelial y el pronóstico de pacientes con aterosclerosis (Ito A y cols, 2001; Ito A y cols, 2002). También producen mejoría de la disfunción endotelial los fármacos bloqueadores del receptor 1 de la angiotensina II (AT-II). El mecanismo íntimo por el que ambos grupos de fármacos mejoran la función endotelial todavía está por esclarecer pero, en ambos casos, parece claro que disminuyen la formación de superóxido mediada por NADP(H) oxidasa y, probablemente, previenen el desacoplamiento de la eNOS. Por lo tanto, tanto los IECAs como los bloqueadores del receptor de la AT-1, se consideran buenos fármacos contra el estrés oxidativo debido a sus efectos inhibitorios sobre los enzimas que producen radicales libres.

1.8. POLIAMINAS E HIPERCOLESTEROLEMIA

Numerosos estudios relacionan metabolitos biológicamente activos de la arginina con los factores de riesgo cardiovascular. Particularmente, como ya hemos comentado ampliamente, alteraciones en la síntesis y/o actuación del óxido nítrico (NO) han sido constatadas en la diabetes, HTA e hipercolesterolemia. Pero el complejo metabolismo de la arginina incluye su utilización en otras vías como la síntesis de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, metabolitos ubicuos con múltiples funciones entre las que se incluyen efectos pro-proliferativos y antioxidantes opuestos, en cierto modo, a los del NO.

Las poliaminas putrescina (1,4-butanodiamina), espermidina (N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina) y espermina (N,N'-bis[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina) son pequeños policationes solubles, químicamente estables, biológicamente activos y ampliamente distribuidos en todos los organismos vivos. Su carácter polibásico determina su gran afinidad por constituyentes ácidos y determina muchas de sus funciones biológicas. Las interacciones electrostáticas con DNA, RNA,

proteínas y constituyentes cargados negativamente en las membranas biológicas constituyen la base para la mayoría de las funciones de las poliaminas (Morgan DML y Wallace HM, 1994). Además de sus clásicas funciones en relación con el crecimiento, diferenciación y multiplicación celular, hoy se analiza el posible carácter antioxidante de las poliaminas y su papel en diferentes procesos como inflamación, trauma o cáncer. Numerosos estudios han comprobado la importancia de las poliaminas en la estabilización de ácidos nucleicos, estimulación de enzimas, regulación de procesos relacionados con el calcio, respuesta al estrés oxidativo, protección frente a radiaciones y mutaciones y mediación de los efectos de muchas hormonas y factores de crecimiento. Sin embargo, faltan por establecer claramente los mecanismos bioquímicos que median tales efectos de las poliaminas (Teixeira D y cols, 2002 y 2003).

La síntesis de poliaminas en mamíferos comienza con la conversión de arginina en ornitina por medio de la arginasa (**Figura 1.14**) (Wu G y Morris S, 1998). Muchos microorganismos y plantas superiores son capaces de sintetizar poliaminas a partir de agmatina, no así los humanos. En una segunda etapa, considerada la reguladora y clave de la biosíntesis, la ornitina es descarboxilada a putrescina por la ornitina descarboxilasa, una enzima piridoxal fosfato dependiente, de corta vida media, presente en pequeñas cantidades en células quiescentes y cuya actividad puede incrementarse en respuesta a numerosos estímulos como drogas, hormonas, factores de crecimiento y regeneración de tejidos.

La espermidina y espermina sintetas convierten sucesivamente la putrescina generada en espermidina y espermina, respectivamente, mediante transferencia de grupos aminopropilo donados por la S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM), producto de la reacción de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) (Stanley BA y Shantz LM, 1994). La actividad de las aminopropil transferasas es mucho mayor que la de las descarboxilasas y viene determinada por la disponibilidad de sus sustratos, principalmente dcSAM. Las reacciones en que participan la espermina y espermidina sintetas son irreversibles, pero interconversión de espermina en espermidina y de ésta en putrescina es posible por acción de otras dos enzimas, la espermidina/espermina N-acetiltransferasa citosólica (cSAT) y la poliamina oxidasa. La primera utiliza acetilCoA

para la conversión de espermidina y espermina en sus formas monoacetiladas, excelentes sustratos para la poliamina oxidasa, que rompe las N-acetilpoliaminas en un aldehído (3-acetamidopropanal) y putrescina o espermidina, dependiendo del sustrato. Parece ser que la acetilación es el paso limitante en esta interconversión. De este modo el metabolismo de las poliaminas es un proceso cíclico que permite la transformación de putrescina en espermidina y espermina, y viceversa, de acuerdo con los requerimientos fisiológicos.

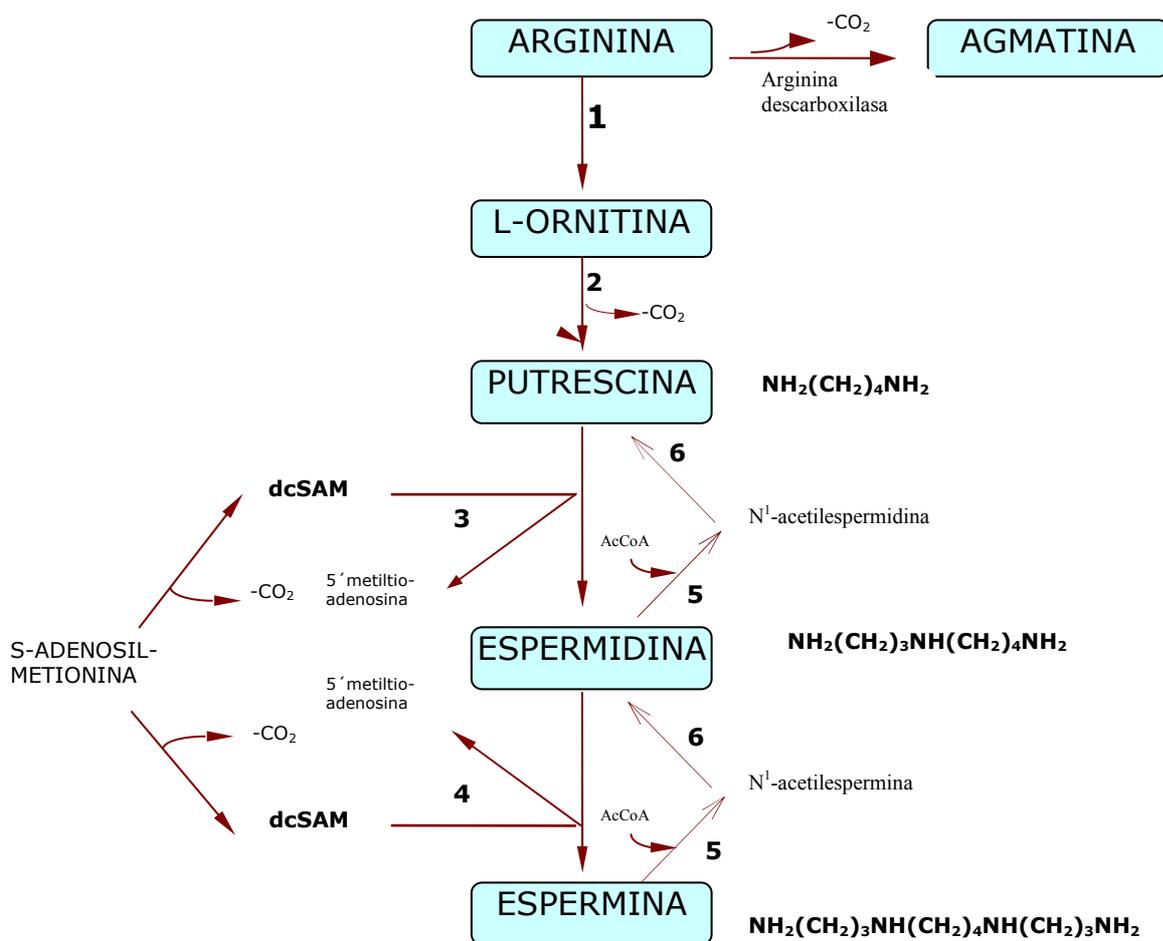


Figura 1.14. Vías de síntesis e interconversión de poliaminas: 1, arginasa; 2, ornitina descarboxilasa; 3, espermidina sintasa; 4, espermina sintasa; 5, N¹-acetil-transferasas; 6, poliamina oxidasa; dcSAM, S-adenosilmetionina descarboxilada. Modificado de Wallace HM (1998).

Los niveles de poliaminas se modifican según el estado fisiopatológico del individuo, y su concentración en células y tejidos está regulada por mecanismos intracelulares (síntesis de novo, interconversión, degradación oxidativa, excreción) y extracelulares (aporte dietario, poliaminas exógenas derivadas de bacterias), en estrecha relación con el estado de proliferación celular. En la regulación de la síntesis de poliaminas son claves las ODC, SAMDC y SAT, tres enzimas inducibles, con baja actividad, alta tasa de recambio y niveles de expresión regulados por los propios niveles de poliaminas. Los niveles de poliaminas ejercen un retrocontrol negativo sobre todos estos procesos y sobre la expresión del transportador para poliaminas. También la arginasa puede condicionar la disponibilidad de ornitina para la síntesis de poliaminas.

Todas las células de los mamíferos son capaces de captar poliaminas del espacio extracelular, mediante un proceso dependiente de energía, regulado por la concentración de poliaminas. De hecho, la captación puede suplir las deficiencias en la síntesis endógena. Aproximadamente el 95% de la espermidina y espermina circulantes es transportado por los eritrocitos, que carecen de biosíntesis propia de poliaminas. Por ello la determinación de poliaminas suele realizarse en sangre total.

Los niveles circulantes de poliaminas se elevan en diversas condiciones patológicas relacionadas, fundamentalmente, con tasas elevadas de proliferación celular (Morgan DML, Wallace HM, 1994). Tal es el caso de la aparición de diferentes tipos de tumores o la recuperación tras hepatectomía parcial, en los que se observan grandes elevaciones eritrocitarias de espermidina y del cociente espermidina/espermina, índice de hiperplasia tisular (Cipolla B y cols, 1994)

En la patología diabética se ha descrito una marcada elevación de los niveles de poliaminas, que parece relacionarse con el grado de control glucémico (Meneu V, 2000). También se han descrito (Seghieri G y cols, 1997; Seghieri G y cols, 1992) elevaciones significativas de poliaminas en subpoblaciones de diabéticos afectados de microalbuminuria, macroangiopatía o retinopatía. Estos resultados sugieren que, en esta patología, los niveles de poliaminas en sangre podrían ser indicativos de daño vascular periférico, y su elevación podría preceder a la proliferación de células lisas vasculares.

Sin embargo, en tales trabajos no se descarta que el aumento de poliaminas pueda responder indirectamente a otros factores como, por ejemplo, el estrés oxidativo que acompaña a esta patología (Pieper GM y cols, 1995; Wolf SP, 1993; Hayoz D y cols, 1998)

Un estudio posterior realizado en nuestro laboratorio incluyó la determinación de poliaminas en pacientes hipertensos, diabéticos y con ambas patologías (Santaolaria M, 2001). En el se observaron elevaciones mucho más discretas de los niveles de poliaminas que, además, se restringían al grupo de pacientes que compartían diabetes mellitus e HTA. Por lo tanto, parece ser la coexistencia de estos dos factores de riesgo vascular la que conduce a elevaciones más importantes de los niveles de poliaminas.

La hipercolesterolemia es otro factor de riesgo cardiovascular que comparte con los dos anteriormente comentados, diabetes mellitus e HTA, un daño a la célula endotelial con la consiguiente patología vascular y desarrollo de arteriosclerosis (Velasco JA, 2000). De hecho, en las tres patologías se han descrito (aunque con resultados dispares) alteraciones en el metabolismo de la arginina (Sydow K y Münzel T, 2003; Eid HM y cols, 2003) y aumento del daño oxidativo. Sin embargo, no tenemos constancia de que en la hipercolesterolemia se hayan analizado los niveles circulantes de poliaminas, a pesar de que se han descrito para ellas efectos antiagregantes en modelos animales de esta patología (Peña (de la) NC y cols, 2000).

1.9. ESTATINAS

1.9.1. Generalidades

Las estatinas son la familia de fármacos más importante empleada como tratamiento hipolipemiente. Estatinas es el término utilizado para designar a los fármacos inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa); esta enzima está implicada en la síntesis de colesterol y cataliza el paso de HMG-CoA a mevalonato (**Figura 1.15**). Compiten con el sustrato por el sitio activo de la enzima, alterando su conformación, lo que las hace muy efectivas y específicas. Su

afinidad por la enzima es muy alta, del orden de nM, comparado con una menor afinidad, de orden μM , para el sustrato (Corsini A y cols, 1999).

Entre las estatinas comercialmente disponibles, las más utilizadas son rosuvastatina, atorvastatina, simvastatina, cerivastatina, lovastatina, pravastatina y fluvastatina, ordenadas por su efecto en la reducción del nivel de colesterol total y LDL sanguíneo (Edwards JE y Moore RA, 2003). Casi todas son hidrofóbicas, a excepción de pravastatina que es extremadamente hidrofílica, y fluvastatina que tiene características intermedias (Stancu C y Sima A, 2001). Su metabolismo es hepático, principalmente vía citocromo P450 (CYP 3A4) o CYP 2C9 (Blum CB, 1994).

Las estatinas tienen múltiples efectos al margen del hipolipemiante que determina su uso en la práctica clínica; todos estos efectos se denominan en conjunto efectos pleiotrópicos. Se comentará en primer lugar el efecto hipolipemiante de las estatinas; sus efectos sobre el endotelio vascular serán comentados en otro apartado, debido al su especial interés respecto al tema que nos ocupa. El resto de efectos pleiotrópicos de las estatinas se comentarán, asimismo, de forma aislada en un apartado posterior.

1.9.2. Efecto hipolipemiante

Como podemos apreciar en la **Figura 1.1**, la HMG-CoA cataliza el paso de HMG-CoA a mevalonato y, tras diversas fosforilaciones, se abre en dos cascadas de reacciones que terminan sintetizando colesterol o ubiquinona. Las estatinas inhiben la síntesis de colesterol en sus etapas iniciales, lo que les confiere algunos de sus efectos pleiotrópicos, dado que no sólo inhiben la síntesis de colesterol sino también de ubiquinona, mevalonato e isoprenoides.

La disminución del colesterol intracelular provocada por las estatinas activa una proteasa que libera la proteína fijadora del elemento regulador de esteroides (SREBPs),

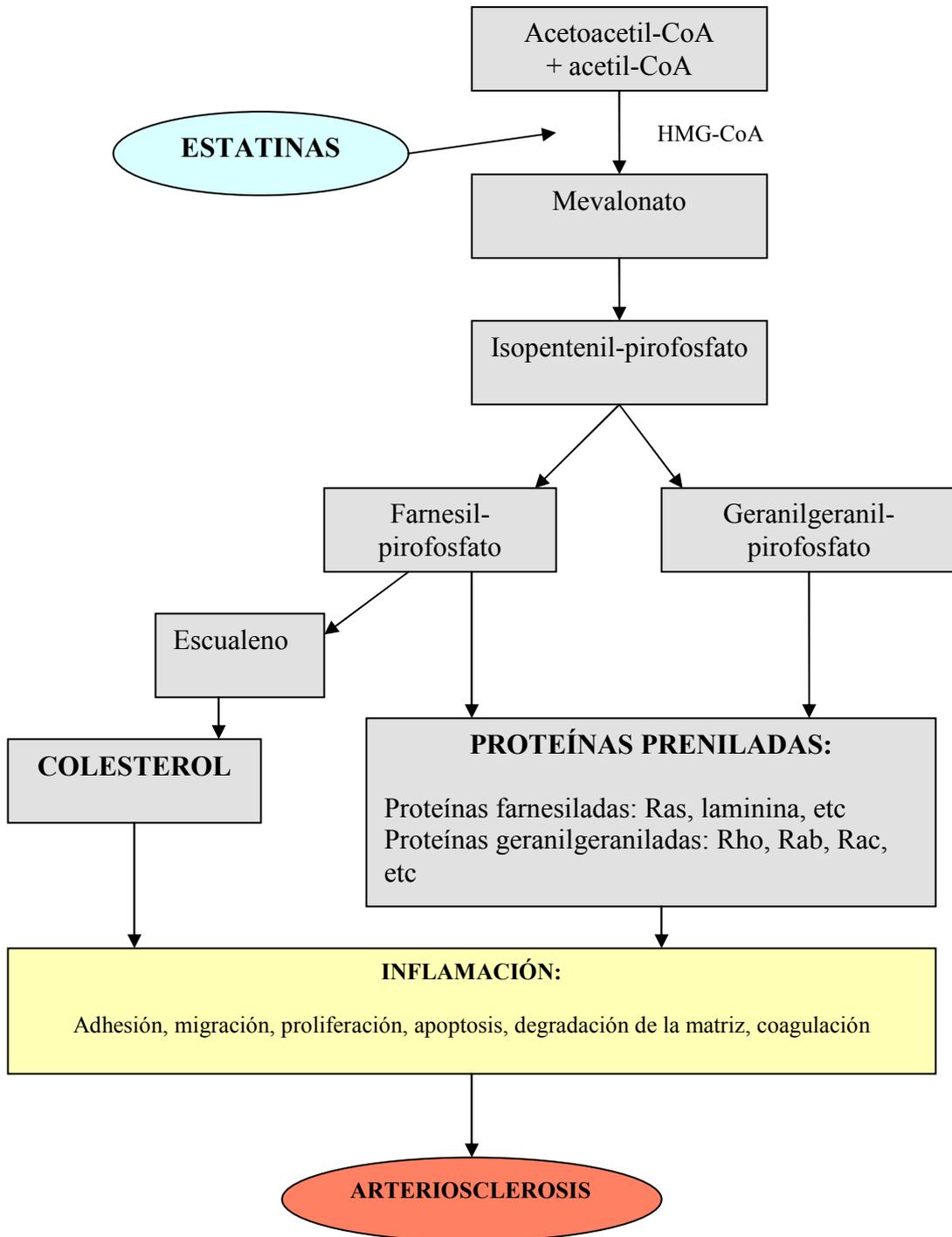


Figura 1.15. Implicaciones de la vía del mevalonato, mediada por el enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, en el desarrollo de arteriosclerosis. Modificado de Schönbeck U y Lobby P, 2004.

permitiéndole su translocación hasta el núcleo donde estimula la expresión del gen para el receptor de LDL. Es decir, que la disminución de colesterol en el hepatocito produce un incremento en el número de receptores del LDL, lo cual determina una reducción del LDL circulante y sus precursores IDL y VLDL (Sehayek E y cols, 1994). Por lo tanto, el efecto hipolipemiante de las estatinas es debido a un doble mecanismo: inhibición de la síntesis de colesterol y aumento del número de receptores para LDL.

Las estatinas inhiben, además, la síntesis hepática de apolipoproteína B-100, y determinan una disminución en la síntesis y secreción de lipoproteínas ricas en triglicéridos y un aumento de receptores para apoproteínas B/E (Gaw A y cols, 1993). En relación a las HDL, las estatinas elevan discretamente su concentración (Kostner GM y cols, 1989).

Existe en la actualidad una amplia evidencia de la eficacia clínica del tratamiento hipolipemiante con estatinas. Así lo constatan una gran cantidad de estudios clínico-epidemiológicos que han demostrado una reducción de la mortalidad total, de la mortalidad por cardiopatía isquémica y de la mortalidad por eventos cerebrovasculares. Dicha reducción de la mortalidad es tanto mayor cuanto mayor es la cifra de LDL inicial y la posterior reducción de ésta, tanto en prevención primaria como secundaria; es decir, previene tanto el primer episodio como eventos posteriores. Los efectos son más evidentes en poblaciones de mayor riesgo y en aquellas con signos evidentes de cardiopatía isquémica o enfermedad aterosclerótica.

Entre los principales estudios epidemiológicos llevados a cabo con estatinas como prevención primaria se encuentran el 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study, 1995), el WOSCOP (West of Scotland Coronary Prevention Study, 1995), y el AFCAPS/TEXCAPS (Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study, 1998). Respecto a los de prevención secundaria destacar el CARE (Cholesterol And Recurrent Events, 1996) y el LIPID (Long Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease, 1998).

1.9.3. Efectos de las estatinas sobre la célula endotelial.

Numerosas evidencias experimentales indican que las estatinas producen una mejora significativa de la función endotelial que precede, incluso, a la reducción de los niveles séricos de colesterol (Omori H y cols, 2002). La restauración de la función endotelial por estatinas deriva, por un lado, de su efecto hipolipemiante y, por otro, de su efecto directo sobre la célula endotelial (Wolfrum S y cols, 2003a). En relación a éste último, las estatinas estimulan la expresión de eNOS y bloquean la síntesis de especies reactivas de oxígeno, los dos defectos primarios implicados en la disfunción endotelial. Mecanismos adicionales relacionados o no con su efecto hipolipemiante contribuirían a restablecer la producción endotelial de NO (Mason RP y cols, 2004).

La **Tabla 1.X** resume los efectos de las estatinas sobre la célula endotelial, sus mediadores bioquímicos y los beneficios bioquímico/fisiológicos derivados de tales efectos. Como puede observarse, la totalidad de los efectos descritos implican la mediación de las proteínas Rho, Akt o Rac-1. Rho y Rac son pequeñas proteínas G cuya actividad está regulada post-traduccionalmente por prenilación, proceso en el que el farnesilpirofosfato (FPP) y geranylgeranylpirofosfato (GGPP), dos intermediarios isoprenoides de la síntesis de colesterol, participan como dadores de los grupos lipídicos. Las estatinas, al reducir la prenilación de Rho y Rac, disminuirían su actividad al impedir su translocación y anclaje a los compartimentos membranosos (caveolas) en los que desarrollan su actividad reguladora de múltiples vías, entre las que se encuentra la de expresión de eNOS. Mediante este mecanismo, la inhibición de Rho por estatinas lleva a un aumento de la expresión de eNOS al prolongar la vida media de su mRNA, no porque aumenten la expresión del gen de la eNOS (Wolfrum S y cols, 2003a).

Las estatinas también activan la protein quinasa Akt al promover su fosforilación por la PI3 quinasa. Akt es una proteína reguladora importante del metabolismo celular y de la apoptosis ya que afecta, entre otras dianas, a la eNOS. La fosforilación de eNOS aumentaría su actividad incrementándose la producción de NO en células endoteliales (Kureishi Y y cols, 2000; Wolfrum S y cols, 2003a).

EFEECTO	MEDIADOR	BENEFICIO
↓ actividad de NADPH oxidasa	Rac-1	↓ estrés oxidativo
↓ síntesis de endotelina-1	Rho	Mejoría función endotelial
↓ expresión del receptor de AT1	Rho	Mejoría función endotelial
↓ expresión activador tisular del plasminógeno	Rho	↓ trombosis
↑ expresión del inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno	Rho	↓ trombosis
↓ expresión de moléculas de adhesión	Leukocyte function antigen-1, Rho	↓ inflamación
↑ actividad de eNOS	Rho, Akt	↑ función endotelial
↑ número y diferenciación de células endoteliales circulantes	Akt	↑ neovascularización y re-endotelización
Inhibición de la apoptosis	Akt	↑ supervivencia celular

Tabla 1.X. Efectos de las estatinas sobre el endotelio. Flechas indican aumento (↑) o disminución (↓). (AT1: angiotensina 1; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial). Modificado de Wolfrum S y cols, 2003a.

Dado que tanto Rho como Akt modulan la actividad/expresión de múltiples proteínas, el efecto de las estatinas no se restringe la activación de la eNOS (Laufs U y cols, 1998; Kalinowski L y cols, 2002; Tokoro T y cols, 2003; Wolfrum y cols, 2003a). La endotelina-1, agente vasoconstrictor y mitogénico cuyos niveles se incrementan en condiciones proaterogénicas, inhibe su expresión al igual que su receptor y el de angiotensina-1 (Wolfrum S y cols, 2003a; Ichiki T y cols, 2001). Así, conjuntamente, las estatinas mejoran la respuesta vasomotora del endotelio a ciertos agonistas, aumentan el flujo sanguíneo coronario (Wolfrum S y cols, 2003b), inhiben la proliferación y migración de células del músculo liso (Xu CB y cols, 2002), y disminuyen la adherencia de leucocitos (Rezaie-Majd A y cols, 2002), contrarrestando los efectos del colesterol en la progresión de la ATC (Wolfrum S y cols, 2003b).

Otro mecanismo por el cual las estatinas pueden mejorar la función endotelial es por sus efectos antioxidantes. Simionescu M y cols (2002) han descrito que la administración de simvastatina a hamsters hipercolesterolémicos restaura el potencial antioxidante del suero. Los efectos antioxidantes de las estatinas pueden obtenerse por múltiples vías. Al inhibir la actividad de la NADP(H) oxidasa mediada por Rac-1 y

disminuir la expresión del receptor de angiotensina-1, reducen la síntesis de radicales libres mediada por angiotensina II en células de músculo liso (Wassmann S y cols, 2001).

Parte del efecto antioxidante de las estatinas podría deberse a la restauración del acoplamiento de la eNOS, fuente importante de superóxido en las condiciones desacoplantes de la hipercolesterolemia, como hemos señalado previamente (Wolfrum S y cols, 2003a). En este sentido, el enriquecimiento de la membrana celular en colesterol se asocia con alteraciones en su organización en microdominios y en el funcionamiento de varias proteínas de membrana, como canales de calcio voltaje-dependientes, bombas iónicas y transporte activo de arginina (Mason RP y cols, 2004; Feron O y cols, 2001). Las estatinas, además de restaurar el transporte de arginina, también podrían potenciar la síntesis de tetrahidropterina (Rosenson RS, 2004).

También se ha propuesto que ciertos metabolitos de las estatinas (sobre todo atorvastatina y fluvastatina) podrían contribuir a su poder antioxidante vía captación directa de radicales libres. Resaltar que, la mayoría de estudios que demuestran las propiedades antioxidantes directas de las estatinas, utilizan dosis suprafarmacológicas de las mismas. Una excepción son los estudios de Mason RP y cols (2004) que utiliza un derivado o-hidroxilado de la atorvastatina a niveles farmacológicos (nM). Este metabolito activo de la atorvastatina, es capaz de captar radicales libres por mecanismos de protodonación después de su partición en el ambiente lipídico, siendo su capacidad de absorción de radicales diez veces superior a la del Trolox, un análogo soluble de la vitamina E con potentes propiedades antioxidantes (Mason RP y cols, 2004). Resaltar que este mecanismo se ha descrito en el caso particular de la atorvastatina, por lo que desconocemos su aplicabilidad al resto de estatinas, que tienen distinta estructura química.

Ya hemos comentado ampliamente la relevancia del LDLox en el inicio y progresión de las lesiones arterioscleróticas. Las estatinas, además de reducir la generación de radicales por los mecanismos ya indicados, contribuyen también de forma efectiva a disminuir los niveles de LDLox. Ello se debe, en primer lugar, al

propio efecto hipocolesterolémico de las estatinas, que disminuye el LDL susceptible de oxidación (Hoffman R y cols, 1992). Además, por distintos mecanismos, las estatinas reducen la susceptibilidad del LDL a los radicales libres. Así, algunas estatinas, como fluvastatina y lovastatina, se unen a los fosfolípidos de superficie de las LDL, evitando así la difusión de radicales libres al interior de la lipoproteína (Aviram M y cols, 1998). En el mismo sentido, se ha descrito que las estatinas contribuyen a preservar la actividad de la superóxido dismutasa (Chen L y cols, 1997). Otros efectos de las estatinas como la inhibición de la sobreexpresión de LOX-1, o la activación de paraoxonasa, contribuyen a disminuir la captación de LDLox por los monocitos para convertirse en macrófagos (Pietsch A y cols, 1996; Hrboticky N y cols, 1999; Rosenson RS, 2004).

1.9.4. Efectos pleiotrópicos de las estatinas

Numerosos otros efectos bioquímicos y fisiológicos descritos para las estatinas contribuyen globalmente, junto con los propiamente endoteliales ya referidos, a explicar sus más que evidentes beneficios clínicos en la evolución de lesiones arterioscleróticas en la hipercolesterolemia. El análisis pormenorizado de los efectos pleiotrópicos de las estatinas escapa al contenido de esta Tesis. Por ello, delinearemos sólo las características generales de estos efectos y su repercusión sobre el beneficio endotelial (**Tabla 1.XI**). Destacar que, la mayoría de estos efectos de las estatinas, se han relacionado con las repercusiones de la inhibición de la vía del mevalonato sobre la prenilación de proteínas (Wolfrum S y cols, 2003a; Kalinowski L y cols, 2002).

1.9.4.1. Efectos sobre la respuesta inflamatoria

La inflamación y la inmunidad contribuyen decisivamente al desarrollo de la arteriosclerosis. Las estatinas disminuyen (directa o indirectamente) de forma importante el nivel de marcadores inflamatorios (Schönbeck U y Libby P, 2004). Un subanálisis del ensayo clínico CARE demostró que pravastatina disminuye los niveles séricos de PCR (proteína C reactiva), un importante marcador de actividad inflamatoria, de forma independiente a los niveles de colesterol (Ridker PM y cols, 1999).

Igualmente claves en el desarrollo de la lesión arteriosclerótica son la adhesión y diapédesis transendotelial de linfocitos T y monocitos (Ross R, 1999). Además, las citoquinas segregadas por macrófagos y linfocitos pueden modificar la función endotelial, la proliferación de células del músculo liso, la degradación de colágeno y la trombosis (Bellosta S y cols, 2000). Las estatinas reducen la expresión y función de moléculas sobre la superficie de los leucocitos inhibiendo su reclutamiento (Kimura M y cols, 1997; Bellosta S y cols, 2000), el número de macrófagos intimaes, la activación del factor nuclear NFkB (Bustos C y cols, 1998) y el crecimiento de los macrófagos estimulado por LDLox (Sakai M y cols, 1997).

PROCESO/VIA	MEDIADOR	TIPO CELULAR
Adhesión ↓	↓ Mac-1, LFA-1, ICAM-1, VCAM-1, selectina-E, selectina-L	Macrófagos y Linf T al endotelio; sangre periférica
Migración ↓	↓ MCP-1, IL-8	Cél.endotelial, cels músculo liso, macrófagos, linf T
Proliferación ↓	↓ cels musc liso, cel endotelial	Cél.endotelial, cels músculo liso, macrófagos
Función endotelial ↑	↑ eNOS ↓ oxidación LDL, endotelina-1	Célula endotelial
Degradación de la matriz ↓	↓ colagenasas intersticiales MMP-1/-13, gelatinasas MMP-2/-9, estromalisina MMP-3 ↑ TIMP-1	Cél.endotelial, macrófagos
Apoptosis ↑	↑ caspasa-3 y 9 ↓ Bcl-2 y prenilación de p21RhoB	Cél.endotelial, cels músculo liso, macrófagos
Trombosis ↓	↓ factor tisular, factor VIIa, t-PA, agregación plaquetaria, Tx A2 y B2 ↑ fibrinógeno, PAI-1, PG12	Cél.endotelial, macrófagos, plaquetas, sangre periférica
Mediadores inflamatorios ↓	↓ CD40/CD40L, sCD40L, IL-1β, IL-6, TNF-α, PCR, ciclooxigenasa 2, amiloide sérico A, Th1 (IFN-γ, IL-12), MHC-II ↑ Th2 (IL-4, IL-10, TGF- β), PPAR-g	Cél.endotelial, macrófagos, sangre periférica

Tabla 1.XI. Vías de la inflamación y mediadores inflamatorios afectados por los inhibidores de la HMG-CoA reductasa. Las flechas indican aumentado (↑) o disminuido (↓). (LFA-1: antígeno de función leucocitaria 1; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular tipo 1; VCAM-1: molécula de adhesión vascular tipo 1; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1; IL-8: interleuquina-8; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; MMP: metaloproteinasas de la matriz; TIMP: inhibidores tisulares de metaloproteinasas; tPA: activador tisular del plasminógeno; TxA2: tromboxano A2; sCD40L: CD40L soluble; TNF-α: factor de necrosis tumoral-α; PCR: proteína C reactiva; PPARs: receptores activados por proliferadores de peroxisomas; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; PG12: prostaciclina; Th1 y Th2: linfocitos T helper tipo 1 y 2; TGF- β: factor de crecimiento transformador tipo β). Modificado de Schönbeck U y Libby P, 2004.

1.9.4.2. Efectos sobre la inmunidad

Se ha descrito que, en células endoteliales y monocitos/macrófagos humanos estimulados con INF- γ (un potente mediador de la inflamación), las estatinas inhiben de forma selectiva la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) y la proliferación de linfocitos T (Mach F, 2004). El HMC-II está directamente implicado en el control de la respuesta inmunitaria y con el rechazo de órganos tras transplantes. En la misma línea, Mulhaupt F y cols (2003) han descrito que el tratamiento de células ateromatosas en cultivo con estatinas reduce la expresión de CD40, implicado en diversas vías inmunológicas; este efecto se ha descrito también en lesiones arterioscleróticas *in vivo* en pacientes tratados con estatinas. Los hallazgos con CD40 y HMC-II evidencian la modulación del sistema inmunitario por estatinas y apoyan su potencial utilidad en la terapia inmunosupresora en transplantes de órganos (Wenke K y cols, 1997).

1.9.4.3. Efectos sobre la célula del músculo liso arterial

Dos mecanismos protegen a los órganos de la acumulación celular: la inhibición de la proliferación celular y la estimulación de la apoptosis. Las estatinas inhiben la proliferación y migración de células del músculo liso arterial tanto *in vitro* como en modelos animales de aterosclerosis, independientemente del nivel de colesterol (Massy ZA y Guijarro C, 2001). Al mismo tiempo, las estatinas promueven la apoptosis de células del músculo liso vascular en lesiones re-estenóticas o proliferativas donde las células del músculo liso son dominantes (Guijarro C y cols, 1998). Además las estatinas podrían sensibilizar a las células del músculo liso vascular a citoquinas o a apoptosis inducida por Fas (Knapp AC y cols, 2000).

1.9.4.4. Efecto sobre la estabilidad de la placa de ateroma

Los eventos coronarios son el resultado de la ruptura de placas ateroscleróticas inestables con la formación de un trombo. La inestabilidad de la placa se manifiesta como una ulceración en la capa fibrosa, la ruptura de la placa y una hemorragia interna. La inestabilidad es característica de placas con abundantes depósitos lipídicos y macrófagos en la capa fibrosa. Los estudios angiográficos han demostrado que las estatinas reducen la progresión de lesiones ateroscleróticas coronarias, inducen a su

regresión y disminuyen la formación de nuevas lesiones (Ballantyne CM y cols 1997), efectos que se han atribuido a un aumento de la estabilidad de la placa como consecuencia de cambios en su composición (Vaughan CJ y cols, 2000).

Se ha demostrado que ciertas estatinas pueden inhibir tanto la actividad de metaloproteasas como su secreción por macrófagos en cultivo (Bellosta S y cols, 1998). Otros estudios han referido que el tratamiento con simvastatina eleva el potencial antioxidante del suero en pacientes con angina estable o inestable. La incubación de macrófagos U937 y células del músculo liso con suero de pacientes tratados con simvastatina reduce la acumulación de colesterol esterificado proporcionalmente al tiempo de tratamiento con simvastatina (Stancu C y cols, 2001).

1.9.4.5. Efectos sobre la activación plaquetaria

La hipercolesterolemia se asocia a hipercoagulabilidad y aumento de la activación plaquetaria (Vaughan CJ y cols, 2000). Niveles elevados de LDL aumentan la reactividad plaquetaria promoviendo la síntesis de tromboxano A₂ e inhibiendo el intercambio plaquetario Na⁺/H⁺ (Nofer JR y cols, 1997). Además la síntesis de trombina mediada por las plaquetas está incrementada en sujetos con hipercolesterolemia. Las estatinas reducen la agregación plaquetaria inducida por ADP, colágeno o fibrinógeno, y disminuyen la producción de tromboxano, en paralelo a la reducción de LDL.

1.9.4.6. Efectos sobre la coagulación

Estudios en prevención primaria y secundaria demuestran que las estatinas disminuyen significativamente la formación de trombos. Las estatinas disminuyen la actividad de tPA (activador tisular del plasminógeno) y PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno 1) incrementando la fibrinólisis (Colli S y cols, 1997). El factor tisular juega un papel importante en la iniciación de la vía extrínseca de la coagulación y fue localizado en macrófagos de la placa de ateroma cargados de lípidos (Essig M y cols, 1998).

1.9.4.7. Efectos sobre las vías de señalización intercelular e intracelular

Numerosas moléculas de señalización son proteínas preniladas. Una disminución de la prenilación de moléculas señalizadoras como Rac, Ras y RhoA de la familia de las GTPasas lleva a la modulación de varias vías señalizadoras en las células endoteliales que regularán la actividad, entre otras dianas, de la eNOS. Para ejercer su papel en la vía de transducción de señales, las proteínas Ras y RhoA deben translocarse desde el citoplasma hasta la membrana de la célula. Ésta translocación requiere farnesilpirofosfato para Ras y geranylgeranylpirofosfato para Rac y RhoA (Kalinowski L y cols, 2002).

OBJETIVOS

1.10. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La contribución del estrés oxidativo y de las alteraciones del metabolismo de la arginina a la disfunción endotelial que acompaña a la hipercolesterolemia resulta evidente, a juzgar por los datos revisados en esta Introducción. Sin embargo, el análisis individualizado de los trabajos en los que se evalúa el daño oxidativo y el metabolismo de la arginina en la hipercolesterolemia revela una gran discrepancia de resultados. Todo ello junto con la falta de datos acerca de ciertos parámetros (como las poliaminas sanguíneas) en la hipercolesterolemia nos ha hecho plantear un estudio longitudinal en el que hemos evaluado a lo largo de un año diferentes parámetros de daño oxidativo y del metabolismo de la arginina en tres muestras poblacionales seleccionadas: control, hipercolesterolémico e hipercolesterolémico tratado con estatinas.

Los **objetivos** concretos de nuestro trabajo han sido:

1. Analizar las diferencias en daño oxidativo a lípidos y proteínas entre los tres grupos poblacionales mediante la determinación de hidroperóxidos lipídicos, malondialdehído y grupos carbonilo y sulfhidrilo proteicos.

2. Establecer en los tres grupos poblacionales las diferencias en el metabolismo de la arginina analizando la síntesis de óxido nítrico (determinación de nitrato en plasma y orina), los niveles sanguíneos de poliaminas, así como los niveles de arginina y sus derivados metilados (ADMA, SDMA y NMMA).

3. Evaluar los posibles efectos del tratamiento con estatinas, fármacos inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa, con efecto hipolipemiante, sobre los marcadores de daño oxidativo y metabolismo de la arginina.

MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos planteado un estudio transversal de 2 determinaciones en 6 meses sobre pacientes hipercolesterolémicos sin tratamiento, hipercolesterolémicos tratados con estatinas y no hipercolesterolémicos, procedentes de los Centros de Salud de Onda y Vila-real (Castellón).

2.1. Selección de los pacientes: se realizó durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2003, de entre los pacientes que fueron atendidos en los Centros de Salud de Onda y Vila-real. Los criterios para su inclusión en el estudio fueron:

- a) Para el grupo hipercolesterolémico, estar diagnosticado de hipercolesterolemia, definiendo ésta según los criterios del PPAPs (Programa de Prevención en Atención Primaria de salud) como dos cifras con colesterol total >200 mg/dL. (Pertenecen por tanto a los fenotipos II y III de la clásica clasificación fenotípica de Fredikson, modificada por la OMS en 1970)
- b) Para el grupo tratado con estatinas, comprobarse la correcta cumplimentación del mismo.
- c) Edad comprendida entre 40 y 70 años
- d) No padecer diabetes mellitus ni alteración de la tolerancia a la glucosa en ayunas.
- e) No llevar tratamiento con nitratos o derivados, y
- f) Aceptación de participar en el estudio

2.2. Captación de los pacientes: se realizó de forma consecutiva, a medida que acudían a la consulta por cualquier causa. En la misma consulta se proponía su participación en el estudio y se solicitaba verbalmente la autorización.

2.3. Tamaño de la muestra: constituida por 90 pacientes. De éstos, inicialmente, 30 formaban parte del grupo control, 30 del grupo hipercolesterolémico y 30 del grupo con estatinas. Pertenecían al cincuenta por ciento a los centros de salud de Vila-real y Onda.

El tamaño de la muestra fue calculado para poder detectar una diferencia entre los grupos del 15% por cada parámetro analizado, con un grado de error alfa del 5% y una potencia o capacidad para detectar esa diferencia del 80%, considerando una desviación estándar máxima del 20% del valor de las variables (Argimon JM y Jiménez J, 1991).

2.4. Seguimiento: los pacientes seleccionados para el estudio continuaron con el tratamiento habitual prescrito para su/s patología/s crónica/s diagnosticada/s previamente, sin cambios en el mismo durante todo el seguimiento. Cada sujeto fue controlado analíticamente en dos ocasiones (sangre y orina) separadas por seis meses. Además, se les sometía a una breve revisión física y se les pasaba una encuesta donde se recogían datos de interés para nuestro estudio:

- Datos antropométricos: edad, sexo, peso, talla, y medidas de cintura y cadera.
- Hábitos tóxicos: tabaquismo, consumo de cerveza y/o vino.
- Registro de medicamentos habituales prescritos.
- Tipo de agua consumida habitualmente (embotellada o corriente).
- Complicaciones crónicas relacionadas con la hipercolesterolemia.

2.5. Obtención de muestras biológicas y procesamiento: las muestras de sangre venosa periférica de los distintos sujetos se obtuvieron, tras un periodo mínimo de ayuno de 10 horas, en la sala de extracciones de los Centros de Salud de Onda y Vila-real, entre las 8:00 y las 9:00 h. Se extrajeron de una vena del antebrazo, mediante el sistema vacutainer, cuatro tubos de sangre de 4 mL. De éstos, un tubo se remitió al laboratorio de referencia (Hospital de La Plana, Castellón) para las determinaciones de glucemia basal, urea, creatinina, colesterol total, HDL y LDL colesterol, triglicéridos, y proteína C reactiva (PCR). Los otros tres tubos (heparinizados) fueron utilizados para las determinaciones en nuestro laboratorio, tras su procesamiento inicial, tal y como se indica a continuación.

De un tubo se extrajo 1 mL de sangre que se mezcló en un tubo eppendorf con 20 µL de 1,6-diaminohexano 1 mM (patrón interno de recuperación) y 50 µL de ácido

perclórico 8 M. La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex y, tras 15 min a 0-4°C para precipitar las proteínas, se centrifugó a 15000 g 10 min. El sobrenadante ácido así obtenido se transfirió a otro tubo eppendorf que se mantuvo a -80°C hasta la determinación de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina).

La sangre restante de dicho tubo, junto con la de los otros dos, se centrifugó inmediatamente (600 g, 10 min a T.A.) para la obtención de plasma. Éste se distribuyó en 6 tubos eppendorf que se mantuvieron congelados a -80°C hasta su utilización para la determinación de nitrato, arginina y metilargininas, hidroperóxidos lipídicos, malondialdehído y grupos sulfhidrilo y carbonilo.

Cada paciente aportó, además, en el momento de la analítica, un frasco con orina de la primera hora de la mañana. Se procedió inmediatamente a extraer 2 mL de la muestra de orina que se centrifugaron a 600 g 10 min. El sobrenadante obtenido se distribuyó en dos tubos eppendorf que se mantuvieron congelados (-80°C) hasta la determinación de malondialdehído, nitrato y creatinina en nuestro laboratorio. La orina restante se remitió al laboratorio de referencia para la determinación de microalbuminuria, densidad, pH, glucosuria, leucocituria y sedimento.

2.6. Material:

Los diferentes reactivos utilizados en las determinaciones analíticas, así como su procedencia, serán reseñados en el apartado correspondiente de cada uno de los procedimientos.

2.6.1. Aparatos

- **Cromatógrafo líquido de alta resolución Waters compuesto por:**
 - ◆ Sistema de bombeo de solventes modelo 600
 - ◆ Inyector manual modelo U6K
 - ◆ Detector de fluorescencia modelo 2475
 - ◆ Registrador-integrador modelo 746

- **Cromatógrafo líquido de alta resolución Shimadzu compuesto por:**
 - ◆ Bomba de gradiente LC-10AD
 - ◆ Inyector automático SIL-10AD
 - ◆ Detector de absorción UV/Vis SPD-10AV
 - ◆ Módulo de comunicación CBM-10A
 - ◆ Módulo computerizado de control CLASS-LC10 software v1.60.

- **Espectrofotómetros:**
 - ◆ Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech)
 - ◆ LKB Ultra Plus 4054 (Pharmacia Biotech)
 - ◆ Shimadzu UV-160 (Shimadzu GMBH)

- **Centrífugas:**
 - ◆ Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Megafuge 10 R
 - ◆ Centrífuga de mesa Eppendorf Hettich, modelo EBA12/12R
 - ◆ Centrífuga de mesa ALC, modelo 4206

- **Balanzas:**
 - ◆ Balanza electrónica Mettler, modelo PJ 360
 - ◆ Balanza electrónica Sartorius, modelo BP 610
 - ◆ Balanza de precisión Pacisa, modelo Precisa

- **Otros aparatos:**
 - ◆ Sistema de concentración bajo vacío y centrifugación Speed Vac Savant, modelo SC210A
 - ◆ Sistemas Millipore de filtración bajo vacío, equipados con filtros para solventes (FH, 0,5 μm) y soluciones acuosas (HA, 0,45 μm)
 - ◆ Sistema de tratamiento de agua Milli-RO/Milli-Q de Millipore para la obtención de agua de calidad reactivo
 - ◆ Baños termostáticos de temperatura regulable de Selecta, modelos JP, Precistern, Unitronic S320-100 y Unitronic 6320-100

- ◆ pHmetro Crison, modelo 2001
- ◆ Agitadores magnéticos con calefacción Bibby, modelo HB 502
- ◆ Agitadores manuales de tubos Vórtex IKA, modelo MS 1
- ◆ Congelador vertical Liebherr, modelo GSD-3005-11 SN
- ◆ Refrigerador Liebherr, modelo KS-3610-11 SN-T
- ◆ Material habitual de laboratorio.

2.7. Metodología

2.7.1. Determinaciones analíticas

2.7.1.1. Valoración del metabolismo de la arginina:

2.7.1.1.1. Determinación de L-Arginina y sus derivados metilados

Fundamento teórico: La determinación simultánea de L-arginina, NMMA, ADMA y SDMA se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) utilizando una modificación del procedimiento descrito por Vallance P y cols (1992). El procedimiento utiliza la extracción en fase sólida mediante columnas de intercambio catiónico para el aislamiento previo de todos los aminoácidos básicos, seguido de su concentración y posterior separación cromatográfica en columnas de HPLC de fase reversa. La cuantificación final de la arginina y sus correspondientes derivados metilados en este procedimiento se realiza a través de su absorción directa a 200 nm.

Reactivos: L-arginina (hidrocloruro), dimetilarginina asimétrica (ADMA; N^G, N^G -dimetilarginina; dihidrocloruro), dimetilarginina simétrica (SDMA; N^G, N^{G1} -dimetilarginina; forma di-(p-hidroxiazobenceno-p'-sulfonato)) y monometilarginina (NMMA; N^G -metilarginina; forma acetato) fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Acetonitrilo (grado HPLC), metanol (grado HPLC), ácido fosfórico, ácido hexanosulfónico, ácido tricloroacético, trietilamina, fosfato monosódico (NaH_2PO_4), fosfato disódico (Na_2HPO_4) e hidróxido potásico fueron de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania).

Procedimiento: De forma resumida, la arginina y derivados metilados de 0.8-1 mL de plasma se purificaron parcialmente mediante extracción en una columna Bond Elut SCX de 500 mg (3 mL; Varian, Scharlab) previamente acondicionada mediante lavado con 2 mL de metanol y 4 mL de ácido tricloroacético al 2%. Tras aplicar la muestra de plasma, la columna se lavó sucesivamente con 2 mL de ácido tricloroacético al 2% y 5 mL de tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 8.0 y, a continuación, se eluyeron los compuestos con grupos aminoguanidino con 4 mL de una solución de metanol:agua:triethylamina (68:30:2) preparada diariamente. El eluado se evaporó hasta sequedad a 60°C, y el residuo seco se redisolvió en 120 µL de una solución de 25 mM ácido fosfórico, 10 mM ácido hexanosulfónico y 1% [v/v] acetonitrilo, ajustada a pH 5.0 con 5 M KOH. Las muestras así preparadas se analizaron inmediatamente o se mantuvieron a -20°C hasta su análisis mediante HPLC. Los análisis se realizaron por duplicado inyectando 40 y 50 µL de cada muestra en el sistema cromatográfico.

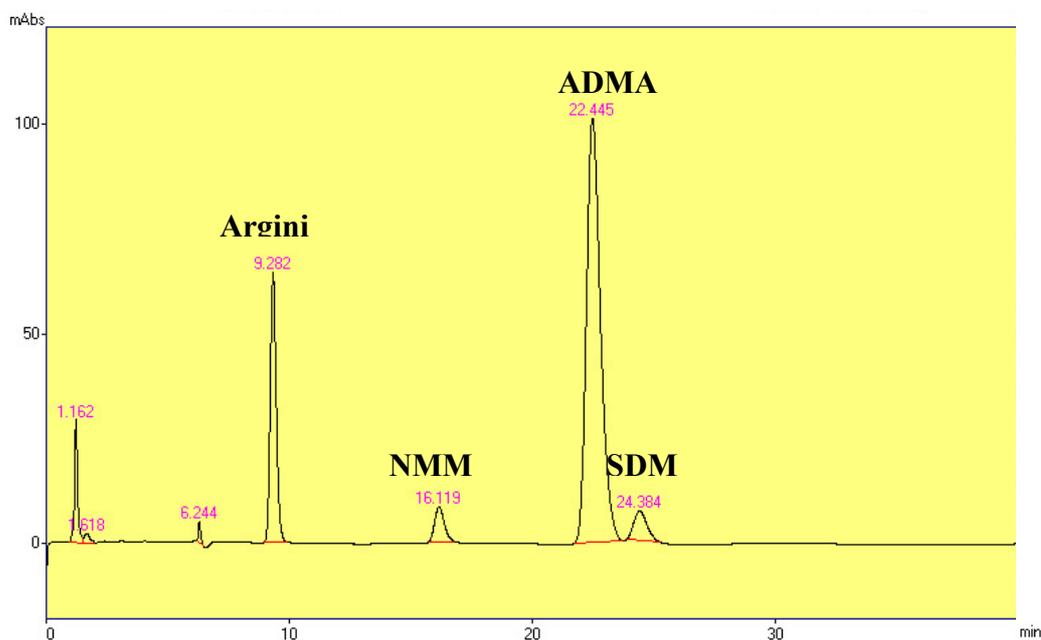


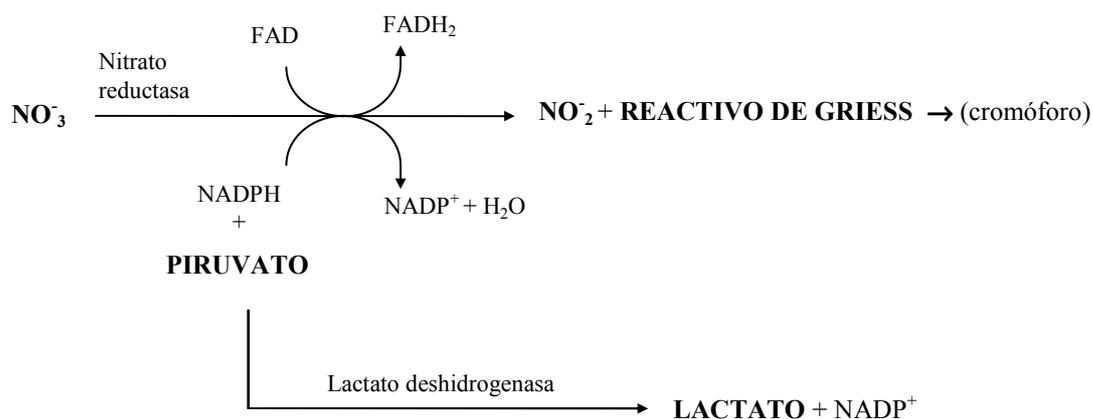
Figura 2.1. Ejemplo de cromatograma obtenido por el procedimiento descrito a partir de una muestra de plasma. En él aparecen los tiempos de retención (min) de la arginina y sus derivados metilados analizados.

El procedimiento de HPLC se realizó en un sistema Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) formado por una bomba de gradiente (LC-10AD), un

inyector automático (SIL-10AD), un detector ultravioleta/visible (SPD-10AV) y un módulo de comunicación (CBM-10A) conectados a un módulo computerizado de control (CLASS-LC10 software v1.60). La separación de la arginina y sus derivados metilados se realizó isocráticamente en una columna analítica Kromasil C18 (5 μ m; 250 x 4.6 mm de diámetro interno; Scharlau) utilizando como solvente una solución de 25 mM ácido fosfórico, 10 mM ácido hexano sulfónico y 1 % [v/v] acetonitrilo, ajustada a pH 5.0 (con 5 M KOH), a una velocidad de flujo de 1.3 mL/min. El tiempo total de cada análisis fue de 40 min, durante el cual se registró la absorbancia a 200 nm para la identificación de la L-arginina (RT 9-10 min), NMMA (RT 16-17 min), ADMA (RT 22-23 min) (Hermenegildo C y cols, 2002) y SDMA (RT 24-25 min). La **Figura 2.1** muestra los resultados experimentales de un cromatograma orientativo. Las concentraciones de cada uno de los compuestos analizados en las muestras se establecieron por comparación con estándares sintéticos comerciales. Las curvas patrón obtenidas para los diferentes compuestos estudiados fueron lineales entre 0.1 y 100 μ mol/L. La variabilidad del método fue inferior al 7 % y el límite de detección se estableció en 0.1 μ mol/L.

2.7.1.1.2. Determinación de nitrato y nitrito

Fundamento teórico: Nitrito y nitrato en plasma y orina se cuantificaron básicamente según el procedimiento descrito por Moshage H y cols (1995), basado en la determinación colorimétrica de nitrito con el reactivo de Griess, antes y después de la conversión del nitrato a nitrito por la nitrato reductasa de *Aspergillus*. Puesto que la nitrato reductasa requiere FAD y NADPH para funcionar, el exceso de NADPH, que interfiere con el color posterior, se elimina con lactato deshidrogenasa que lo utiliza para la conversión del piruvato a lactato según el siguiente esquema:



El nitrito reacciona con ácido sulfanílico y naftilamina (componentes del reactivo de Griess) en medio ácido, formando un compuesto diazoico (*p*-sulfobenceno-azo- α -naftil-amina) con un máximo de absorción a 540 nm y un coeficiente de extinción de $39,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El límite de detección del ensayo es de $\sim 1,5 \mu\text{M}$.

Reactivos: Fosfato monopotásico (KH_2PO_4), fosfato dipotásico (K_2HPO_4) hidróxido sódico e hidróxido potásico fueron de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania); sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), nitrato sódico (NaNO_3), nitrito sódico (NaNO_2), sulfanilamida (cristalina), N-(1-naftil)etilendiamina, FAD (flavin adenin dinucleótido, sal disódica), NADPH (β -nicotinamin adenin dinucleótido fosfato, forma reducida, sal tetrasódica) y ácido fosfórico fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA); piruvato sódico ($\text{NaC}_3\text{H}_3\text{O}_3$), lactato deshidrogenasa (de músculo de conejo; suspensión en sulfato amónico; 550 U/mg de proteína) y nitrato reductasa (de *Aspergillus spp*, cristalina; 10 U/mg de proteína) fueron de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania).

Preparación del reactivo de Griess:

Solución A: 2 g/L de sulfanilamida en 50 g/L de ácido fosfórico.

Solución B: 0,2 g/L de N-(1-naftil)etilendiamina.

En el momento de su utilización, se mezclan **A** y **B** en partes iguales obteniéndose una concentración final de 1 g/L de sulfanilamida, 0,1 g/L de N-(1-naftil) etilendiamina y 25 g/L de ácido fosfórico.

Procedimiento: Con el fin de evitar interferencias, en todo el procedimiento sólo se utilizó material de plástico. Para las determinaciones, 75 μL de plasma o 5 μL de orina se incubaron (volumen final de 510 μL) con NADPH, FAD y nitrato reductasa a una concentración final de 50 μM , 5 μM y 0,16 U/mL, respectivamente, en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5. Tras incubar las muestras durante 20 min a 37°C, se añadieron 30 μL de lactato deshidrogenasa (0,2 mg/mL en tampón fosfato potásico 0,15 M, pH 7,5) y 30 μL de piruvato sódico 0,2 M, prosiguiéndose con la incubación otros 5 min a 37°C para oxidar el NADPH. Finalmente, las muestras fueron desproteinizadas con 30 μL de sulfato de zinc (300 g/L) y centrifugadas (15000 g, 5 min) tras 15 min a 0-4°C. 500 μL del sobrenadante se mezclaron en tubos eppendorf con 500 μL del reactivo de Griess y, tras 15 min a T.A. para el desarrollo del color, se determinó la absorbancia a 540 nm.

Los valores de absorbancia así obtenidos representan la suma total de las contribuciones de nitrato y nitrito. Para la determinación de nitrito se procesaron paralelamente otras muestras, siguiendo exactamente el mismo procedimiento, pero omitiendo la adición de nitrato reductasa. La concentración de nitrato se obtuvo por sustracción de la concentración de nitrito de la total de nitrato + nitrito.

Las muestras se procesaron siempre en paralelo con tubos patrón que contenían cantidades conocidas de nitrato o nitrito (**Figura 2.2**), a partir de los cuales se realizaron los cálculos de las concentraciones de ambos compuestos en las muestras procesadas.

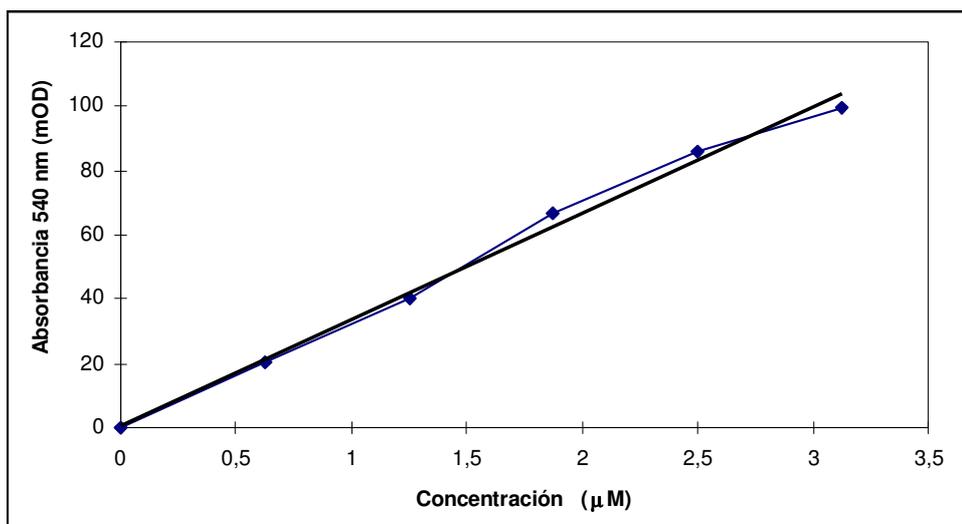


Figura 2.2. Ejemplo ilustrativo de recta patrón de nitrato.

2.7.1.1.3. Determinación de poliaminas en sangre total

Fundamento teórico: el método utilizado (Brachet P y cols, 1996) se basa en la reacción del cloruro de dansilo con grupos amino produciendo derivados dansilados, los cuales exhiben una intensa fluorescencia amarilla que puede identificarse cromatográficamente. El pH óptimo de la reacción oscila entre 9 y 11, que se consigue añadiendo carbonato sódico saturado al medio de reacción. Los reactivos son utilizados en exceso posibilitando la reacción de todos los grupos amino de las poliaminas y otros compuestos con grupos amino presentes en las muestras. Tal exceso es eliminado por la adición de L-prolina. Los derivados dansilados de las poliaminas son separados del resto por extracción con tolueno, ya que presentan una alta solubilidad en solventes orgánicos y, finalmente, identificados y cuantificados mediante HPLC de fase reversa y detección fluorescente.

Reactivos: cloruro de dansilo (5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonil cloruro), L-prolina, putrescina (1,4-butanodiamina), espermidina (N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina) y espermina (N,N'-bis[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina), fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Acetonitrilo (grado HPLC), tolueno, acetona, ácido perclórico y carbonato sódico (Na₂CO₃) fueron de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania).

Procedimiento: se mezclaron en tubos de ensayo 100 µL del sobrenadante de la sangre total acidificada (véase epígrafe 2.5.; obtención de muestras biológicas y procesamiento) con 200 µL de carbonato sódico saturado y 400 µL de cloruro de dansilo en acetona (10 mg/mL). Los tubos se incubaron protegidos de la luz directa durante 90 min a 55°C con agitación ocasional. A continuación se les añadieron 100 µL de una solución de L-prolina (100 mg/mL) y se prosiguió con la incubación otros 30 min en las mismas condiciones. Para la extracción de los derivados dansilados de las poliaminas se añadieron 500 µL de tolueno de los que se extrajeron 400 µL tras agitación vigorosa (formación de una sola fase) y centrifugación (100 g, 5 min). La extracción se repitió con 300 µL de tolueno, que se recuperaron totalmente, y se mezclaron en tubos eppendorf con los de la extracción anterior. La mezcla de las fracciones de tolueno se secó bajo vacío y guardó en oscuridad a -80°C, hasta el momento de su análisis por HPLC, en el que se redisolvió en acetonitrilo (100 µL), se centrifugó (15000 g, 3 min) e inyectaron 20 µL en el sistema cromatográfico. En cada análisis realizado se procesó paralelamente una muestra patrón con cantidades conocidas de las tres poliaminas a determinar.

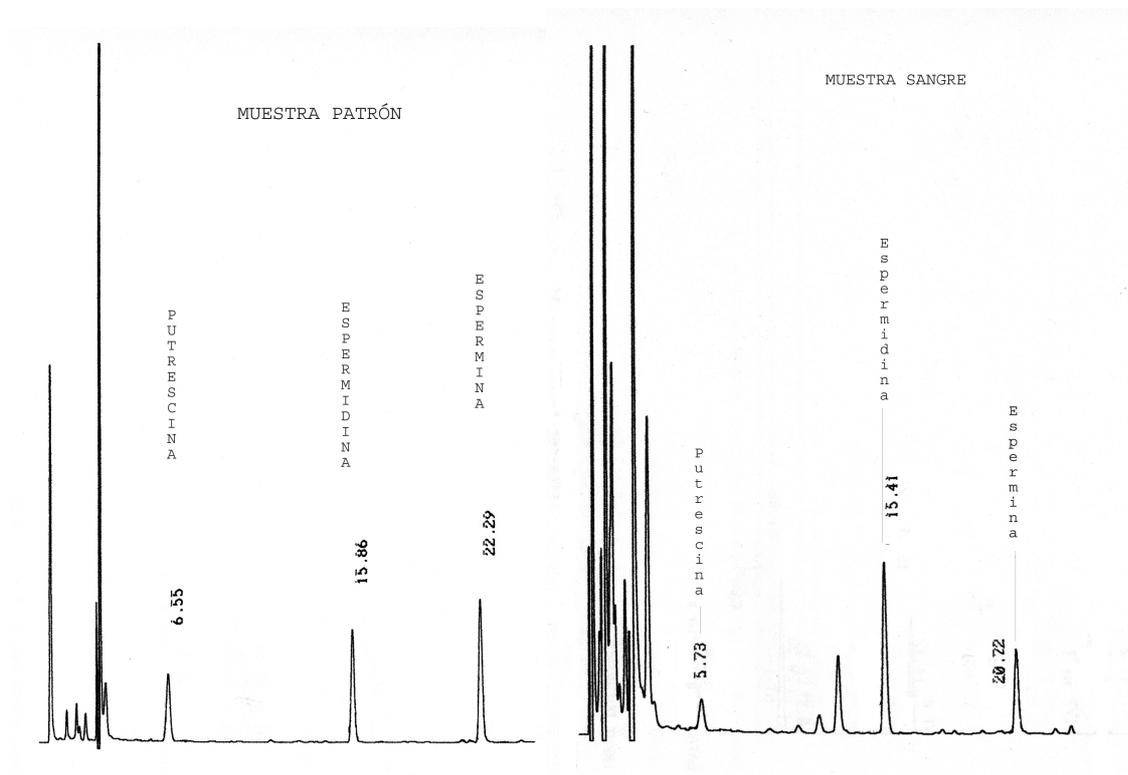


Figura 2.3. Ejemplos de cromatogramas obtenidos por el procedimiento descrito a partir de una muestra patrón y de sangre total acidificada. Se indican los tiempos de retención (min) de las diferentes poliaminas. La cantidad de putrescina, espermidina y espermina inyectada en la muestra patrón fue de 0,25 nmoles. La fluorescencia viene expresada en unidades arbitrarias (UA).

En la determinación cromatográfica (HPLC) de las poliaminas se utilizó una columna de fase reversa Nova-Pak C₁₈ (3,9 x 150 mm, 4 µm; Waters) protegida con una precolumna de las mismas características (Nova-Pak C₁₈; 3,9 x 20 mm, 4 µm; Waters). Se aplicó un gradiente lineal programado de 50 min entre 100% de una mezcla de acetonitrilo:agua (60:40) y 100% acetonitrilo a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min y T.A. Las poliaminas dansiladas se detectaron fluorimétricamente (excitación y emisión 338 y 510 nm, respectivamente) y se identificaron por sus tiempos de retención, determinados en las muestras patrón procesadas paralelamente, y corroborados por co-elución de los picos tras la inyección de muestras mixtas (patrones-muestras experimentales). Para la cuantificación se utilizó el área de los picos, relativa a la de los patrones. En la **Figura 2.3** se muestran dos cromatogramas representativos de una muestra patrón y de una muestra de sangre.

2.7.1.2. Valoración del daño oxidativo a lípidos:

2.7.1.2.1. Determinación de hidroperóxidos lipídicos (ROOHs)

Fundamento teórico: Para cuantificar la cantidad de ROOHs en plasma se siguió el método colorimétrico de Nourooz-Zadeh (Nourooz-Zadeh J y cols, 1994 y 1995). El procedimiento se basa en la oxidación del ion ferroso a férrico por hidroperóxidos lipídicos (ROOHs) en condiciones ácidas. Los iones férricos producidos en el ensayo se complejan con el indicador naranja de xilenol generando un cromóforo con un coeficiente de extinción a 560 nm de $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

En muestras de plasma el procedimiento utiliza trifenilfosfina para obtener un control interno, ya que destruye los ROOHs presentes en el plasma, señalando de esta manera la presencia de ion férrico no producido por los ROOHs. Por otra parte, el metanol/H₂SO₄ que se adiciona al medio desnaturaliza las proteínas facilitando el acceso de los ROOHs a los iones ferrosos, y el hidroxitolueno butilado funciona como antioxidante. El límite de detección del procedimiento es de, aproximadamente, 1µM.

Reactivos: Sulfato ferroso amónico (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), naranja de xilenol, hidroxitolueno butilado (BHT) y trifenilfosfina (TPP) fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). El ácido sulfúrico y el metanol (grado HPLC) fueron de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania).

Preparación de los reactivos:

Solución de FOX 2: Se disuelven 9,8 mg de sulfato ferroso amónico hexahidratado en 10 mL de H₂SO₄ 250 mM y la solución obtenida se mezcla con 90 mL de metanol (grado HPLC) conteniendo 79,2 mg de BHT. Finalmente se añaden, bajo agitación, 7,6 mg de naranja de xilenol. Las concentraciones finales de todos los componentes en el reactivo son: sulfato ferroso amónico 250 µM, naranja de xilenol 100 µM, H₂SO₄ 25 mM y BHT 4 mM en 90% de metanol (v/v). Previamente a su uso se calibró su funcionamiento frente a soluciones de H₂O₂ de molaridad conocida (0-100 µM).

Procedimiento: Las muestras de plasma se obtuvieron según el procedimiento descrito previamente (véase apartado 2.5.). Se transfirieron alícuotas de 90 μL de plasma a tubos eppendorf que contenían 10 μL de metanol (tubos experimentales) o 10 μL de TPP 10 mM en metanol (tubos control) y se incubaron 30 min a T.A. antes de la adición de 900 μL del reactivo de FOX 2. Tras incubar otros 30 min a T.A. para el desarrollo del color, las muestras se centrifugaron (15000 g, 10 min) y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 560 nm. De acuerdo con el procedimiento seguido Nourooz-Zadeh (Nourooz-Zadeh J y cols, 1994 y 1995), las determinaciones se realizaron por triplicado y la absorbancia a utilizar para el cálculo de la concentración de ROOHs en las muestras de plasma se obtuvo por diferencia entre la media de los tubos experimentales y la de los controles tratados con TPP. Los cálculos se realizaron a partir de la recta patrón de H_2O_2 (0-100 μM) realizada en paralelo exactamente en las mismas condiciones experimentales. La **Figura 2.4** muestra un ejemplo representativo de recta patrón para ROOHs obtenida en las condiciones descritas.

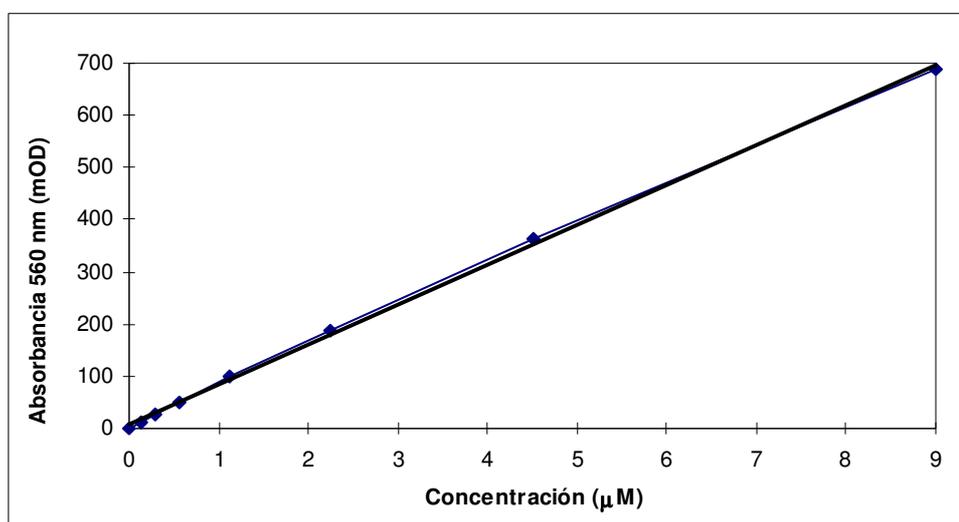


Figura 2.4. Ejemplo ilustrativo de recta patrón para hidropéroxidos lipídicos.

2.7.1.2.2. Determinación de material reactivo con ácido tiobarbitúrico

Fundamento teórico: El procedimiento utilizado se basa en la reacción del malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido generando un complejo coloreado formado por condensación de dos moléculas de TBA con una de MDA, y la posterior determinación del complejo por espectrofotometría a 532 nm ($\epsilon = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Otros compuestos con grupos aldehído pueden reaccionar con el ácido tiobarbitúrico en estas condiciones y, por lo tanto, el procedimiento no es específico para el MDA. Debemos hablar por lo tanto, en términos generales, de determinación de material reactivo con TBA (TBARM) en lugar de determinación de MDA. En las muestras de plasma se utilizaron las condiciones descritas por Santos MT y cols (1980) y en orina se siguió el procedimiento de L'Abbé MR y cols (1991) y Wander RC y cols (1996).

Reactivos: Dodecil sulfato sódico (SDS), tetrametoxipropano (TMP), ácido tiobarbitúrico (TBA), hidroxitolueno butilado (BHT) y Trizma base (Tris[hidroximetil]aminometano) fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Ácido acético, ácido tricloroacético (TCA), ácido clorhídrico e hidróxido sódico fueron de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania).

Procedimiento: Para las determinaciones en orina se tomaron 0,5 mL de orina o patrón (TMP) que se mezclaron con 0,2 mL de SDS 0,3 M, 1,5 mL de ácido acético 3,5 M (pH ajustado a 3,5 con NaOH), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 60 mM y 25 μL de BHT 2 mM (en metanol). El volumen final se ajustó a 5 mL con agua. Las muestras se incubaron durante 1 h a 100°C, se enfriaron en agua (5-10 min) y centrifugaron (900 g, 5 min), tras lo que se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm.

Para las determinaciones en plasma, 50 μL de las muestras se mezclaron con 250 μL de suero fisiológico, 500 μL de TCA al 100% (p/v; en HCl 6 N) y 100 μL de TBA 0,12 M (en Tris-HCl 0,26 M, pH 7,0), y se incubaron durante 30 min a 100°C. Tras enfriar a T.A. se añadieron 1,1 mL de agua y se determinó la absorbancia a 532 nm del

sobrenadante tras centrifugación (900 g, 5 min). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

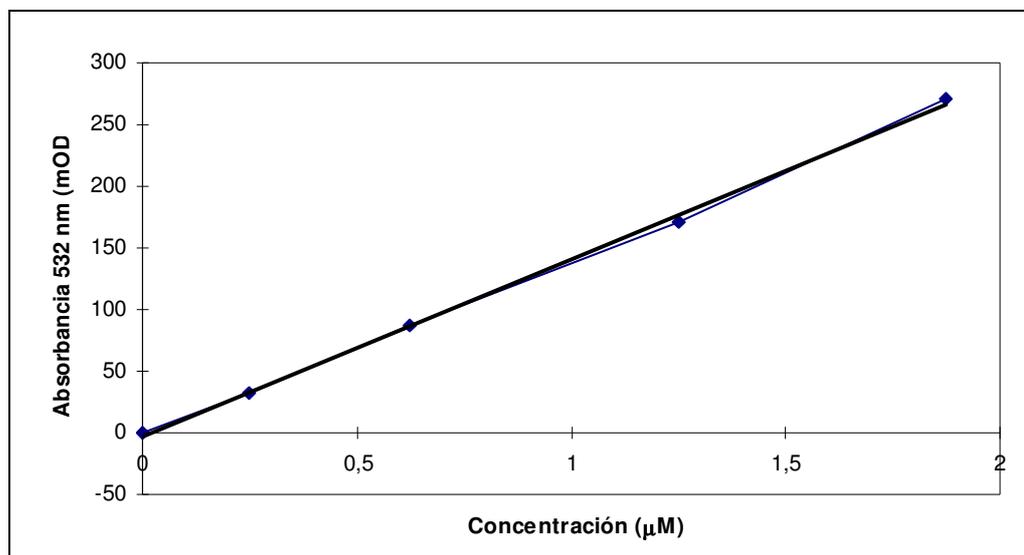


Figura 2.5. Ejemplo ilustrativo de recta patrón de malondialdehído (MDA), siguiendo el procedimiento descrito para la determinación en orina.

La concentración de TBARM se calculó como equivalentes de malondialdehído usando el coeficiente de extinción indicado para el complejo MDA-TBA, comprobado bajo nuestras condiciones experimentales con las curvas de calibración de TMP (0-20 µM) realizadas paralelamente (Figura 2.5). Dado que la orina utilizada para la determinación de TBARM (y de nitrato) corresponde a la primera micción matutina y no a orina de 24 h, los niveles urinarios de estos metabolitos se expresan referidos a la concentración de creatinina en las mismas muestras de orina. Experimentalmente hemos comprobado que la relación TBARM/creatinina no experimenta fluctuaciones horarias importantes a lo largo del día y, por lo tanto, es un índice válido de la excreción de estos productos finales de peroxidación lipídica, al igual que la relación nitrato/creatinina urinaria lo es para la excreción de nitrato (Wennmalm A y cols, 1993).

2.7.1.3. Valoración del daño oxidativo a proteínas:

2.7.1.3.1. Determinación de grupos carbonilo en proteínas plasmáticas

Fundamento teórico: El procedimiento utilizado, desarrollado por Levine RL y cols (1990), se basa en la reacción equimolar de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas. La DNFH unida a proteínas se cuantifica espectrofotométricamente ($\epsilon_{373} = 21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina.

Reactivos: Fosfato monosódico (NaH_2PO_4), fosfato disódico (Na_2HPO_4), ácido clorhídrico, acetato de etilo, etanol y ácido tricloroacético (TCA) fueron suministrados por Riedel-de Haën (Seelze, Alemania). Ácido trifluoroacético, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) y guanidina (clorhidrato) fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Preparación de los reactivos: La guanidina 6 M se preparó en tampón fosfato sódico 20 mM pH 6,5 y el pH final de la solución se ajustó a 2,3 con ácido trifluoroacético (Levine RL y cols, 1990)

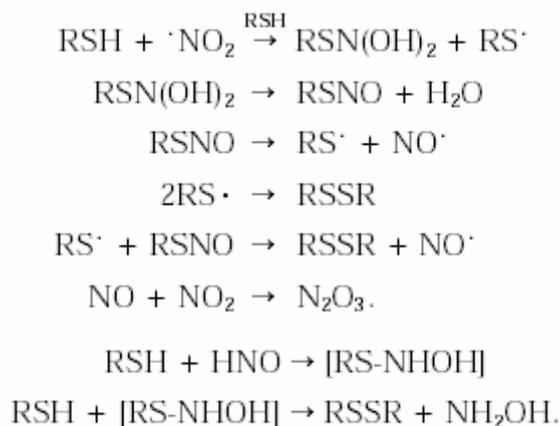
Procedimiento: 10 μL de plasma se mezclaron en tubos eppendorf con 500 μL de DNFH al 0,2% (p/v) en HCl 2 N y la mezcla se incubó 1 h a T.A. con agitación ocasional (vórtex). Se añadieron a continuación 500 μL de TCA al 20% (p/v), dejándose los tubos durante 15 min a 0-4°C para permitir la precipitación de la proteína, que se separó por centrifugación (6000 g, 3 min), descartándose el sobrenadante. Para eliminar el exceso de reactivo libre, se lavó el precipitado tres veces con 1 mL de una mezcla de etanol:acetato de etilo (1:1), dejando 10 min antes de recuperar el precipitado por centrifugación (6000 g, 3 min), y despreciándose cada vez el sobrenadante. Finalmente, la proteína se redisolvió en 1 mL de la solución de guanidina 6 M mediante agitación (vórtex) e incubación a 37°C (30 min), y se determinó su absorción óptica a 373 nm frente a la solución de guanidina. Para cada muestra analizada se procesó en paralelo un

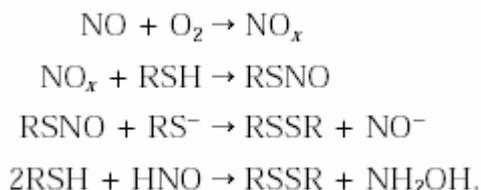
blanco tratado exactamente en las mismas condiciones pero sin DNFH (sólo con HCl 2 N). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Los cálculos del contenido de carbonilos para cada muestra se realizaron por la diferencia de absorbancias entre el tubo experimental derivatizado con DNFH y su blanco correspondiente de HCl, y se expresan como nmoles de grupos carbonilo/mg de proteína presente en el ensayo.

2.7.1.3.2. Determinación de grupos sulfhidrilo (-SH) en proteínas plasmáticas

Fundamento teórico: Los grupos -SH de los aminoácidos sulfurados de las proteínas suelen encontrarse en su forma reducida, como sulfhidrilos, y son estables a la oxidación en medio ácido. El procedimiento utilizado para su cuantificación, desarrollado por Ellman GL en 1959, consiste en oxidar los grupos sulfhidrilo de las muestras de plasma con un disulfuro simétrico (ácido 5-5'-ditiobis[2-nitrobenzoico]; DTNB; reactivo de Ellman) que, al reducirse, genera un disulfuro mixto y un anión tiolato (5-tio-2-nitrobenzoato; TNB) que puede cuantificarse espectrofotométricamente debido a su fuerte absorción a 412 nm (coeficiente de extinción de $13'6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El reactivo de Ellman es ampliamente utilizado como método sensible para la cuantificación de grupos -SH en tejidos y proteínas.





Reactivos: Ácido 5,5'-ditiobis[2-nitrobenzoico] (DTNB) (**Figura 2.6**), Trizma base (Tris[hidroxi-metil]aminometano) y ácido clorhídrico fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

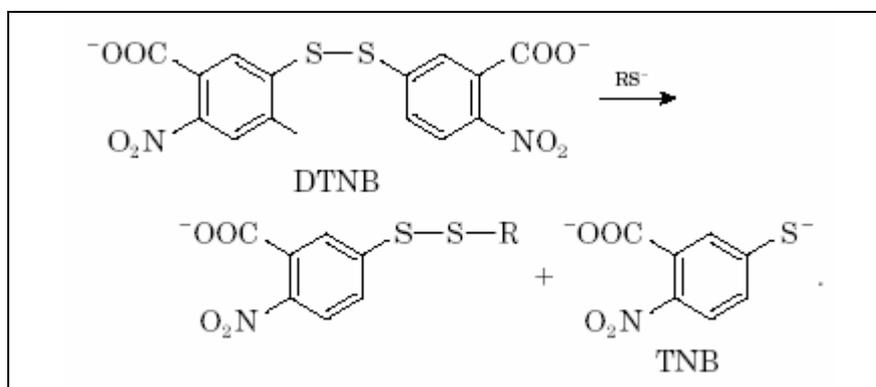


Figura 2.6. Fórmula química del reactivo de Ellman: 5,5-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico)(DTNB)

Preparación de los reactivos: La solución de DTNB (10 mM) se preparó diariamente en tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8'0.

Procedimiento: Para las determinaciones, 50 μL de plasma se incubaron (volumen final del ensayo 1 mL) en tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, con DTNB a una concentración final de 0,25 mM. Tras 20 min a T.A. se determinó la absorción de la muestra a 412 nm frente a un blanco que contenía exclusivamente el tampón de ensayo (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0). Con el fin de eliminar la absorción inespecífica de las muestras de plasma, se procesaron paralelamente duplicados de cada muestra incubados exactamente en las mismas condiciones pero en ausencia de DTNB. Una muestra adicional conteniendo exclusivamente el tampón de ensayo y 0,25 mM DTNB permitió sustraer la absorción a 412 nm propia de este reactivo. El valor de absorbancia utilizado

para el cálculo de la concentración de grupos –SH en cada muestra se obtuvo sustrayendo del valor de absorción del tubo experimental (conteniendo muestra y DTNB), los correspondientes a los tubos que contenían exclusivamente muestra o DTNB (Gergel D y Cederbaum AI, 1997). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y, con la finalidad de agilizar el procedimiento, éste se realizó directamente en cubetas de espectrofotómetro de 1 mL.

2.7.1.4. Otras determinaciones:

2.7.1.4.1. Determinación de proteínas

Fundamento teórico: La determinación del contenido en proteínas de las muestras de plasma se realizó por el procedimiento de Lowry OH y cols (1951). El método se basa en la propiedad que presentan los compuestos con enlaces peptídicos de reaccionar en medio alcalino con sales de cobre para dar una coloración violeta. El reactivo de Folin para fenoles permite incrementar la sensibilidad del procedimiento.

Reactivos: Tartrato sódico potásico ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), dodecil sulfato sódico (SDS), albúmina de suero bovino (BSA), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y reactivo de Folin-Ciocalteu fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Carbonato sódico (Na_2CO_3) e hidróxido sódico fueron de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania).

Preparación de los reactivos:

Solución A: Se disolvieron 20 g de carbonato sódico, 4 g de hidróxido sódico, 1,6 g de tartrato sódico potásico y 10 g de SDS en agua, llevándose el volumen final hasta 1 litro.

Solución B: Solución de sulfato de cobre al 4% (p/v).

Solución C: Se preparó, inmediatamente antes del ensayo, mezclando 100 partes de la solución A y 1 parte de la solución B.

Procedimiento: Se utilizaron 10 μL de plasma convenientemente diluido en agua (1/20; v/v) que se mezclaron en tubos de ensayo con 400 μL de agua y 1,2 mL de solución C. Tras incubar 45 min a T.A., se añadieron 60 μL del reactivo de Folin y se prosiguió con la incubación otros 45 min en las mismas condiciones, al final de los cuales se determinó la absorbancia a 660 nm. Los cálculos de la cantidad de proteína de las muestras se realizaron por interpolación de las absorbancias en una curva patrón de BSA (0-100 μg) realizada en paralelo exactamente en las mismas condiciones (**Figura 2.7**).

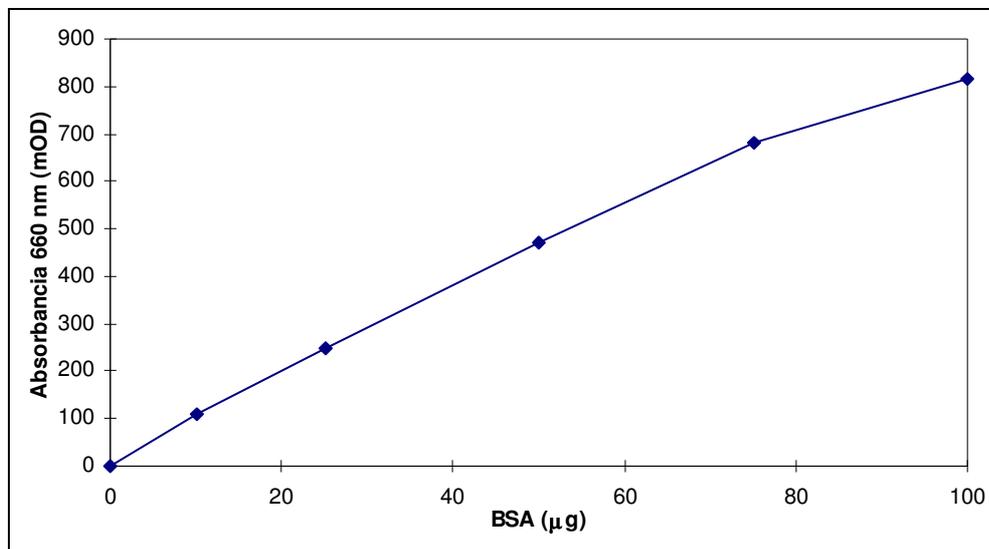


Figura 2.7. Ejemplo ilustrativo de curva patrón para la cuantificación de proteínas.

2.7.1.4.2. Determinación de creatinina

Fundamento teórico: Se utilizó una modificación comercial para química clínica (test combination, Boehringer Mannheim) del procedimiento clásico de Jaffé (Instrucciones de trabajo de laboratorios Boehringer, Dubnoff JW, 1957), basado en la formación de un complejo coloreado entre la creatinina y el ácido pícrico en medio alcalino.

Procedimiento: Se mezclaron 5 μL de orina con 125 μL de ácido tricloroacético al 20% (p/v), 125 μL de H_2O y 0,5 mL de una solución de ácido pícrico 17,5 mM en NaOH 0,8 M. La mezcla se incubó durante 20 min a 25°C (es imprescindible un control

estricto de la temperatura) y se determinó la absorción óptica a 520 nm, que se comparó con la obtenida al procesar una muestra patrón de creatinina en las mismas condiciones.

2.7.1.4.3. Determinaciones del laboratorio clínico de referencia:

En la determinación del colesterol total se utilizó el método automatizado CHOD-PAD (high performance, test-color enzimático) de Boehringer Mannheim para el sistema BM/Hitachi 704. El mismo sistema fue utilizado para la determinación de la fracción de colesterol HDL, tras precipitación con una mezcla de polietilenglicol-ácido fosfotúngstico-cloruro de magnesio. La fracción de colesterol LDL se valoró indirectamente mediante la fórmula de Friedewald, siempre que los triglicéridos no superasen los 400 mg/dL (4.45 mM) (Friedewald WT y cols, 1972). Los triglicéridos se determinaron con el método automatizado GPO-PAP, test enzimático colorimétrico, de Boehringer Mannheim para el sistema BM/Hitachi 717. La glucemia se determinó mediante el procedimiento enzimático-colorimétrico de la glucosa oxidasa, utilizando el test GOD-PAD de Boehringer Mannheim, automatizado con el SYS 2 BM/Hitachi 717/911. La creatinina plasmática se determinó colorimétricamente por el método de Jaffé (test MPR 3 creatinina, de Boehringer Mannheim) y la urea mediante el procedimiento enzimático-colorimétrico de la ureasa (urea test combination, Boehringer Mannheim). Finalmente, la microalbuminuria y la proteína C reactiva se determinaron inmunoturbidimétricamente utilizando kits comerciales de Laboratorios Roche para el analizador BM/Hitachi 911.

2.8. Análisis estadístico:

Los resultados de este trabajo han sido procesados con el paquete estadístico SPSS 12.0 para Windows. Los datos se describen en forma de intervalo centrado en la media aritmética (estadístico indicativo de la tendencia central) y con el error estándar de la media (estadístico de dispersión).

Dado que en el presente trabajo se han estudiado tres grupos poblacionales, se ha aplicado el análisis de la varianza (ANOVA) para la comparación entre medias seguido,

cuando éste resulta significativo, del test LSD para la comparación a posteriori de las parejas de medias. Para el contraste estadístico de las medias entre dos poblaciones, obtenidas en los diferentes grupos estudiados para la variable respuesta analizada, se utilizó el test t de Student de dos colas. Para valorar la posible dependencia lineal de dos variables entre sí se ha utilizado la regresión lineal simple y el coeficiente de correlación r de Pearson. En todos los casos se ha utilizado como límite de significación la probabilidad $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA POBLACIONAL

Las características de las muestras poblacionales de los grupos de estudio quedan reflejadas en las **Tablas 3.I** (población global) y **3.II-3.III** (C.S. de Onda y Vila-real, respectivamente). Como puede observarse en las mismas, las ligeras diferencias en edad entre los grupos vienen determinadas por las características de la muestra poblacional del C. S. de Vila-real. La distribución por sexos es prácticamente 1:1 en los grupos control e hipercolesterolémico de forma global; sin embargo, en el grupo con estatinas existe un ligero predominio masculino.

	Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
Número pacientes	28	39	23	
Edad (años)	51 ± 2	52 ± 1	56 ± 1	ns
Sexo (hombre/mujer)	13/15	19/21	14/9	
HTA (Sí/No)	6/22	16/23	13/10	
Fumador (Sí/No)	7/21	11/28	7/16	
Consumo cerveza (Sí/ No)	6/22	17/22	11/12	
Consumo vino (Sí/No)	7/21	22/17	10/13	
Índice Masa Corporal (Kg/m ²)	27·6 ± 1·0	27·9 ± 0·7	28·3 ± 0·6	ns
Índice Cintura-Cadera (cm/cm)	93 ± 2 ^b	92 ± 1 ^b	98 ± 1 ^a	0·006
Glucemia basal (mg/dL)	90 ± 2 ^b	94 ± 2 ^{ab}	99 ± 3 ^a	0·032
Colesterol total (mg/dL)	175 ± 4 ^c	244 ± 5 ^a	213 ± 7 ^b	<0·001
HDL colesterol (mg/dL)	55 ± 2	58 ± 3	52 ± 2	ns
LDL colesterol (mg/dL)	103 ± 4 ^c	156 ± 4 ^a	134 ± 4 ^b	<0·001
Triglicéridos (mg/dL)	81 ± 5 ^c	158 ± 22 ^a	145 ± 12 ^b	0·006
Cociente aterogénico	3·23 ± 0·12 ^c	4·56 ± 0·24 ^a	4·18 ± 0·17 ^b	<0·001
Urea plasma (mg/dL)	35 ± 1	36 ± 1	37 ± 2	ns
Creatinina plasma (mg/dL)	0·97 ± 0·02	0·99 ± 0·02	1·02 ± 0·03	ns
Proteína C reactiva (mg/dL)	0·46 ± 0·05	0·59 ± 0·05	0·62 ± 0·1	ns
Microalbuminuria (mg/dL)	5·0 ± 0·2	3·8 ± 0·7	11·2 ± 5·2	ns
Hematocrito (%)	43·7 ± 0·8	43·3 ± 1·1	43·7 ± 1·3	ns

Tabla 3.I. Características globales de la muestra poblacional de los grupos control, hipercolesterolémico e hipercolesterolémico en tratamiento con estatinas. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística). Los datos están expresados como media ± error estándar de la media (ESM). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas con p ≤ 0·05.

	Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
Número pacientes	14	21	9	
Edad (años)	55 ± 2	55 ± 2	54 ± 2	ns
Sexo (hombre/mujer)	4/10	11/10	6/3	
HTA (Sí/No)	4/10	13/8	3/6	
Fumador (Sí/No)	2/12	7/14	2/7	
Cerveza (Sí/No)	3/11	14/7	6/3	
Vino (Sí/No)	4/10	15/6	6/3	
Índice Masa Corporal (Kg/m ²)	29'9 ± 1'4	29'6 ± 0'8	27'8 ± 0'9	ns
Índice Cintura-Cadera (cm/cm)	89 ± 2	92 ± 1	94 ± 2	ns
Glucemia basal (mg/dL)	92 ± 3	99 ± 3	106 ± 6	ns
Colesterol total (mg/dL)	183 ± 5 ^c	244 ± 6 ^{ab}	223 ± 15 ^b	<0'001
HDL colesterol (mg/dL)	53 ± 2	55 ± 3	58 ± 3	ns
LDL colesterol (mg/dL)	110 ± 5 ^c	161 ± 6 ^{ab}	138 ± 14 ^b	<0'001
Triglicéridos (mg/dL)	90 ± 9 ^c	146 ± 11 ^{ba}	150 ± 26 ^a	0'006
Cociente aterogénico	3'49 ± 0'15 ^b	4'78 ± 0'30 ^a	3'82 ± 0'23 ^b	0'004
Urea plasma (mg/dL)	35 ± 1	36 ± 2	36 ± 2	ns
Creatinina plasma (mg/dL)	0'92 ± 0'04	1'03 ± 0'04	1'08 ± 0'06	ns
Proteína C reactiva (mg/dL)	0'57 ± 0'08	0'66 ± 0'07	0'73 ± 0'27	ns
Microalbuminuria (mg/dL)	4'4 ± 0'8	3'9 ± 0'6	7'8 ± 4'2	ns

Tabla 3.II. Características de la muestra poblacional del C. S. de Onda de los grupos control, hipercolesterolémico e hipercolesterolémico en tratamiento con estatinas. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística). Los datos están expresados como media ± ESM. Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas con p ≤ 0'05.

	Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
Número pacientes	14	18	14	
Edad (años)	48 ± 2 ^b	49 ± 2 ^b	57 ± 1 ^a	0'001
Sexo (hombre/mujer)	9/5	7/11	8/6	
HTA (Sí/No)	2/12	3/15	10/4	
Fumador (Sí/No)	5/9	4/14	5/9	
Cerveza (Sí/No)	3/11	3/15	5/9	
Vino (Sí/No)	3/11	7/11	4/10	
Índice Masa Corporal (Kg/m ²)	25 ± 1	26 ± 1	29 ± 1	ns
Índice Cintura-Cadera (cm/cm)	97 ± 2 ^{ab}	93 ± 2 ^b	101 ± 1 ^a	0'007
Glucemia basal (mg/dL)	89 ± 2 ^b	89 ± 2 ^b	94 ± 1 ^a	0'035
Colesterol total (mg/dL)	167 ± 7 ^c	244 ± 8 ^a	207 ± 6 ^b	<0'001
HDL colesterol (mg/dL)	57 ± 3 ^{ab}	63 ± 5 ^a	48 ± 3 ^b	0'034
LDL colesterol (mg/dL)	96 ± 7 ^c	149 ± 7 ^a	130 ± 5 ^b	<0'001
Triglicéridos (mg/dL)	72 ± 6	173 ± 48	142 ± 11	ns
Cociente aterogénico	2'99 ± 0'15 ^b	4'29 ± 0'37 ^a	4'40 ± 0'22 ^a	0'003
Urea plasma (mg/dL)	34 ± 2	36 ± 2	37 ± 2	ns
Creatinina plasma (mg/dL)	1'00 ± 0'03	0'96 ± 0'03	0'98 ± 0'04	ns
Proteína C reactiva (mg/dL)	0'32 ± 0'06	0'53 ± 0'07	0'54 ± 0'09	ns
Microalbuminuria (mg/dL)	11'7 ± 7'2	3'7 ± 0'7	7'7 ± 3'2	ns

Tabla 3.III. Características de la muestra poblacional del C. S. de Vila-real de los grupos control, hipercolesterolémico e hipercolesterolémico en tratamiento con estatinas. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística). Los datos están expresados como media ± ESM. Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas con p ≤ 0'05.

Aproximadamente un 40% del total de pacientes presentan HTA, observándose una mayor proporción de la misma en el grupo hipercolesterolémico y, sobre todo, en el tratado con estatinas. Cerca del 30% de los pacientes refirieron hábitos tabáquicos, con distribuciones similares dentro de cada grupo. El consumo de cerveza predomina en el grupo tratado con estatinas con una relación casi 1:1, mientras que el consumo de vino predomina en el grupo hipercolesterolémico. Entre los pacientes del C.S. de Onda existe un predominio de consumidores de vino y cerveza en los grupos hipercolesterolémico y tratado con estatinas; sin embargo, en Vila-real en todos los grupos es más frecuente el no consumo de ambas bebidas.

No se observan diferencias significativas entre los grupos respecto al IMC. En cuanto al índice cintura-cadera, los valores más altos corresponden al grupo tratado con estatinas siendo las diferencias significativas respecto a los otros dos grupos y atribuibles a los pacientes del C.S. de Vila-real.

Al considerar los parámetros clínicos analizados encontramos, como corresponde al tratarse del objetivo de nuestro estudio, diferencias estadísticamente significativas en los niveles de colesterol total, LDL colesterol, triglicéridos y cociente aterogénico. No se encuentran diferencias, sin embargo, en el HDL colesterol. El resto de parámetros clínicos no muestra diferencias, salvo una casual respecto a la glucemia entre los grupos control y tratado con estatinas, pero dentro del rango de normalidad, ya que se consideraba la hiperglucemia un criterio de exclusión del estudio.

3.2. METABOLISMO DE LA ARGININA

3.2.1. Niveles sanguíneos de poliaminas.

	Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
Putrescina (µM)	3'22 ± 0'22	3'15 ± 0'14	2'94 ± 0'19	ns
Espermidina (µM)	13'76 ± 1'04	12'43 ± 0'54	11'28 ± 0'61	ns
Espermina (µM)	7'85 ± 0'56	7'79 ± 0'51	7'28 ± 0'70	ns
Cociente EpmD/Espm	1'90 ± 0'14	1'75 ± 0'09	1'73 ± 0'11	ns

Tabla 3.IV. Niveles sanguíneos de poliaminas en los grupos de estudio. Los datos están expresados como media ± ESM. (ns: no significación estadística; Cociente EpmD/Espm: cociente Espermidina/Espermina).

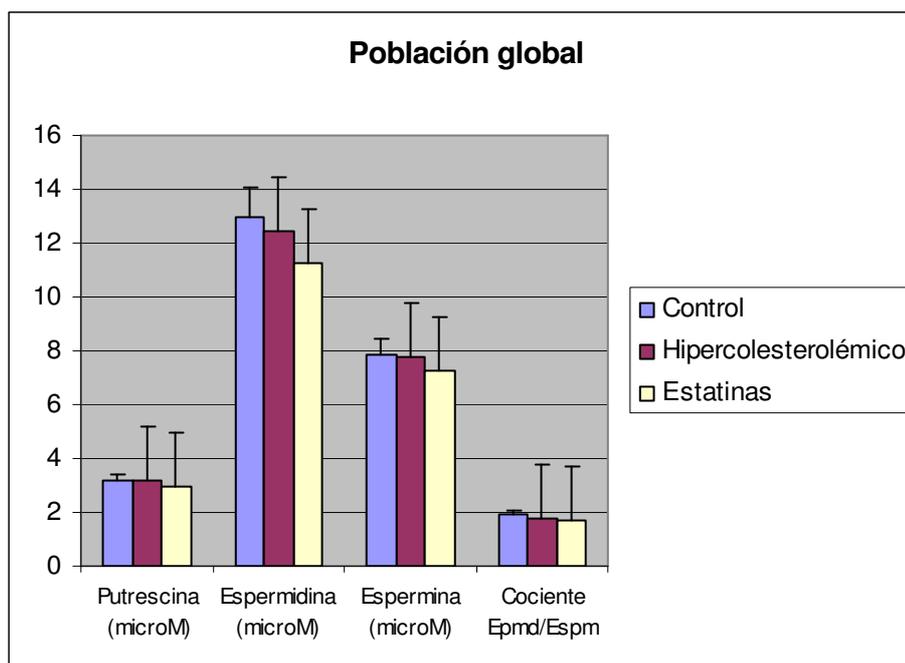


Figura 3.1. Niveles sanguíneos de poliaminas en los grupos de estudio. Los datos (μM) están expresados como media \pm ESM.

Como puede observarse en las **Tablas 3.IV-3.IX**, y de acuerdo con lo esperado, la poliamina sanguínea que se encuentra en mayor concentración, en todos los casos, es la espermidina, seguida de espermina y, finalmente, putrescina. El cociente espermidina/espermina obtenido (**Tabla 3.IV**) oscila en torno a 1.6-1.9, sin variaciones significativas ni entre los grupos ni al fraccionar por los diferentes parámetros incluidos en el estudio.

		Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
C.S.Onda	Putrescina (μM)	3'07 \pm 0'18	3'01 \pm 0'19	3'03 \pm 0'40	ns
	Espermidina (μM)	14'66 \pm 1'55	11'85 \pm 0'80	12'92 \pm 1'03	ns
	Espermina (μM)	7'16 \pm 0'62	7'02 \pm 0'43	8'26 \pm 0'96	ns
	Cociente Epmd/Espm	2'11 \pm 0'18	1'76 \pm 0'13	1'73 \pm 0'64	ns
C.S.Vila-real	Putrescina (μM)	3'37 \pm 0'42	3'31 \pm 0'22	2'89 \pm 0'21	ns
	Espermidina (μM)	12'79 \pm 1'38	13'11 \pm 0'68	10'29 \pm 0'66	ns
	Espermina (μM)	8'59 \pm 0'97	8'70 \pm 0'97	6'70 \pm 0'95	ns
	Cociente Epmd/Espm	1'67 \pm 0'19	1'73 \pm 0'14	1'73 \pm 0'13	ns

Tabla 3.V. Niveles sanguíneos de poliaminas fraccionados por los centros de salud y por los grupos de estudio. Los datos están expresados como media \pm ESM. (ns: no significación estadística; Cociente Epmd/Espm: cociente Espermidina/Espermina)

Cuando se analiza la población global (**Tabla 3.IV** y **Figura 3.1**), se observa que las tres poliaminas siguen un mismo patrón de comportamiento. Los niveles más altos de cada poliamina corresponden siempre al grupo control, seguido del hipercolesterolémico y, los niveles más bajos, al grupo tratado con estatinas. Las diferencias globales entre los tres grupos no alcanzan, en ningún caso, significación estadística en el ANOVA. Al fraccionar la población por centros de salud tampoco se observan diferencias significativas entre los tres grupos para ninguna de las poliaminas analizadas (**Tabla 3.V**). Igualmente, como se muestra en la **Tabla 3.VI**, los niveles de las tres poliaminas no muestran diferencias significativas al analizar conjuntamente (sin fraccionar por grupos experimentales) las poblaciones de los dos Centros de Salud incluidos en este estudio.

	C.S.Onda	C.S.Vila-real	t-test
Putrescina (μM)	3'03 ± 0'13	3'19 ± 0'16	ns
Espermidina (μM)	12'97 ± 0'67	12'10 ± 0'54	ns
Espermina (μM)	7'32 ± 0'34	8'01 ± 0'56	ns
Cociente Epmd/Espm	1'87 ± 0'09	1'71 ± 0'09	ns

Tabla 3.VI. Niveles sanguíneos de poliaminas fraccionados por los centros de salud. Los datos están expresados como media ± ESM. (ns: no significación estadística; Cociente Epmd/Espm: cociente Espermidina/Espermina)

Si fraccionamos los datos en función de la presencia o ausencia de hipertensión arterial observamos (**Tabla 3.VII** y **Figura 3.2**) cómo en la población hipertensa existe, para las tres poliaminas, un comportamiento similar al de la población global (niveles más altos en el grupo control, intermedios en el hipercolesterolémico y los más bajos en el grupo tratado con estatinas), pero con diferencias significativas en putrescina entre el grupo control y los otros dos grupos. La población normotensa, sin embargo, tiene un comportamiento distinto, ya que los niveles más altos de putrescina y espermina se encuentran en el grupo hipercolesterolémico, y son muy similares en los grupos control y tratado con estatinas. Estas diferencias no son significativas.

		Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
HTA	Putrescina (μM)	4'18 \pm 0'65 ^a	3'12 \pm 0'25 ^b	2'89 \pm 0'23 ^b	0'049
	Espermidina (μM)	13'26 \pm 1'41	11'99 \pm 0'89	11'21 \pm 0'78	ns
	Espermina (μM)	8'32 \pm 1'14	7'16 \pm 0'46	7'03 \pm 1'04	ns
	Cociente Epm/Espm	1'70 \pm 0'22	1'74 \pm 0'14	1'78 \pm 0'13	ns
NO HTA	Putrescina (μM)	2'94 \pm 0'18	3'17 \pm 0'18	3'01 \pm 0'34	ns
	Espermidina (μM)	13'90 \pm 1'29	12'74 \pm 0'67	11'36 \pm 1'01	ns
	Espermina (μM)	7'72 \pm 0'65	8'23 \pm 0'81	7'58 \pm 0'95	ns
	Cociente Epm/Espm	1'95 \pm 0'16	1'75 \pm 0'13	1'68 \pm 0'64	ns

Tabla 3.VII. Niveles sanguíneos de poliaminas fraccionados por la presencia de hipertensión arterial (HTA). Los datos están expresados como media \pm ESM. (ns: no significación estadística; Cociente Epm/Espm: cociente Espermidina/Espermina). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas con $p \leq 0'05$.

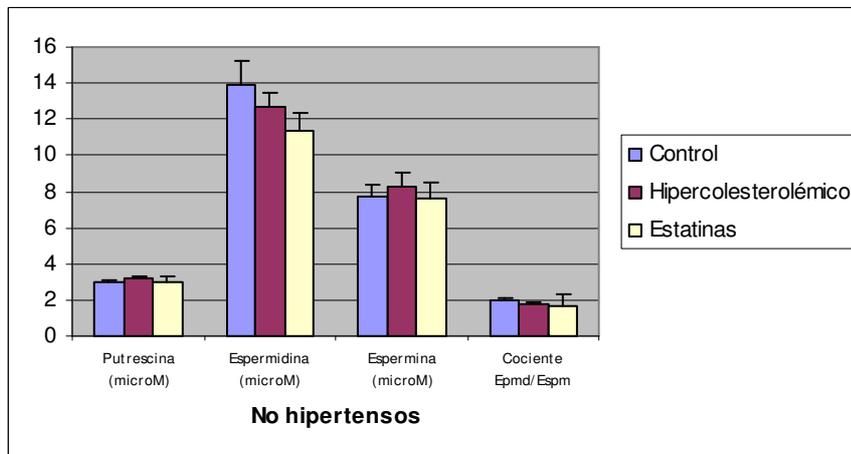
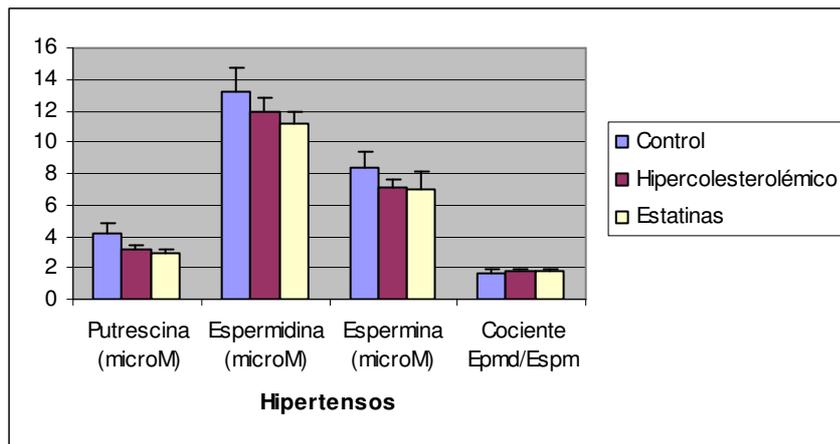


Figura 3.2. Niveles sanguíneos de poliaminas fraccionados por la presencia de hipertensión arterial (HTA). Los datos (μM) están expresados como media \pm ESM.

Al fraccionar los hipertensos por centros de salud sólo se observan diferencias significativas en Vila-real (Tabla 3.VIII y Figura 3.3), y afectan tanto a la putrescina como a la espermidina.

	Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
Putrescina (µM)	6'21 ± 0'22 ^a	4'14 ± 0'40 ^b	3'07 ± 0'27 ^b	0'001
Espermidina (µM)	17'63 ± 0'30 ^{ab}	12'94 ± 0'51 ^{bc}	10'80 ± 0'90 ^c	0'013
Espermina (µM)	11'09 ± 1'61	7'64 ± 1'44	6'75 ± 1'35	ns
Cociente Epmd/Espm	1'63 ± 0'26	1'81 ± 0'31	1'84 ± 0'16	ns

Tabla 3.VIII. Niveles sanguíneos de poliaminas en la población hipertensa de Vila-real. Los datos están expresados como media ± ESM. (ns: no significación estadística; Cociente Epmd/Espm: cociente Espermidina/Espermina). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas con $p \leq 0'05$.

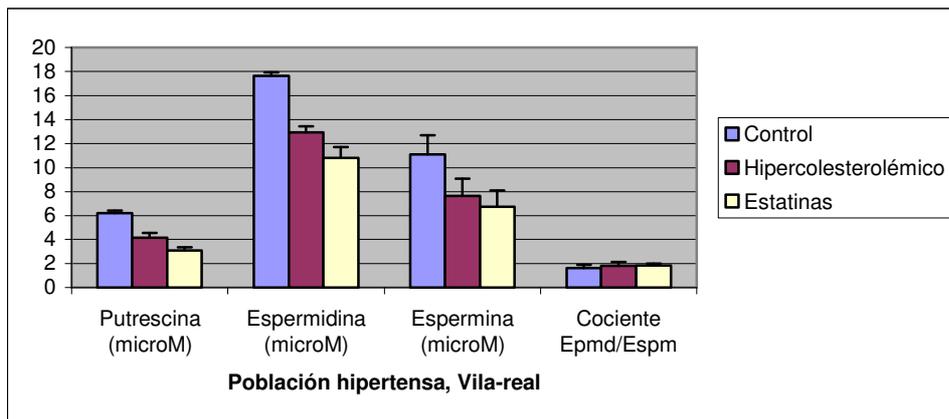


Figura 3.3. Niveles sanguíneos de poliaminas en la población hipertensa de Vila-real. Los datos (µM) están expresados como media ± ESM.

Al fraccionar la población global por sexos, se observa (Tabla 3.IX) que existen diferencias significativas en los niveles de putrescina entre hombres y mujeres, con mayores niveles en hombres. Esta diferencia no se observa cuando se fracciona la población global por grupos, centros o presencia de hipertensión arterial.

	Putrescina(µM)	Espermidina(µM)	Espermina(µM)	Cociente Epmd/Espm
Hombres	3'38 ± 0'17	12'77 ± 0'62	7'62 ± 0'41	1'80 ± 0'09
Mujeres	2'86 ± 0'11	12'29 ± 0'60	7'73 ± 0'52	1'77 ± 0'09
t-test	p=0'013	ns	ns	ns

Tabla 3.IX. Niveles sanguíneos de poliaminas de la población global, distribuida por sexos. Los datos están expresados como media ± ESM. (ns: no significación estadística; Cociente Epmd/Espm: cociente Espermidina/Espermina)

Tampoco se aprecian diferencias en los niveles de ninguna de las tres poliaminas cuando se fracciona la población en función del consumo de tabaco, vino o cerveza, ni tampoco cuando se consideran los distintos tipos de estatinas, fármacos antihipertensivos u otros fármacos habituales de los pacientes.

3.2.2. Niveles plasmáticos de Arginina y sus derivados metilados.

Como puede observarse en la **Tabla 3.X** y en la **Figura 3.4**, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio respecto a los niveles plasmáticos de arginina y/o sus derivados metilados. Los niveles de arginina, ADMA y SDMA oscilan ligeramente siguiendo un mismo patrón de comportamiento caracterizado por un descenso de los niveles en el grupo hipercolesterolémico y su total restauración en el grupo tratado con estatinas, ambos referidos al grupo control. A diferencia de lo indicado anteriormente, los niveles más altos de L-NMMA se observan en el grupo hipercolesterolémico y los más bajos en el grupo tratado con estatinas.

	Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
Arginina (μM)	92 \pm 4	89 \pm 4	91 \pm 4	ns
ADMA (μM)	0'43 \pm 0'03	0'34 \pm 0'03	0'45 \pm 0'05	ns*
SDMA (μM)	0'34 \pm 0'04	0'29 \pm 0'03	0'35 \pm 0'05	ns
L-NMMA (μM)	1'05 \pm 0'10	1'10 \pm 0'08	0'83 \pm 0'09	ns
Cociente Arg/ADMA	273 \pm 38	370 \pm 42	310 \pm 67	ns

Tabla 3.X. Niveles plasmáticos de arginina y sus derivados metilados en los grupos de estudio. Los datos están expresados como media \pm ESM. (ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica; L-NMMA: L-N^G-monometil arginina; ns: no significación estadística; (*) p=0'07).

En lo que respecta al nivel de arginina plasmática, no hay diferencias entre los grupos de estudio cuando se desglosa la población global en función del Centro de Salud, presencia de hipertensión arterial, sexo o consumo de tabaco o alcohol. Tampoco se observan diferencias significativas cuando la población global se desglosa en función de estos mismos factores.

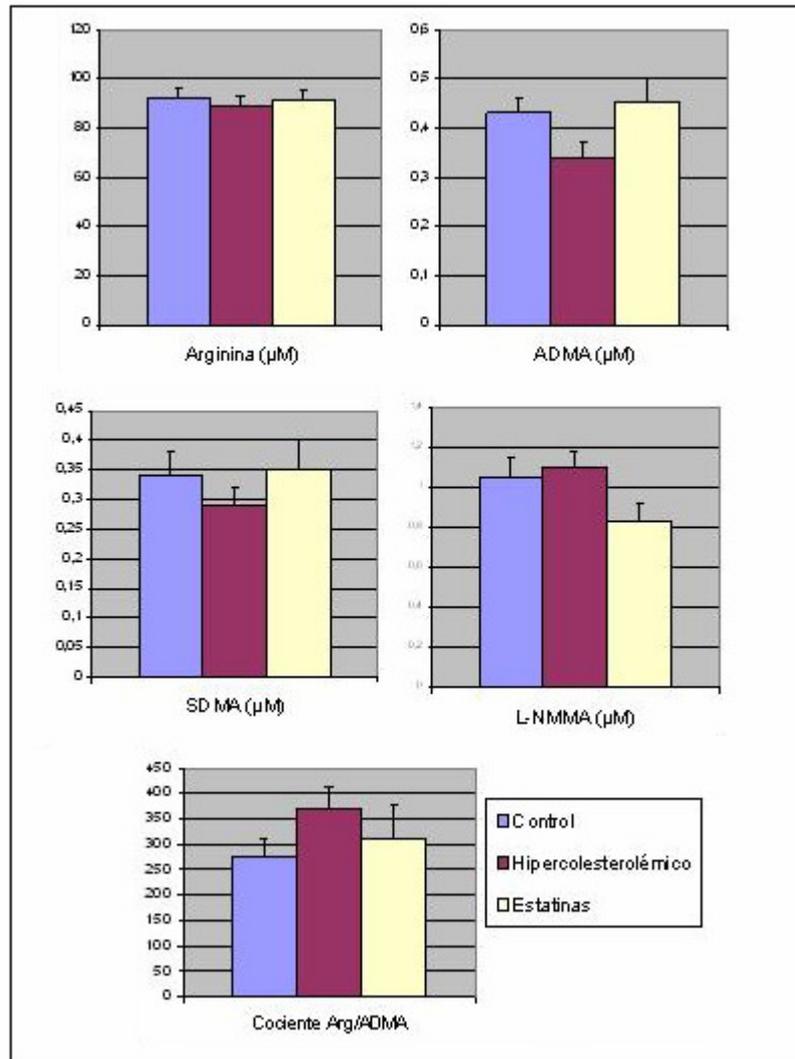


Figura 3.4. Niveles plasmáticos de arginina y sus derivados metilados en los grupos de estudio. Los datos están expresados como media \pm ESM. (ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica; L-NMMA: L-N^G-monometil arginina).

Las niveles de la forma dimetilada y asimétrica de la arginina, ADMA, tampoco difieren significativamente entre los diferentes grupos de estudio cuando se fracciona la población en función del Centro de Salud, presencia de hipertensión arterial, sexo o consumo de tabaco o alcohol. Sin embargo, cuando la población global se desglosa en función del sexo, se observa (**Tabla 3.XI**) cómo los hombres muestran mayores niveles de ADMA plasmática que las mujeres ($P=0'003$). En cambio no existen diferencias cuando se desglosa esta población global en función de la presencia de HTA, consumo de tabaco, vino o cerveza, o Centro de Salud de procedencia.

		ADMA plasmática (µM)	t-test
Sexo	Hombres	0'46 ± 0'03	p=0'003
	Mujeres	0'33 ± 0'03	
HTA	Sí	0'38 ± 0'03	ns
	No	0'41 ± 0'03	
Tabaco	Sí	0'44 ± 0'05	ns
	No	0'38 ± 0'02	
Cerveza	Sí	0'43 ± 0'04	ns
	No	0'38 ± 0'03	
Vino	Sí	0'42 ± 0'03	ns
	No	0'38 ± 0'03	
Centro Salud	Onda	0'39 ± 0'04	ns
	Vila-real	0'41 ± 0'03	

Tabla 3.XI. Niveles de ADMA (Dimetilarginina asimétrica) plasmáticos de la población global fraccionada en función del sexo, presencia de HTA, consumo de tabaco, alcohol o Centro de Salud. Los datos están expresados como media ± ESM.(HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística)

Como ya se ha indicado previamente, el comportamiento de la SDMA, dentro de los grupos de estudio, es el mismo que el de la arginina y su análoga asimétrica ADMA (Tabla 3.X y Figura 3.4), sin diferencias significativas entre los grupos. En el mismo sentido, tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos control, hipercolesterolémico e hipercolesterolémico tratado con estatinas cuando se fracciona la población global en función del Centro de Salud, sexo o consumo de tabaco o alcohol. Sin embargo, cuando se utiliza como variable de fraccionamiento la presencia o ausencia de hipertensión arterial se observa (**Tabla 3.XII y Figura 3.5**) el distinto comportamiento de estos dos grupos poblacionales. En los hipertensos, los niveles más altos de SDMA corresponden al grupo control, y son significativamente distintos de los dos grupos hipercolesterolémicos, independientemente del tratamiento o no con estatinas. En la población normotensa, por el contrario, es el grupo tratado con estatinas el que presenta los niveles más altos, con diferencias significativas respecto a los otros dos grupos de nuestro estudio.

	Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
Hipertensos	0'54 ± 0'11 ^a	0'31 ± 0'06 ^b	0'25 ± 0'05 ^b	p=0'045
Normotensos	0'29 ± 0'03 ^b	0'28 ± 0'04 ^b	0'45 ± 0'08 ^a	p=0'048

Tabla 3.XII. Niveles de SDMA (Dimetilarginina simétrica) plasmáticos en los grupos de estudio fraccionados por la presencia de hipertensión arterial. Los datos están expresados como media ± ESM. Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas con $p \leq 0'05$.

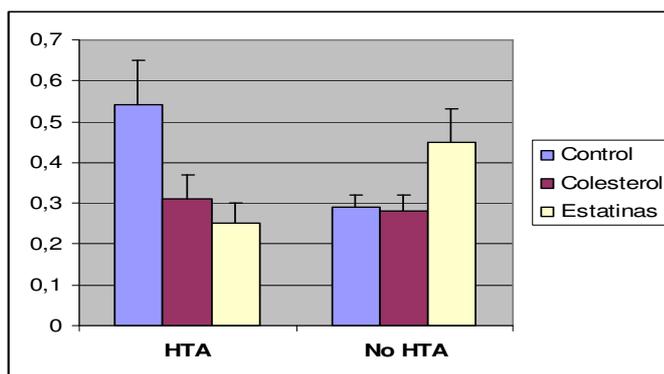


Figura 3.5. Niveles de SDMA (Dimetilarginina simétrica) plasmáticos en los grupos de estudio fraccionados por la presencia de hipertensión arterial. Los datos (μM) están expresados como media ± ESM.

El fraccionamiento de la población global en función de las diferentes variables de nuestro estudio muestra cómo los niveles de SDMA son mayores en el grupo de no fumadores que en el de fumadores ($p=0'014$), y en los pacientes procedentes del Centro de Salud de Onda ($p=0'024$) (**Tabla 3.XIII**).

Como ya se indicó previamente (Tabla 3.X y Figura 3.4), los niveles más altos de L-NMMA se observan en el grupo hipercolesterolémico y los más bajos en el grupo tratado con estatinas, sin alcanzar las diferencias entre ellos significación estadística. Este mismo comportamiento entre los grupos de estudio se observa al desglosar la población global en función del Centro de Salud, presencia de hipertensión arterial, sexo o consumo de tabaco o alcohol. Sin embargo, el análisis de la población global (sin fraccionar por grupos de estudio; **Tabla 3.XIV**) muestra niveles significativamente más altos de L-NMMA en la población que refiere consumo de alcohol ($p \leq 0'011$) y en la procedente del C.S. de Onda ($p < 0'001$).

		SDMA plasmática (µM)	t-test
Sexo	Hombres	0'34 ± 0'03	ns
	Mujeres	0'32 ± 0'04	
HTA	Sí	0'32 ± 0'03	ns
	No	0'31 ± 0'03	
Tabaco	Sí	0'24 ± 0'03	p=0'014
	No	0'35 ± 0'03	
Cerveza	Sí	0'35 ± 0'04	ns
	No	0'30 ± 0'02	
Vino	Sí	0'35 ± 0'03	ns
	No	0'29 ± 0'03	
Centro Salud	Onda	0'37 ± 0'04	p=0'024
	Vila-real	0'27 ± 0'02	

Tabla 3.XIII. Niveles de SDMA (Dimetilarginina simétrica) plasmáticos en función del sexo, presencia de HTA, consumo de tabaco, alcohol o Centro de Salud. Los datos están expresados como media ± ESM. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística)

		L-NMMA plasmática (µM)	t-test
Sexo	Hombres	1'07 ± 0'08	ns
	Mujeres	0'95 ± 0'06	
HTA	Sí	1'00 ± 0'08	ns
	No	1'02 ± 0'07	
Tabaco	Sí	1'04 ± 0'10	ns
	No	1'01 ± 0'06	
Cerveza	Sí	1'18 ± 0'09	p=0'010
	No	0'91 ± 0'06	
Vino	Sí	1'16 ± 0'08	p=0'011
	No	0'90 ± 0'06	
Centro Salud	Onda	1'20 ± 0'07	p<0'001
	Vila-real	0'83 ± 0'06	

Tabla 3.XIV. Niveles de L-NMMA (L-N^G-monometil arginina) plasmática de la población global fraccionada en función del sexo, presencia de HTA, consumo de tabaco o alcohol o Centro de Salud. Los datos están expresados como media ± ESM. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística)

Respecto al cociente arginina/ADMA, y de acuerdo con el comportamiento reseñado previamente para los niveles de arginina y ADMA en los diferentes grupos experimentales, alcanza su valor máximo en el grupo hipercolesterolémico y el mínimo

en el grupo control. No hay diferencias dentro de los grupos de estudio cuando se analiza la población global, ni cuando ésta se desglosa en función del Centro de Salud, presencia de hipertensión arterial, sexo o consumo de tabaco o alcohol. Sin embargo, tal y como se muestra en la **Tabla 3.XV**, el cociente arginina/ADMA es significativamente más alto en mujeres que en hombres ($p=0'05$) cuando se analiza globalmente toda la población de estudio, sin atender a su fraccionamiento por grupos experimentales.

		Cociente arginina/ADMA	t-test
Sexo	Hombres	271 ± 33	p=0'050
	Mujeres	379 ± 44	
HTA	Sí	353 ± 48	ns
	No	306 ± 34	
Tabaco	Sí	319 ± 62	ns
	No	327 ± 31	
Cerveza	Sí	336 ± 59	ns
	No	318 ± 27	
Vino	Sí	331 ± 52	ns
	No	320 ± 29	
Centro Salud	Onda	360 ± 50	ns
	Vila-real	290 ± 26	

Tabla 3.XV. Cociente arginina/ADMA de la población global fraccionada en función del sexo, presencia de HTA, consumo de tabaco o alcohol o Centro de Salud. Los datos están expresados como media ± ESM. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística)

3.2.3. Niveles de nitrato en plasma y orina.

	Nitrato en plasma (µM)	Nitrito en plasma (µM)	Cociente nitrito/nitrato en plasma (%)	Nitrato en orina (µmol/mmol creatinina)
Control	31'55 ± 1'71	1'97 ± 0'14	6'96 ± 0'56	97'20 ± 6'20
Hipercolesterolémico	35'33 ± 2'73	1'80 ± 0'11	6'50 ± 0'58	102'81 ± 8'40
Estatinas	36'53 ± 3'52	1'73 ± 0'14	5'88 ± 0'64	101'67 ± 10'27
ANOVA	ns	ns	ns	ns

Tabla 3.XVI. Niveles de nitrato en plasma y orina en los grupos de estudio. Los datos están expresados como media ± ESM. (ns: no significación estadística).

La **Tabla 3.XVI** resume los resultados obtenidos en las determinaciones de nitrato y nitrito en los diferentes grupos de nuestro estudio y, como puede observarse, no existen diferencias significativas en ninguno de estos parámetros en relación a la presencia de hipercolesterolemia o al tratamiento con estatinas. Respecto al nitrato, los niveles más bajos, tanto en plasma como en orina, se observan en el grupo control, siendo muy similares en los otros dos grupos (**Figura 3.6**), con una correlación excelente entre los niveles plasmáticos y urinarios ($r=0.767$; $p<0.001$; para la población global). Por el contrario, los niveles de nitrito son máximos en el grupo control y mínimos en el grupo tratado con estatinas. En cualquier caso, y tal y como cabía esperar, los niveles plasmáticos de nitrito son muy inferiores a los de nitrato, no representando el nitrito más allá del 7% de la suma de nitrato y nitrito en plasma (Tabla 3.XVI).

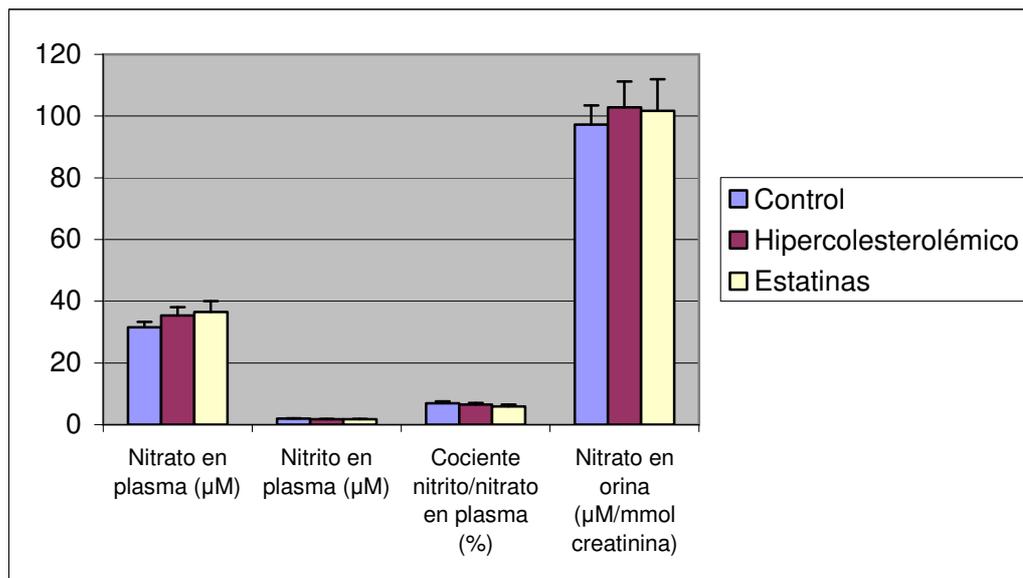


Figura 3.6. Niveles de nitrato en plasma y orina en los grupos de estudio. Los datos (μM en plasma y $\mu\text{M}/\mu\text{mol}$ de creatinina en orina) están expresados como media \pm ESM.

No se observan diferencias entre los grupos de estudio, respecto a los niveles de ninguno de estos parámetros, cuando se desglosa la población global en función del Centro de Salud, número de determinación, presencia de hipertensión arterial, sexo o consumo de tabaco o alcohol.

Sin embargo, cuando la población global (sin fraccionar por grupos de estudio) se desglosa en función de los mismos parámetros, se observan diferencias significativas en el nitrato plasmático atendiendo a la presencia o no de hipertensión arterial ($p=0'003$), con niveles más altos en hipertensos. Para el nitrato urinario se observan niveles significativamente más altos en la primera determinación respecto a la segunda ($p=0'05$), y en mujeres respecto a hombres ($p=0'006$), tal y como se muestra en la **Tabla 3.XVII**. Los niveles plasmáticos de nitrito y los del cociente nitrito/nitrato no difieren significativamente al fraccionar la población global en función de ninguna de las variables analizadas (datos no incluidos en la tabla).

		Nitrato plasma (μM)	t-test	Nitrato orina ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina)	t-test
Determinación	Primera	36'9 \pm 2'7	ns	109'9 \pm 8'3	p=0'050
	Segunda	32'0 \pm 1'7		91'0 \pm 4'8	
Sexo	Masculino	33'61 \pm 2'37	ns	87'53 \pm 6'80	p=0'006
	Femenino	35'59 \pm 2'22		114'78 \pm 6'97	
HTA	Sí	40'53 \pm 3'59	p=0'003	111'42 \pm 10'38	ns
	No	30'86 \pm 1'22		94'43 \pm 4'73	
Tabaco	Sí	38'70 \pm 3'22	ns	101'96 \pm 5'17	ns
	No	33'15 \pm 1'88		100'70 \pm 6'60	
Cerveza	Sí	32'50 \pm 2'89	ns	89'43 \pm 8'27	ns
	No	36'06 \pm 1'92		108'64 \pm 6'16	
Vino	Sí	33'46 \pm 2'60	ns	92'40 \pm 7'78	ns
	No	35'64 \pm 2'06		108'22 \pm 6'41	
Centro Salud	Onda	32'12 \pm 2'35	ns	97'44 \pm 8'07	ns
	Vila-real	37'12 \pm 2'21		104'52 \pm 5'71	

Tabla 3.XVII. Niveles de nitrato en plasma y orina en función del número de determinación, sexo, presencia de HTA, consumo de alcohol o Centro de Salud. Los datos están expresados como media \pm ESM. (ns: no significación estadística).

3.3. PARÁMETROS DE DAÑO OXIDATIVO

3.3.1. Niveles de grupos sulfhidriilo (SH) plasmáticos.

Como se puede observar en la **Tabla 3.XVIII** y en la **Figura 3.7**, los niveles plasmáticos de grupos SH no difieren significativamente entre los tres grupos de nuestro estudio. Destacar, sin embargo, que en los grupos control y tratado con estatinas los niveles son similares y cuantitativamente más altos que los que se observan en el grupo hipercolesterolémico, no alcanzando las diferencias significación estadística.

	Grupos SH totales (μM)
Grupo Control	311 \pm 9
Grupo Hipercolesterolémico	299 \pm 7
Grupo tratado con estatinas	312 \pm 9
ANOVA	ns

Tabla 3.XVIII. Niveles de grupos sulfhidriilo plasmáticos por grupos de estudio. Los datos están expresados como media \pm ESM. (ns: no significación estadística).

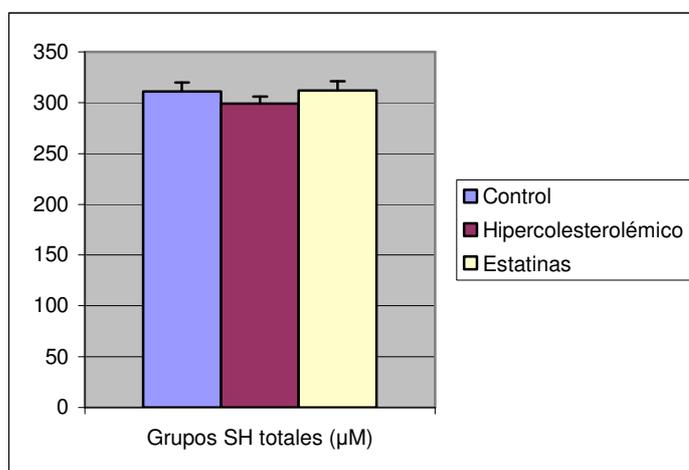


Figura 3.7. Niveles plasmáticos de grupos sulfhidriilo en función de los grupos de estudio. Los datos (μM) están expresados como media \pm ESM.

Resultados muy similares se observan al comparar los niveles de grupos SH entre los tres grupos experimentales, tras fraccionar la población global en función del Centro de Salud de procedencia, número de determinación, sexo, presencia de HTA o consumo de tabaco o alcohol (**Tabla 3.XIX**). En general, los niveles más bajos corresponden al grupo hipercolesterolémico, y son más altos en los otros dos grupos

(control y estatinas). Sin embargo, al igual que ocurría con la población global, las diferencias no alcanzan, en ningún caso, significación estadística.

Al analizar los cambios en los niveles plasmáticos de grupos SH de la población global (sin fraccionar por grupos de estudio) en función de ciertas variables, se observa (**Tabla 3.XX**) cómo los valores son significativamente más altos en la segunda determinación ($p < 0'001$), pacientes normotensos ($p = 0'009$), fumadores ($p = 0'006$), y en consumidores de cerveza ($p = 0'043$) o vino ($p = 0'013$). Igualmente, los niveles de grupos SH en plasma de los pacientes procedentes del Centro de Salud de Onda son sensiblemente más altos que los de los pacientes de Vila-real, rozando las diferencias el límite de significación estadística ($p = 0'056$).

		Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
Centro Salud	Onda	313 ± 11	305 ± 10	340 ± 11	ns
	Vila-real	309 ± 13	291 ± 11	292 ± 12	ns
Determinación	Primera	289 ± 10	274 ± 9	282 ± 11	ns
	Segunda	339 ± 12	324 ± 10	341 ± 12	ns
Sexo	Varones	298 ± 15	307 ± 11	322 ± 11	ns
	Mujeres	321 ± 10	290 ± 9	298 ± 15	ns
HTA	Hipertensos	285 ± 17	289 ± 10	295 ± 12	ns
	Normotensos	318 ± 10	305 ± 10	334 ± 12	ns
Tabaco	Sí	337 ± 11	328 ± 12	312 ± 19	ns
	No	300 ± 11	288 ± 9	313 ± 10	ns
Cerveza	Sí	300 ± 23	318 ± 13	328 ± 12	ns
	No	314 ± 9	283 ± 8	299 ± 13	ns
Vino	Sí	320 ± 21	311 ± 10	336 ± 12	ns
	No	307 ± 9	282 ± 10	295 ± 12	ns

Tabla 3.XIX. Niveles de grupos sulfhidrilo plasmáticos en los grupos de estudio. Comparación por Centros de Salud, número de determinación, sexo, presencia de hipertensión arterial (HTA) o consumo de tabaco o alcohol. Los datos están expresados como media ± ESM. (ns: no significación estadística).

		Grupos SH totales (µM)	t-test
Determinación	Primera	281 ± 6	p<0'001
	Segunda	333 ± 6	
Sexo	Varones	310 ± 7	ns
	Mujeres	302 ± 6	
HTA	Sí	291 ± 7	p=0'009
	No	315 ± 6	
Tabaco	Sí	326 ± 8	p=0'006
	No	298 ± 6	
Cerveza	Sí	318 ± 8	p=0'043
	No	298 ± 6	
Vino	Sí	319 ± 7	p=0'013
	No	295 ± 6	
Centro Salud	Onda	315 ± 6	p=0'056
	Vila-real	296 ± 7	

Tabla 3.XX. Niveles de grupos sulfhidrilo plasmáticos de la población global en función del número de determinación, presencia de HTA, consumo de tabaco o alcohol y Centro de Salud. Los datos están expresados como media ± ESM. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística).

3.3.2. Niveles plasmáticos de grupos carbonilo proteicos.

La **Tabla 3.XXI** y la **Figura 3.8** resumen los resultados obtenidos en la determinación de los niveles plasmáticos de grupos carbonilo proteicos en los tres grupos de nuestro estudio. Como puede observarse, los dos grupos hipercolesterolémicos presentan niveles muy similares y significativamente elevados respecto al grupo de pacientes control. Idéntico resultado se obtiene al comparar los niveles de grupos carbonilo de los tres grupos de estudio, tras fraccionar la población global en función del Centro de Salud de procedencia de los pacientes, número de determinación, HTA, sexo o consumo de tabaco o alcohol (**Tabla 3.XXII**). En todos los casos, los valores más altos corresponden a los grupos hipercolesterolémicos (sin diferencias atribuibles al tratamiento con estatinas) y son significativamente menores en el grupo control.

No se observan diferencias significativas en los niveles plasmáticos de grupos carbonilo de la población global (sin fraccionar por grupos de estudio) en función del

número de determinación, sexo, HTA o consumo de alcohol (Tabla 3.XXIII). Sin embargo, los niveles son significativamente más altos en el grupo de fumadores ($p=0'021$) y en los pacientes procedentes del Centro de Salud de Onda ($p=0'038$).

	Grupos carbonilo proteicos (μM)
Grupo Control	48'3 \pm 3'0 ^b
Grupo Hipercolesterolémico	72'5 \pm 4'4 ^a
Grupo tratado con estatinas	71'6 \pm 4'1 ^a
ANOVA	$p<0'001$

Tabla 3.XXI. Niveles de grupos carbonilo en proteínas plasmáticas por grupos de estudio dentro de la población global. Los datos están expresados como media \pm ESM. Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas con $p\leq 0'05$.

		Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
Centro Salud	Onda	52'6 \pm 4'1 ^b	76'7 \pm 3'6 ^a	81'7 \pm 7'0 ^a	$p<0'001$
	Vila-real	43'5 \pm 4'4 ^b	67'3 \pm 8'7 ^a	64'8 \pm 4'7 ^a	$p=0'05$
Determinación	Primera	46'5 \pm 4'2 ^b	74'0 \pm 7'5 ^a	68'0 \pm 6'6 ^a	$p=0'012$
	Segunda	50'8 \pm 4'4 ^b	70'9 \pm 4'4 ^a	75'0 \pm 5'1 ^a	$p=0'003$
Sexo	Varones	46'1 \pm 5'1 ^b	74'0 \pm 7'8 ^a	70'3 \pm 5'2 ^a	$p=0'023$
	Mujeres	50'0 \pm 3'8 ^b	71'1 \pm 4'1 ^a	73'5 \pm 6'8 ^a	$p=0'001$
HTA	Hipertensos	52'6 \pm 5'5 ^b	75'2 \pm 4'8 ^a	68'3 \pm 4'9 ^a	$p=0'04$
	Normotensos	47'1 \pm 3'6 ^b	70'4 \pm 6'7 ^a	75'7 \pm 7'0 ^a	$p=0'004$
Tabaco	Sí	48,9 \pm 4'1 ^b	88'1 \pm 9'6 ^a	80'3 \pm 8'3 ^a	$p=0'033$
	No	48'1 \pm 3'9 ^b	66'8 \pm 3'9 ^a	67'9 \pm 4'6 ^a	$p=0'002$
Cerveza	Sí	40'6 \pm 8'1 ^b	80'4 \pm 8'2 ^a	70'9 \pm 5'4 ^a	$p=0'018$
	No	50'6 \pm 3'1 ^b	65'6 \pm 4'2 ^a	72'2 \pm 6'2 ^a	$p=0'003$
Vino	Sí	40'1 \pm 5'0 ^b	73'6 \pm 7'0 ^a	68'8 \pm 4'7 ^a	$p=0'021$
	No	51'3 \pm 3'6 ^b	70'6 \pm 4'7 ^a	73'9 \pm 6'4 ^a	$p=0'002$

Tabla 3.XXII. Niveles de grupos carbonilo en proteínas plasmáticas en los grupos de estudio. Comparación por Centros de Salud, número de determinación, sexo, presencia de hipertensión arterial (HTA) o consumo de tabaco o alcohol. Los datos están expresados como media \pm ESM. Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas con $p\leq 0'05$.

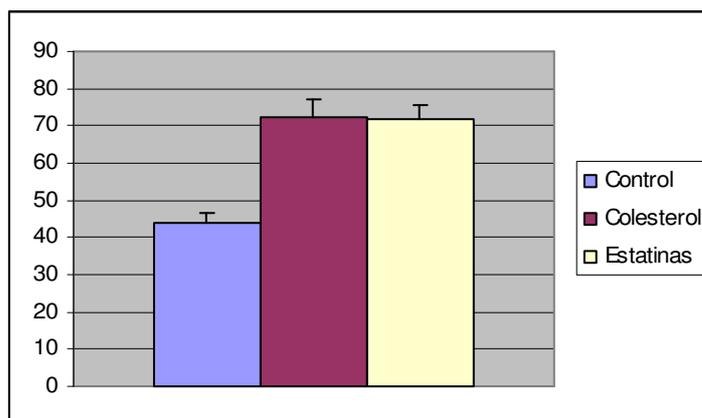


Figura 3.8. Niveles plasmáticos de grupos carbonilo proteicos en función de los grupos de estudio. Los datos (μM) están expresados como media \pm ESM.

		Grupos carbonilo proteicos (μM)	t-test
Determinación	Primera	64'0 \pm 4'1	ns
	Segunda	67'0 \pm 2'9	
Sexo	Varones	66'2 \pm 4'2	ns
	Mujeres	64'7 \pm 2'9	
HTA	Sí	68'9 \pm 3'1	ns
	No	63'0 \pm 3'7	
Tabaco	Sí	74,9 \pm 6'4	p=0'021
	No	61'8 \pm 2'5	
Cerveza	Sí	70'9 \pm 5'0	ns
	No	61'7 \pm 2'6	
Vino	Sí	66'7 \pm 4'4	ns
	No	64'2 \pm 2'9	
Centro Salud	Onda	70'7 \pm 2'9	p=0'038
	Vila-real	60'1 \pm 4'4	

Tabla 3.XXIII. Niveles de grupos carbonilo plasmáticos de la población global en función del número de determinación, sexo, presencia de HTA, consumo de tabaco o alcohol y Centro de Salud. Los datos están expresados como media \pm ESM. (ns: no significación estadística).

3.3.3. Niveles de hidroperóxidos lipídicos en plasma.

La **Tabla 3.XXIV** y la **Figura 3.9** resumen los resultados de las determinaciones de hidroperóxidos lipídicos en plasma en los grupos control, hipercolesterolémico e hipercolesterolémico tratado con estatinas. Como puede observarse, las diferencias entre grupos respecto a este parámetro de daño oxidativo a lípidos son mínimas y carecen, en todo caso, de significación estadística.

	Hidroperóxidos lipídicos (μM)
Grupo Control	9'44 \pm 0'37
Grupo Hipercolesterolémico	9'41 \pm 0'30
Grupo tratado con estatinas	9'26 \pm 0'29
ANOVA	ns

Tabla 3.XXIV. Niveles de hidroperóxidos lipídicos plasmáticos por grupos de estudio. Los datos están expresados como media \pm ESM. (ns: no significación estadística).

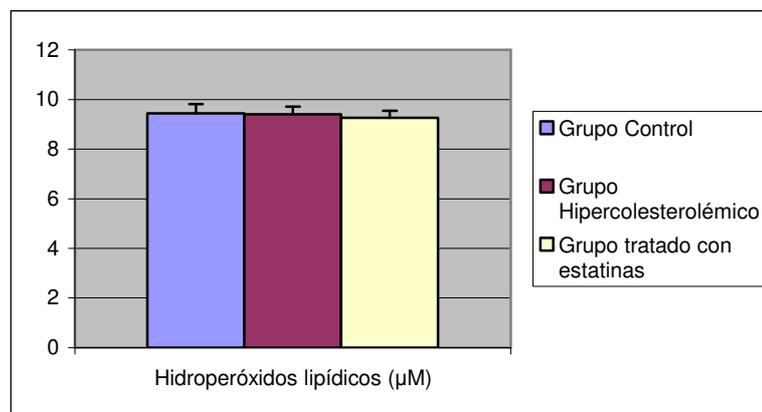


Figura 3.9. Niveles plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos en función de los grupos de estudio. Los datos están expresados como media \pm ESM.

Un comportamiento similar, sin diferencias claras y sistemáticas entre los grupos de estudio, se observa al realizar el análisis fraccionando la población global en función de diferentes variables (**Tabla 3.XXV**).

Sin embargo, el análisis de los niveles de hidroperóxidos lipídicos en plasma de la población global (sin fraccionar por grupos de estudio) en función de ciertas variables muestra (**Tabla 3.XXVI**) cómo los niveles de hidroperóxidos lipídicos son significativamente más altos en la primera determinación que en la segunda ($p=0'002$), en mujeres que en hombres ($p<0'001$), y en los no consumidores de cerveza ($p=0'015$) o vino ($p<0'001$) respecto a los consumidores. Las diferencias no son significativas al fraccionar por la presencia de HTA, consumo de tabaco o Centro de Salud.

		Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	ANOVA
Centro Salud	C.S.Onda	10'16 ± 0'50	9'06 ± 0'40	8'52 ± 0'47	ns
	C.S.Vila-real	8'62 ± 0'49	9'83 ± 0'44	9'76 ± 0'35	ns
Determinación	Primera	9'78 ± 0'53	10'13 ± 0'46	9'67 ± 0'42	ns
	Segunda	8'97 ± 0'47	8'65 ± 0'35	8'86 ± 0'39	ns
Sexo	Varones	9'32 ± 0'52	8'06 ± 0'33	9'01 ± 0'30	ns
	Mujeres	9'52 ± 0'52	10'75 ± 0'39	9'62 ± 0'58	ns
HTA	Hipertensos	10'66 ± 0'73	9'63 ± 0'43	9'53 ± 0'39	ns
	Normotensos	9'08 ± 0'41	9'36 ± 0'40	8'91 ± 0'44	ns
Tabaco	Si	8'46 ± 0'84	9'32 ± 0'51	9'84 ± 0'47	ns
	No	9'79 ± 0'39	9'52 ± 0'36	9'01 ± 0'36	ns
Cerveza	Sí	10'31 ± 0'69	8'56 ± 0'41	8'59 ± 0'39	ns
	No	9'18 ± 0'42	10'23 ± 0'39	9'84 ± 0'40	ns
Vino	Sí	9'82 ± 0'68	8'48 ± 0'31	8'48 ± 0'39	ns
	No	9'30 ± 0'44	10'79 ± 0'47	9'88 ± 0'38	ns

Tabla 3.XXV. Niveles de hidroperóxidos lipídicos plasmáticos en los grupos de estudio. Comparación por Centros de Salud, número de determinación, sexo, presencia de hipertensión arterial (HTA) o consumo de tabaco o alcohol. Los datos están expresados como media ± ESM. (ns: no significación estadística).

		Hidroperóxidos lipídicos (µM)	t-test
Determinación	Primera	9'91 ± 0'28	p=0'002
	Segunda	8'79 ± 0'23	
Sexo	Masculino	8'66 ± 0'22	p<0'001
	Femenino	10'10 ± 0'28	
HTA	Sí	9'76 ± 0'27	ns
	No	9'17 ± 0'24	
Tabaco	Sí	9'24 ± 0'35	ns
	No	9'46 ± 0'22	
Cerveza	Sí	8'85 ± 0'28	p=0'015
	No	9'76 ± 0'24	
Vino	Sí	8'70 ± 0'24	p<0'001
	No	9'97 ± 0'26	
Centro Salud	Onda	9'27 ± 0'27	ns
	Vila-real	9'48 ± 0'25	

Tabla 3.XXVI. Niveles de hidroperóxidos lipídicos de la población global fraccionada en función del número de determinación, sexo, presencia de HTA, consumo de tabaco o alcohol o Centro de Salud. Los datos están expresados como media ± ESM. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística).

3.3.4. Material reactivo con ácido tiobarbitúrico (TBARM) en plasma y orina.

La **Tabla 3.XXVII** y la **Figura 3.10** resumen los niveles de material reactivo con ácido tiobarbitúrico (TBARM) en plasma y orina de los diferentes grupos experimentales de nuestro estudio. Como puede observarse en ellas, las diferencias entre los grupos son muy pequeñas y no alcanzan, en ningún caso, significación estadística. Cualitativamente, sin embargo, se aprecia una ligera tendencia a la elevación de los niveles de TBARM tanto en plasma como en orina (cuando se expresa en forma absoluta, no en relación a la creatinina urinaria) en el grupo hipercolesterolémico respecto al control o al tratado con estatinas. Indicar que no hemos observado en nuestro estudio correlación entre los niveles plasmáticos y urinarios de este parámetro.

	TBARM en plasma (μM)	TBARM en orina ($\mu\text{moles/mmol creatinina}$)	TBARM en orina (μM)
Control	41'0 \pm 1'0	0'45 \pm 0'03	5'08 \pm 0'35
Hipercolesterolémico	42'4 \pm 0'8	0'45 \pm 0'02	5'59 \pm 0'39
Estatinas	41'0 \pm 1'0	0'39 \pm 0'02	4'79 \pm 0'38
ANOVA	ns	ns	ns

Tabla 3.XXVII. Niveles del material reactivo con ácido tiobarbitúrico (TBARM) en plasma y orina de los grupos de estudio. Los datos están expresados como media \pm ESM. (ns: no significación estadística).

Tampoco se observan diferencias entre los grupos de estudio, respecto a los niveles plasmáticos o urinarios de TBARM, cuando se desglosa la población global en función del Centro de Salud, número de determinación, sexo, HTA o consumo de tabaco o alcohol (resultados no mostrados).

Sin embargo, sí se observan diferencias estadísticamente significativas cuando de forma global (sin fraccionar por grupos de estudio) se desglosa la población atendiendo a las variables reseñadas (**Tabla 3.XXVIII**). Comentar que, en todos los casos, las variaciones de los niveles se aprecian paralelamente en plasma y orina, aunque las diferencias, en ocasiones, sólo son estadísticamente significativas en uno u otro fluido.

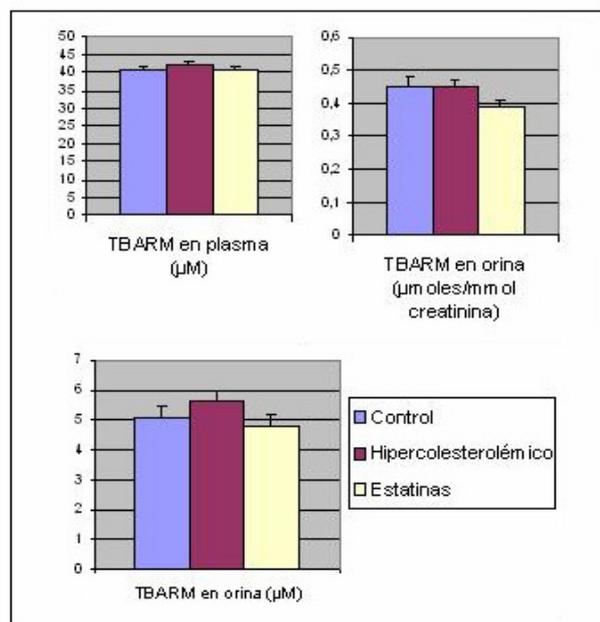


Figura 3.10. Niveles plasmáticos y urinarios de material reactivo con ácido tiobarbitúrico (TBARM) en los grupos de estudio. Los datos están expresados como media ± ESM.

		TBARM plasma (µM)	t-test	TBARM orina (µmoles/mmol creatinina)	TBARM orina (µM)	t-test*
Determinación	Primera	40'1 ± 0'8	p=0'002	0'43 ± 0'02	5'11 ± 0'29	ns
	Segunda	43'4 ± 0'7		0'43 ± 0'02	5'36 ± 0'36	
Sexo	Masculino	41'9 ± 0'8	ns	0'41 ± 0'02	6'08 ± 0'36	p<0'001
	Femenino	41'3 ± 0'7		0'45 ± 0'02	4'36 ± 0'25	
HTA	Sí	43'1 ± 1'0	p=0'028	0'45 ± 0'02	4'81 ± 0'37	ns
	No	40'6 ± 0'6		0'42 ± 0'02	5'51 ± 0'29	
Cerveza	Sí	43'4 ± 0'9	p=0'006	0'45 ± 0'02	6'22 ± 0'43	p<0'001
	No	40'4 ± 0'7		0'42 ± 0'02	4'60 ± 0'23	
Vino	Sí	43'0 ± 0'8	p=0'014	0'44 ± 0'02	6'06 ± 0'40	p=0'001
	No	40'4 ± 0'7		0'43 ± 0'02	4'56 ± 0'24	
Centro Salud	Onda	45'5 ± 0'7	p<0'01	0'49 ± 0'02	5'34 ± 0'31	ns
	Vila-real	37'7 ± 0'5		0'37 ± 0'02	5'12 ± 0'33	
Tabaco	Sí	43'1 ± 1'0	ns	0'43 ± 0'02	6'50 ± 0'51	p=0'001
	No	41'0 ± 0'6		0'43 ± 0'02	4'76 ± 0'24	

Tabla 3.XXVIII. Niveles de material reactivo con ácido tiobarbitúrico (TBARM) en plasma y orina en función del número de determinación, sexo, presencia de HTA, consumo de alcohol o tabaco y Centro de Salud. Los datos están expresados como media ± ESM. (ns: no significación estadística; *: diferencias referidas a los valores expresados en µM).

3.4. EFECTOS DEL TIPO DE ESTATINAS SOBRE LOS DIFERENTES PARÁMETROS ESTUDIADOS.

Los resultados presentados hasta el momento muestran cómo los niveles de los diferentes parámetros analizados del metabolismo de la arginina y de daño oxidativo no difieren significativamente entre los grupos hipercolesterolémico e hipercolesterolémico tratado con estatinas. Sin embargo, dado que los pacientes bajo tratamiento con estatinas recibían diferentes tipos y formas comerciales de las mismas (n=10, Atorvastatina; n=9, Simvastatina; n=3, Pravastatina; y n=1 Fluvastatina), hemos creído conveniente el fraccionamiento de este grupo de estudio atendiendo a este factor con el fin de detectar posibles efectos diferenciales del tipo de estatina sobre los parámetros estudiados. Hemos restringido este análisis a la comparación entre Atorvastatina y Simvastatina, dado el bajo número de pacientes tratados con Pravastatina o Fluvastatina.

	Control	Hipercolesterolémico	Simvastatina	Atorvastatina	t-test
Putrescina (μM)	3'22 \pm 0'22	3'15 \pm 0'14	3'04 \pm 0'30	2'92 \pm 0'39	ns
Espermidina (μM)	13'8 \pm 1'0	12'4 \pm 0'5	10'5 \pm 1'0	12'0 \pm 0'9	ns
Espermina (μM)	7'85 \pm 0'56	7'79 \pm 0'51	8'39 \pm 1'62	6'30 \pm 0'43	ns
Cociente Espd/Espm	1'90 \pm 0'14	1'75 \pm 0'09	1'49 \pm 0'18	1'93 \pm 0'12	p=0'05
Arginina (μM)	92 \pm 4	89 \pm 4	85 \pm 5	95 \pm 5	ns
ADMA (μM)	0'43 \pm 0'03	0'34 \pm 0'03	0'48 \pm 0'07	0'36 \pm 0'08	ns
SDMA (μM)	0'34 \pm 0'04	0'29 \pm 0'03	0'21 \pm 0'04	0'48 \pm 0'1	p=0'019
L-NMMA (μM)	1'05 \pm 0'10	1'10 \pm 0'08	0'73 \pm 0'13	0'88 \pm 0'17	ns
Cociente Arg/ADMA	273 \pm 38	370 \pm 42	210 \pm 36	448 \pm 141	ns
Nitrato plasma (μM)	31'6 \pm 1'7	35'3 \pm 2'7	35'7 \pm 4'5	31'4 \pm 2'2	ns
Nitrato orina (μM)	1150 \pm 89	1164 \pm 76	1448 \pm 247	889 \pm 111	p=0'04
Grupos SH (μM)	311 \pm 9	299 \pm 7	294 \pm 17	313 \pm 11	ns
Grupos carbonilo (μM)	48'3 \pm 3'0	72'5 \pm 4'4	70'6 \pm 7'1	68'0 \pm 5'7	ns
Hidroperóxidos (μM)	9'44 \pm 0'37	9'41 \pm 0'30	9'41 \pm 0'40	8'80 \pm 0'52	ns
TBARM plasma (μM)	41'0 \pm 1'0	42'4 \pm 0'8	40'8 \pm 1'4	40'3 \pm 1'3	ns
TBARM orina (μM)	5'08 \pm 0'35	5'59 \pm 0'39	6'09 \pm 0'66	3'45 \pm 0'45	p=0'002

Tabla 3.XXIX. Niveles de los parámetros del metabolismo de la arginina y daño oxidativo en pacientes tratados con Atorvastatina y Simvastatina. Los datos están expresados como media \pm ESM. (Cociente espd/espm: cociente espermidina/espermina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica; L-NMMA: L-N^G-monometil arginina; TBARM: material reactivo con ácido tiobarbitúrico; ns: no significación estadística).

Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 3.XXIX** en la que también se incluyen, con fines comparativos, los niveles promedio de los diferentes parámetros para los grupos control e hipercolesterolémico. Como puede observarse, sólo los niveles del cociente espermidina/espermina, SDMA, y nitrato y TBARM urinarios difirieron significativamente al comparar, dentro del grupo de estatinas, los pacientes tratados con Simvastatina y Atorvastatina.

3.5. CORRELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS.

Otra forma de evaluar la relación entre los cambios en los diferentes parámetros analizados en este estudio es mediante el establecimiento entre ellos de correlaciones biparamétricas. Para realizar estas correlaciones hemos utilizado la totalidad de los valores experimentales obtenidos para cada parámetro en las dos determinaciones realizadas en los pacientes de cada uno de los grupos de estudio. Las **Tablas 3.XXX-3.XXXVII** resumen las correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas en la población global y en los grupos control, hipercolesterolémico e hipercolesterolémico tratado con estatinas. Al margen de las numerosas correlaciones que se observan entre los parámetros clínicos y/o antropométricos incluidos en nuestro estudio (**Tablas 3.XXX y 3.XXXI**), comentaremos, fundamentalmente, las que se establecen entre los diferentes parámetros experimentales de daño oxidativo y metabolismo de la arginina, así como su relación con el metabolismo lipídico.

3.5.1. Metabolismo lipídico - parámetros experimentales de daño oxidativo y metabolismo de la arginina.

Como puede observarse en las **Tablas 3.XXXII-3.XXXV**, la mayor parte de las correlaciones significativas de los parámetros indicativos del metabolismo lipídico (colesterol total, HDLc, LDLc, triglicéridos y cociente aterogénico) se establecen con los parámetros de daño oxidativo, mientras que son muy escasas las correlaciones con el metabolismo de la arginina. De hecho, en la población global, todos los parámetros analizados de estrés oxidativo se correlacionan, directa o inversamente, con alguno de los parámetros del metabolismo lipídico. Resaltar, en este sentido, que tanto los triglicéridos como el cociente aterogénico se correlacionan directamente con cuatro de

los cinco parámetros estudiados de daño oxidativo, y que los grupos carbonilo proteicos se correlacionan fuertemente con todos los parámetros del metabolismo lipídico a excepción del HDLc. Resultados similares se obtienen tras el fraccionamiento de la población global atendiendo al sexo o al Centro de Salud de procedencia de los pacientes. Sin embargo, la mayor parte de estas correlaciones no se observan en la población afecta de HTA (Tabla XXXVIII).

	NORMOTENSOS					HIPERTENSOS				
	GruSH	Hidrop	MDApl	MDAor	GruCO	GruSH	Hidrop	MDApl	MDAor	GruCO
Colest	ns	ns	ns	ns	r=0,527 p<0,001	ns	ns	ns	ns	r=0,252 p=0,042
HDLc	ns	ns	r=-0,238 p=0,016	ns	ns	ns	r=-0,255 p=0,038	ns	ns	ns
LDLc	ns	ns	ns	ns	r=0,427 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns
TGC	r=0,282 p=0,004	ns	r=0,231 p=0,018	r=0,295 p=0,002	r=0,663 p<0,001	ns	ns	ns	ns	r=0,346 p=0,004
C.Ater	ns	ns	r=0,195 p=0,048	r=0,207 p=0,036	r=0,355 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 3.XXXVIII. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros del metabolismo lipídico y los de daño oxidativo en la población global. Efecto de la hipertensión. Colest: colesterol total; HDLc y LDLc: colesterol HDL y LDL, respectivamente; TGC: triglicéridos; C. Ater: cociente aterogénico; GruSH: grupos SH plasmáticos; Hidrop: hidroperóxidos lipídicos; MDApl y MDAor: malondialdehído plasmático y urinario, respectivamente; GruCO: grupos carbonilo La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

Destacar que para el colesterol total, parámetro utilizado en nuestro estudio para el establecimiento de los grupos experimentales, sólo se observa correlación con los grupos carbonilo. Esta correlación es la única que se mantiene en todos los grupos experimentales (con la excepción del tratado con estatinas) y tras el fraccionamiento de la población global por sexos, presencia de HTA o Centros de Salud.

Respecto a las correlaciones entre parámetros clínicos y del metabolismo de la arginina, son escasas y ninguna evidente con los indicadores del metabolismo lipídico en la población global. Señalar, sólo en el grupo hipercolesterolémico, la correlación directa entre el colesterol total y el LDLc con el cociente espermidina/espermina. Resultados similares se observan en pacientes normotensos y al fraccionar la población global en función del sexo o Centro de Salud. Sin embargo, cuando se considera la

población afecta de HTA (**Tabla XXXIX**), se observan correlaciones del colesterol total, LDLc, triglicéridos y cociente aterogénico con parámetros de las tres vías metabólicas del metabolismo de la arginina analizadas en nuestro estudio.

	HIPERTENSOS										
	Nitrapl	Nitraor	Putres	Esperd	Esperm	Ed/Em	Argin	NMMA	ADMA	SDMA	A/ADMA
Colest	ns	ns	ns	ns	r=-0,388 p=0,021	ns	r=0,353 p=0,038	ns	ns	r=-0,414 p=0,023	ns
HDLc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LDLc	ns	r=0,264 p=0,031	ns	ns	r=-0,342 p=0,048	ns	ns	ns	ns	r=-0,445 p=0,016	ns
TGC	ns	ns	r=-0,349 p=0,040	ns	ns	ns	r=0,474 p=0,004	ns	ns	ns	r=0,336 p=0,049
C.Ater	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,494 p=0,003	ns	ns	r=-0,385 p=0,039	ns

Tabla 3.XXXIX. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros del metabolismo lipídico y del metabolismo de la arginina en pacientes hipertensos. Colest: colesterol total; HDLc y LDLc: colesterol HDL y LDL, respectivamente; TGC: triglicéridos; C. Ater: cociente aterogénico; Nitrapl y Nitraor: nitrato plasmático y urinario; Putres: putrescina; Esperd: espermidina; Esperm: espermina; Ed/Em: cociente espermidina/espermina; Argin: arginina; NMMA: L-N^G-monometil arginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica; A/ADMA: cociente arginina/ADMA. La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

3.5.2. Daño oxidativo – metabolismo de la arginina.

La comparación interna entre los diferentes parámetros analizados de daño oxidativo muestra que sólo los niveles plasmáticos de grupos SH se correlacionan, directa o inversamente, con todo el resto de parámetros de estrés oxidativo en la población global. Sin embargo, la mayor parte de estas correlaciones, al igual que la inversa que se observa entre el malondialdehído urinario y los hidroperóxidos, se pierden al fraccionar la población por grupos de estudio o atendiendo al sexo, HTA o Centro de Salud. Destacar que nuestros resultados no muestran, ni en la población global ni en ningún subgrupo poblacional, correlación entre los niveles plasmáticos y urinarios de malondialdehído.

A diferencia de lo reseñado para los indicadores de daño oxidativo, son numerosas las correlaciones entre sí de distintos metabolitos de la arginina incluidos en este estudio, a excepción de los derivados metilados de este aminoácido. Mencionar, en

primer lugar, la fuerte correlación directa entre los niveles plasmáticos y urinarios de nitrato (**Figura 3.11**), que se mantiene en todos los grupos experimentales y con independencia de que se fraccione la población global en función del sexo, HTA o Centro de Salud. También se observan estrechas correlaciones entre los niveles sanguíneos de las tres poliaminas, y de éstas con la arginina, que se van perdiendo en el grupo hipercolesterolémico y, sobre todo, en el tratado con estatinas. Resaltar, en este sentido, que la correlación inversa entre arginina y espermidina y espermina sólo es significativa en mujeres (**Tabla 3.XL**). Señalar, finalmente, que la falta de correlación que se observa en la población global y en los grupos de estudio entre los diferentes derivados metilados de la arginina, se constata al fraccionar la población por sexo, HTA y Centro de Salud.

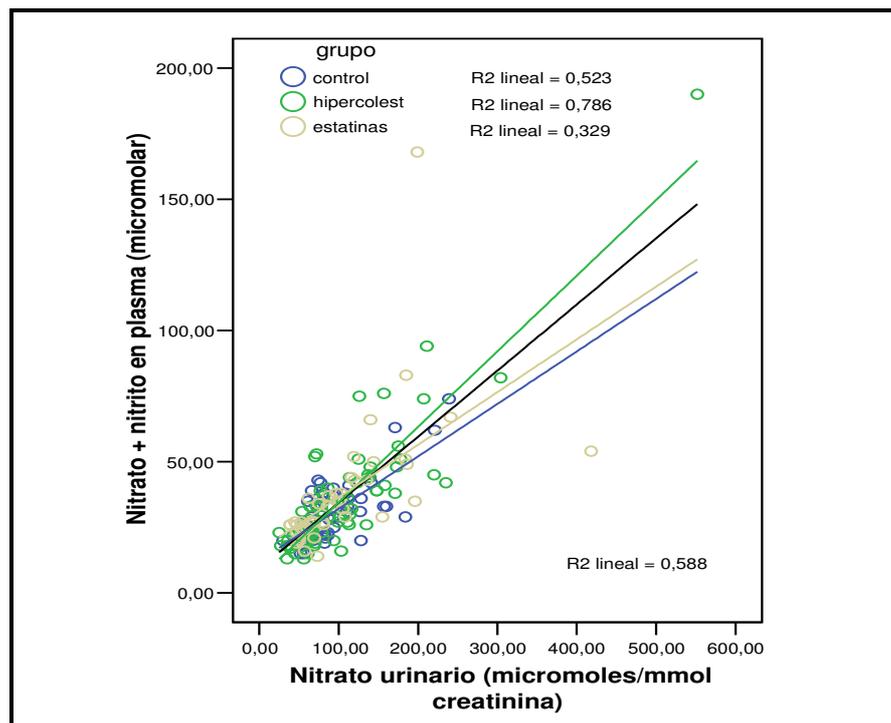


Figura 3.11. Correlación entre los niveles plasmáticos y urinarios de nitrato en los tres grupos experimentales y en la población global.

Las correlaciones significativas mencionadas entre metabolitos de la arginina, como puede observarse (**Tablas 3.XXXVI y 3.XXXVII**), se establecen mayoritariamente entre componentes de la misma vía metabólica. Sin embargo, entre

metabolitos de diferentes vías del aminoácido las correlaciones son muy escasas, propias de cada grupo experimental, y sin significación a nivel de la población global. A nivel de grupos, únicamente en el control existe correlación (inversa) entre ADMA y los niveles de espermina y del cociente espermidina/espermina. Así mismo, sólo en este grupo, los cocientes espermidina/espermina y arginina/ADMA se correlacionan. En el grupo hipercolesterolémico aparece una interesante correlación directa entre los niveles de espermina y los de nitrato urinario. Finalmente, los niveles de L-NMMA, se correlacionan inversamente con la espermidina en el grupo hipercolesterolémico, y directamente con la espermina en el grupo tratado con estatinas. En la población global normotensa se observa una fuerte correlación inversa entre los niveles de SDMA y los de nitrato plasmático ($r=-0,417$; $p=0,002$) y urinario ($r=-0,376$; $p=0,005$).

	Hombres	Mujeres	HTA	No HTA	C.S.Onda	C.S.Vila-real
Putrescina	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Espermidina	ns	$r=-0,376$ $p=0,015$	ns	$r=-0,335$ $p=0,02$	$r=-0,348$ $p=0,035$	$r=-0,341$ $p=0,025$
Espermina	ns	$r=-0,395$ $p=0,011$	$r=-0,483$ $p=0,005$	ns	$r=-0,339$ $p=0,040$	$r=-0,355$ $p=0,020$
Ed/Em	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 3.XL. Correlaciones entre arginina y poliaminas sanguíneas en función del sexo, presencia de HTA y Centro de Salud. Letra r minúscula indica Coeficiente de correlación de Pearson; letra p minúscula indica grado de significación estadística. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística; Ed/Em: cociente Espermidina/Espermina)

Al considerar los niveles plasmáticos de urea y creatinina, dos parámetros clínicos incluidos en nuestro estudio y metabólicamente relacionados con la arginina, se observa la correlación inversa entre los niveles de espermina y los de urea. Esta correlación (que se refleja de forma directa en el cociente espermidina/espermina), sólo carece de significación en el grupo hipercolesterolémico (**Tabla 3.XXXIV**) y al considerar la población proveniente del Centro de Salud de Onda (**Tabla 3.XLI**). Señalar que en tanto en el grupo control como en la población masculina, exclusivamente, se observa una fuerte correlación directa entre niveles de urea y de ADMA (hombres: $r=0,433$; $p=0,003$; resultados no incluidos).

	Hombres	Mujeres	HTA	No HTA	C.S.Onda	C.S.Vila-real
Putrescina	ns	ns	ns	r=-0,309 p=0,024	ns	ns
Espermidina	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Espermina	r=-0,309 p=0,041	r=-0,412 p=0,005	r=-0,342 p=0,044	r=-0,386 p=0,004	ns	r=-0,417 p=0,004
Ed/Em	r=0,318 p=0,036	r=0,406 p=0,006	r=0,347 p=0,041	r=0,427 p=0,001	ns	r=0,443 p=0,002

Tabla 3.XLI. Correlaciones entre urea plasmática y poliaminas sanguíneas en función del sexo, presencia de HTA y Centro de Salud. Letra r minúscula indica Coeficiente de correlación de Pearson; letra p minúscula indica grado de significación estadística. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística; Ed/Em: cociente Espermidina/Espermina).

Por lo que respecta a la creatinina, nuestros resultados indican que sus niveles se correlacionan directamente con el nitrato plasmático o inversamente con el nitrato urinario tanto en la población global como en los distintos grupos experimentales, exceptuando el grupo control. Similar comportamiento se observa al fraccionar la población global en función del sexo, HTA o Centro de Salud de procedencia de los pacientes (Tabla 3.XLII). Mencionar, en este sentido, la falta de correlación entre estos parámetros en la población femenina. Estos resultados para la urea y la creatinina evidencian la importancia del sexo en la utilización metabólica de la arginina.

	Hombres	Mujeres	HTA	No HTA	C.S.Onda	C.S.Vila-real
Nitrato plasma	r=0,266 p=0,013	ns	r=0,274 p=0,024	ns	r=0,343 p=0,001	ns
Nitrato orina	ns	ns	ns	r=-0,265 p=0,007	ns	r=-0,296 p=0,006

Tabla 3.XLII. Correlaciones entre creatinina y nitrato plasmático y urinario en función del sexo, presencia de HTA y Centro de Salud. Letra r minúscula indica Coeficiente de correlación de Pearson; letra p minúscula indica grado de significación estadística. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística).

De la interrelación entre parámetros de daño oxidativo y metabolismo de la arginina destacar, en primer lugar, las que se establecen con los niveles de nitrato. En este sentido se observa una fuerte correlación directa entre los niveles urinarios de malondialdehído y nitrato de la población global. Esta correlación persiste en todos los

grupos experimentales y al margen del fraccionamiento de la población por sexo, HTA o Centro de Salud (**Figura 3.12**). La correlación inversa entre grupos SH plasmáticos y niveles de nitrato en plasma y orina que se observa en la población global y en el grupo control se limita, en el grupo hipercolesterolémico, al nitrato plasmático, desapareciendo ambas correlaciones en el grupo tratado con estatinas. Un comportamiento similar al de los grupos SH se aprecia para el malondialdehído en plasma. Éste se correlaciona inversamente con el nitrato urinario en la población global y en el grupo control, pero no en los grupos hipercolesterolémicos.

Respecto a las correlaciones entre parámetros de estrés oxidativo y niveles de arginina y poliaminas, nuestros resultados no muestran ninguna evidente que persista tras el fraccionamiento de la población por grupos de estudio. Destacar, sin embargo, el particular comportamiento del grupo hipercolesterolémico tratado con estatinas. Sólo en este grupo, los niveles plasmáticos de hidroperóxidos, malondialdehído y, principalmente, grupos carbonilo, se correlacionan (directa o inversamente) con los niveles sanguíneos de arginina y/o alguna de las poliaminas analizadas, además de con el nitrato urinario (**Tabla 3.XXXVII**).

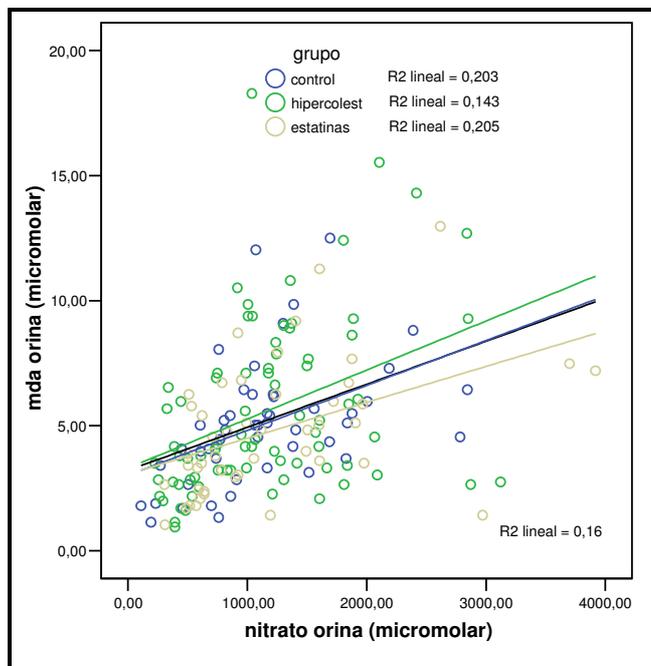


Figura 3.12. Correlación entre los niveles de urinarios de malondialdehído y nitrato en los tres grupos experimentales y en la población global.

Respecto a las escasas correlaciones que se observan a nivel de la población global entre parámetros de daño oxidativo y derivados metilados de la arginina (**Tabla 3.XXXVI**) tan sólo indicar que reflejan, preferentemente, la situación del grupo hipercolesterolémico (**Tabla 3.XXXVII**).

POBLACIÓN GLOBAL

	Edad	IMC	Ind C/C	Gluc	Colest	HDLc	LDLc	TGC	C.Ater	Ureapl	Creatpl	PCR	Microalb
Edad		r=0,444 p<0,001	r=0,183 p=0,014	r=0,321 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,277 p<0,001	r=0,191 p=0,012	r=0,218 p=0,005	ns
IMC	r=0,732 p<0,001		ns	r=0,348 p<0,001	ns	r=-0,273 p<0,001	ns	ns	r=0,228 p=0,003	ns	ns	r=0,224 p=0,004	ns
Ind C/C	ns	ns		ns	ns	r=-0,336 p<0,001	ns	r=0,160 p=0,037	r=0,230 p=0,003	ns	r=0,229 p=0,003	ns	r=0,202 p=0,009
Gluc	r=0,546 p<0,001	r=0,588 p<0,001	ns		r=0,174 p=0,022	ns	r=0,174 p=0,024	r=0,235 p=0,002	ns	ns	ns	r=0,162 p=0,036	ns
Colest	r=0,361 p=0,011	ns	ns	ns		ns	r=0,925 p<0,001	r=0,468 p<0,001	r=0,528 p<0,001	ns	ns	ns	ns
HDLc	ns	ns	r=-0,342 p=0,019	ns	ns		ns	r=-0,248 p=0,001	r=-0,725 p<0,001	ns	r=-0,187 p=0,015	ns	r=-0,155 p=0,048
LDLc	r=0,319 p=0,027	ns	ns	ns	r=0,827 p<0,001	ns		r=0,282 p<0,001	r=0,667 p<0,001	ns	ns	ns	ns
TGC	r=0,319 p=0,025	ns	ns	ns	ns	r=-0,390 p=0,006	ns		r=0,474 p<0,001	ns	ns	ns	r=0,204 p=0,009
C.Ater	r=0,387 p=0,007	ns	ns	ns	r=0,359 p=0,012	r=-0,791 p<0,001	r=0,555 p<0,001	r=0,540 p<0,001		ns	ns	ns	ns
Ureapl	r=0,339 p=0,020	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		r=0,167 p=0,029	ns	ns
Creatpl	ns	ns	r=0,450 p=0,002	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns	ns
PCR	r=0,389 p=0,006	r=0,418 p=0,003	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns
Microalb	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,780 p<0,001	r=0,404 p=0,005	ns	ns	ns	

GRUPO CONTROL

Tabla 3.XXX. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros clínicos en la población global y en el grupo control. IMC: índice de masa corporal; Ind C/C: índice cintura/cadera; Gluc: glucosa; Colest: colesterol total; HDLc y LDLc: colesterol HDL y LDL, respectivamente; TGC: triglicéridos; C. Ater: cociente aterogénico; Ureapl: urea plasmática; Creatpl: creatinina plasmática; PCR: proteína C reactiva; Microalb: microalbuminuria. La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

GRUPO HIPERCOLESTEROLÉMICO

	Edad	IMC	Ind C/C	Gluc	Colest	HDLc	LDLc	TGC	C.Ater	Ureapl	Creatpl	PCR	Microalb
Edad		r=0,305 p=0,006	ns	r=0,370 p=0,001	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,304 p=0,007	r=0,309 p=0,007	ns	ns
IMC	ns		r=0,231 p=0,040	r=0,402 p<0,001	ns	r=-0,411 p<0,001	ns		r=0,324 p=0,004	ns	ns	r=0,253 p=0,028	ns
Ind C/C	r=0,403 p=0,004	ns		ns	ns	r=-0,293 p=0,010	ns	r=0,270 p=0,018	r=0,308 p=0,006	ns	ns	r=-0,241 p=0,037	r=0,238 p=0,037
Gluc	ns	ns	ns		r=0,264 p=0,020	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Colest	ns	ns	ns	ns		ns	r=0,848 p<0,001	r=0,613 p<0,001	r=0,445 p<0,001	ns	ns	ns	r=0,268 p=0,018
HDLc	ns	ns	r=-0,340 p=0,022	ns	r=0,331 p=0,026		r=-0,475 p<0,001	r=-0,264 p=0,020	r=-0,881 p<0,001	ns	ns	r=-0,270 p=0,019	ns
LDLc	ns	r=0,361 p=0,016	ns	ns	r=0,932 p<0,001	ns		r=0,229 p=0,047	r=0,669 p<0,001	ns	r=0,278 p=0,017	ns	ns
TGC	r=-0,293 p=0,048	ns	ns	r=0,578 p<0,001	ns	r=-0,353 p=0,017	ns		r=0,411 p<0,001	ns	ns	ns	r=0,365 p=0,001
C.Ater	ns	ns	ns	ns	r=0,376 p=0,011	r=-0,728 p<0,001	r=0,539 p<0,001	r=0,484 p=0,001		ns	ns	ns	ns
Ureapl	ns	ns	r=-0,295 p=0,044	ns	ns	ns	ns	ns	ns		r=0,275 p=0,016	ns	ns
Creatpl	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns	ns
PCR	r=0,390 p=0,008	ns	ns	r=0,297 p=0,047	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,309 p=0,039	ns		ns
Microalb	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,338 p=0,033	

GRUPO ESTATINAS

Tabla 3.XXXI. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros clínicos en los grupos hipercolesterolémico y tratado con estatinas. IMC: índice de masa corporal; Ind C/C: índice cintura/cadera; Gluc: glucosa; Colest: colesterol total; HDLc y LDLc: colesterol HDL y LDL, respectivamente; TGC: triglicéridos; C. Ater: cociente aterogénico; Ureapl: urea plasmática; Creatpl: creatinina plasmática; PCR: proteína C reactiva; Microalb: microalbuminuria. La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

POBLACIÓN GLOBAL

	GruSH	Hidrop	MDApl	MDAor	GruCO	Nitrpl	Nitror	Putres	Esperd	Esperm	Ed/Em	Argin	NMMA	ADMA	SDMA	A/ADMA
Edad	r=-0,211 p=0,05	ns	r=0,192 p=0,011	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IMC	ns	ns	r=0,275 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ind C/C	ns	ns	ns	r=-0,223 p=0,003	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,283 p=0,007	ns	r=-0,266 p=0,012
Gluc	ns	r=-0,159 p=0,036	r=0,276 p<0,001	ns	r=0,315 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Colest	ns	ns	ns	ns	r=0,449 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HDLc	ns	ns	r=-0,152 p=0,048	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LDLc	ns	ns	ns	ns	r=0,354 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TGC	r=0,208 p=0,006	ns	r=0,183 p=0,016	r=0,202 p=0,008	r=0,601 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.Ater	ns	r=0,156 p=0,042	r=0,189 p=0,013	r=0,188 p=0,014	r=0,320 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ureapl	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,367 p<0,001	r=0,364 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns
Creatpl	r=-0,226 p=0,003	ns	ns	ns	ns	r=0,178 p=0,020	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PCR	r=-0,167 p=0,032	r=0,228 p=0,003	r=0,270 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Microalb	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 3.XXXII. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros clínicos y los experimentales en la población global. IMC: índice de masa corporal; Ind C/C: índice cintura/cadera; Gluc: glucosa; Colest: colesterol total; HDLc y LDLc: colesterol HDL y LDL, respectivamente; TGC: triglicéridos; C. Ater: cociente aterogénico; Ureapl: urea plasmática; Creatpl: creatinina plasmática; PCR: proteína C reactiva; Microalb: microalbuminuria; GruSH: grupos SH plasmáticos; Hidrop: hidroperóxidos lipídicos; MDApl y MDAor: malondialdehído plasmático y urinario; GruCO: grupos carbonilo; Nitrpl y Nitror: nitrato plasmático y urinario; Putres: putrescina; Esperd: espermidina; Esperm: espermina; Ed/Em: cociente espermidina/espermina; Argin: arginina; NMMA: L-N^G-monometil arginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica; A/ADMA: cociente arginina/ADMA. La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

GRUPO CONTROL

	GruSH	Hidrop	MDApl	MDAor	GruCO	Nitrpl	Nitraor	Putres	Esperd	Esperm	Ed/Em	Argin	NMMA	ADMA	SDMA	A/ADMA
Edad	ns	ns	r=0,312 p=0,029	r=0,288 p=0,044	ns	ns	r=-0,362 p=0,011	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IMC	ns	ns	r=0,338 p=0,018	r=0,398 p=0,005	ns	ns	r=-0,332 p=0,020	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,432 p=0,028	ns	r=0,409 p=0,038	ns
Ind C/C	ns	ns	ns	r=-0,457 p=0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Gluc	ns	ns	ns	ns	r=0,300 p=0,036	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,558 p=0,003	ns	ns	ns
Colest	ns	ns	ns	ns	r=0,286 p=0,047	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HDLc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LDLc	ns	ns	ns	ns	r=0,308 p=0,033	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TGC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,466 p=0,017	ns
C.Ater	ns	r=0,299 p=0,039	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ureapl	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,448 p=0,025	r=0,592 p=0,002	ns	ns	r=0,526 p=0,007	ns	r=-0,415 p=0,039
Creatpl	r=-0,317 p=0,028	ns	r=-0,330 p=0,022	ns	r=-0,330 p=0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PCR	ns	ns	r=0,299 p=0,039	r=-0,289 p=0,047	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Microalb	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,500 p=0,008	ns	r=0,394 p=0,042	ns	ns	ns	ns	r=0,466 p=0,016	ns

Tabla 3.XXXIII. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros clínicos y los experimentales en el grupo control. IMC: índice de masa corporal; Ind C/C: índice cintura/cadera; Gluc: glucosa; Colest: colesterol total; HDLc y LDLc: colesterol HDL y LDL, respectivamente; TGC: triglicéridos; C. Ater: cociente aterogénico; Ureapl: urea plasmática; Creatpl: creatinina plasmática; PCR: proteína C reactiva; Microalb: microalbuminuria; GruSH: grupos SH plasmáticos; Hidrop: hidroperóxidos lipídicos; MDApl y MDAor: malondialdehído plasmático y urinario; GruCO: grupos carbonilo; Nitrpl y Nitraor: nitrato plasmático y urinario; Putres: putrescina; Esperd: espermidina; Esperm: espermina; Ed/Em: cociente espermidina/espermina; Argin: arginina; NMMA: L-N^G-monometil arginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica; A/ADMA: cociente arginina/ADMA. La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

GRUPO HIPERCOLESTEROLÉMICO

	GruSH	Hidrop	MDApl	MDAor	GruCO	Nitrpl	Nitrur	Putres	Esperd	Esperm	Ed/Em	Argin	NMMA	ADMA	SDMA	A/ADMA
Edad	ns	ns	r=0,260 p=0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IMC	ns	ns	r=0,325 p=0,004	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ind C/C	ns	r=0,382 p=0,001	ns	r=0,260 p=0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Gluc	ns	r=-0,299 p=0,008	r=0,257 p=0,024	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Colest	r=0,241 p=0,033	ns	ns	ns	r=0,475 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,367 p=0,022	ns	ns	ns	ns	ns
HDLc	ns	ns	r=-0,240 p=0,034	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LDLc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,330 p=0,043	r=0,350 p=0,031	ns	ns	ns	ns	ns
TGC	r=0,317 p=0,005	ns	ns	r=0,299 p=0,008	r=0,644 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C.Ater	ns	ns	ns	r=0,245 p=0,031	r=0,228 p=0,044	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ureapl	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,346 p=0,031	ns	ns	ns	ns
Creatpl	r=-0,254 p=0,027	ns	ns	ns	ns	r=0,316 p=0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PCR	ns	r=0,291 p=0,011	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Microalb	ns	ns	ns	r=0,294 p=0,009	r=0,249 p=0,029	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 3.XXXIV. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros clínicos y los experimentales en el grupo hipercolesterolémico. IMC: índice de masa corporal; Ind C/C: índice cintura/cadera; Gluc: glucosa; Colest: colesterol total; HDLc y LDLc: colesterol HDL y LDL, respectivamente; TGC: triglicéridos; C. Ater: cociente aterogénico; Ureapl: urea plasmática; Creatpl: creatinina plasmática; PCR: proteína C reactiva; Microalb: microalbuminuria; GruSH: grupos SH plasmáticos; Hidrop: hidroperóxidos lipídicos; MDApl y MDAor: malondialdehído plasmático y urinario; GruCO: grupos carbonilo; Nitrpl y Nitraor: nitrato plasmático y urinario; Putres: putrescina; Esperd: espermidina; Esperm: espermina; Ed/Em: cociente espermidina/espermina; Argin: arginina; NMMA: L-N^G-monometil arginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica; A/ADMA: cociente arginina/ADMA. La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

GRUPO ESTATINAS

	GruSH	Hidrop	MDApl	MDAor	GruCO	Nitrpl	Nitror	Putres	Esperd	Esperm	Ed/Em	Argin	NMMA	ADMA	SDMA	A/ADMA
Edad	r=-0,305 p=0,042	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,477 p=0,019	ns	r=-0,433 p=0,035	ns	r=-0,471 p=0,027	ns	r=-0,474 p=0,030	ns
IMC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ind C/C	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,463 p=0,026
Gluc	ns	ns	r=0,441 p=0,002	ns	r=0,439 p=0,002	ns	r=0,299 p=0,044	ns	ns	ns	r=-0,454 p=0,026	r=-0,423 p=0,044	ns	ns	ns	ns
Colest	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HDLc	r=0,343 p=0,025	r=-0,320 p=0,032	ns	r=0,303 p=0,046	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,429 p=0,041
LDLc	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TGC	ns	ns	ns	ns	r=0,535 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,519 p=0,011	ns	ns
C.Ater	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ureapl	ns	r=-0,957 p=0,011	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,490 p=0,015	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Creatpl	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,308 p=0,037	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PCR	ns	ns	r=0,467 p=0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,460 p=0,027	r=-0,439 p=0,036	ns	ns	ns	ns	ns
Microalb	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 3.XXXV. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros clínicos y los experimentales en el grupo hipercolesterolémico tratado con estatinas. IMC: índice de masa corporal; Ind C/C: índice cintura/cadera; Gluc: glucosa; Colest: colesterol total; HDLc y LDLc: colesterol HDL y LDL, respectivamente; TGC: triglicéridos; C. Ater: cociente aterogénico; Ureapl: urea plasmática; Creatpl: creatinina plasmática; PCR: proteína C reactiva; Microalb: microalbuminuria; GruSH: grupos SH plasmáticos; Hidrop: hidroperóxidos lipídicos; MDApl y MDAor: malondialdehído plasmático y urinario; GruCO: grupos carbonilo; Nitrpl y Nitror: nitrato plasmático y urinario; Putres: putrescina; Esperd: espermidina; Esperm: espermina; Ed/Em: cociente espermidina/espermina; Argin: arginina; NMMA: L-N^G-monometil arginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica; A/ADMA: cociente arginina/ADMA. La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

POBLACIÓN GLOBAL

	GruSH	Hidrop	MDApl	MDAor	GruCO	Nitrpl	Nitror	Putres	Esperd	Esperm	Ed/Em	Argin	NMMA	ADMA	SDMA	A/ADMA
GruSH		r=-0,179 p=0,019	r=0,171 p=0,025	r=0,152 p=0,047	r=0,165 p=0,031	r=-0,196 p=0,010	r=-0,194 p=0,011	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,258 p=0,015	ns	ns
Hidrop	ns		ns	r=-0,445 p=0,011	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,426 p=0,017	ns	r=-0,501 p=0,004	ns	ns	r=-0,393 p=0,029	r=-0,366 p=0,043
MDApl	ns	ns		ns	ns	ns	r=-0,157 p=0,038	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MDAor	ns	r=-0,755 p=0,019	ns		ns	ns	r=0,400 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,247 p=0,022	ns	ns	ns
GruCO	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Nitrpl	r=-0,401 p=0,004	ns	ns	ns	ns		r=0,767 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Nitror	r=-0,393 p=0,005	ns	r=-0,360 p=0,011	r=0,450 p=0,001	ns	r=0,723 p<0,001		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Putres	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		r=0,410 p<0,001	r=0,226 p=0,032	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Esperd	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,436 p=0,023		r=0,387 p<0,001	r=0,375 p<0,001	r=-0,339 p=0,002	ns	ns	ns	ns
Esperm	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,424 p=0,028		r=-0,634 p<0,001	r=-0,337 p=0,002	ns	ns	ns	ns
Ed/Em	ns	r=0,416 p=0,031	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,462 p=0,015	r=-0,573 p=0,002		ns	ns	ns	ns	ns
Argin	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,420 p=0,041	ns	ns		ns	ns	ns	ns
NMMA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns
ADMA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,413 p=0,045	r=0,627 p=0,001	ns	ns		ns	r=-0,712 p<0,001
SDMA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns
A/ADMA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,475 p=0,019	ns	ns	r=-0,824 p<0,001	ns	

GRUPO CONTROL

Tabla 3.XXXVI. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros experimentales en la población global y en el grupo control. GruSH: grupos SH plasmáticos; Hidrop: hidroperóxidos lipídicos; MDApl y MDAor: malondialdehído plasmático y urinario; GruCO: grupos carbonilo; Nitrpl y Nitror: nitrato plasmático y urinario; Putres: putrescina; Esperd: espermidina; Esperm: espermina; Ed/Em: cociente espermidina/espermina; Argin: arginina; NMMA: L-N^G-monometil arginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica; A/ADMA: cociente arginina/ADMA. La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

GRUPO HIPERCOLESTEROLÉMICO																
	GruSH	Hidrop	MDApl	MDAor	GruCO	Nitrpl	Nitror	Putres	Esperd	Esperm	Ed/Em	Argin	NMMA	ADMA	SDMA	A/ADMA
GruSH		ns	ns	ns	r=0,242 p=0,033	r=-0,258 p=0,023	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,332 p=0,039	ns	ns
Hidrop	r=-0,294 p=0,050		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MDApl	ns	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,328 p=0,042
MDAor	ns	ns	ns		ns	ns	r=0,379 p=0,001	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,388 p=0,016	ns	ns	ns
GruCO	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Nitrpl	ns	ns	ns	ns	ns		r=0,887 p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Nitror	ns	ns	ns	r=0,460 p=0,001	r=0,395 p=0,007	r=0,715 p<0,001		ns	ns	r=0,367 p=0,022	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Putres	ns	r=-0,435 p=0,034	ns	ns	r=0,422 p=0,040	ns	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Esperd	ns	ns	ns	ns	r=0,565 p=0,004	ns	ns	r=0,519 p=0,009		r=0,468 p=0,003	ns	r=-0,351 p=0,031	r=-0,339 p=0,040	ns	ns	ns
Esperm	ns	r=0,992 p=0,008	r=0,507 p=0,011	ns	r=0,538 p=0,007	ns	ns	ns	ns		r=-0,658 p<0,001	r=-0,386 p=0,017	ns	ns	ns	ns
Ed/Em	ns	r=-0,942 p=0,050	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,755 p<0,001		ns	ns	ns	ns	ns
Argin	ns	ns	r=-0,470 p=0,024	ns	r=-0,540 p=0,008	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NMMA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=0,500 p=0,041	ns	ns		ns	ns	ns
ADMA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns	r=-0,713 p<0,001
SDMA	r=0,464 p=0,039	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns
A/ADMA	ns	r=-0,415 p=0,049	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	r=-0,647 p=0,001	ns	

GRUPO ESTATINAS

Tabla 3.XXXVII. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros experimentales en los grupos hipercolesterolémico y tratado con estatinas. GruSH: grupos SH plasmáticos; Hidrop: hidroperóxidos lipídicos; MDApl y MDAor: malondialdehído plasmático y urinario; GruCO: grupos carbonilo; Nitrpl y Nitror: nitrato plasmático y urinario; Putres: putrescina; Esperd: espermidina; Esperm: espermina; Ed/Em: cociente espermidina/espermina; Argin: arginina; NMMA: L-N^G-monometil arginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica; A/ADMA: cociente arginina/ADMA. La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Numerosos y recientes estudios relacionan, aunque con resultados dispares, a la arginina y algunos de sus metabolitos biológicamente activos con los factores de riesgo cardiovascular (Eid HM y cols, 2003; Böger RH y cols, 1998b). La mayor parte de estos estudios refieren al óxido nítrico (NO), producto directo de la acción de las óxido nítrico sintasas sobre la arginina, con importantes acciones vasodilatadoras, neurotransmisoras, antiproliferativas, antimicrobianas y antitumorales. Alteraciones en la síntesis y/o actuación del NO han sido constatadas en la diabetes, HTA e hipercolesterolemia (Duan J y cols, 2000; Pacher P y cols, 2007).

Los mecanismos bioquímicos propuestos para explicar las alteraciones de la funcionalidad del NO en estas patologías son múltiples, diversos y no mutuamente excluyentes (Duan J y cols, 2000; Pacher y cols, 2007). Así se han sugerido desde deficiencias en la arginina precursora, hasta la inactivación excesiva del NO por condiciones prooxidantes, pasando por la acumulación de derivados metilados de la arginina con capacidad para inhibir la síntesis del NO. Con independencia de los mecanismos, la falta de síntesis y/o actuación del NO se presume una de las causas principales que favorecerían la vasoconstricción y proliferación celular excesivas que conducirían a la disfunción endotelial que subyace a la patología cardiovascular.

Pero las patologías de riesgo cardiovascular son enfermedades complejas en las que existe, también, un estrés oxidativo aumentado con mayor producción de radicales libres del oxígeno y disminución de defensas antioxidantes. Los radicales libres contribuyen a la disfunción endotelial y provocan una alteración de la función vasoreguladora del endotelio ya que afectan al transporte a través de las membranas, aumentan la liberación de prostanoïdes vasoconstrictores y factores de crecimiento sensibles a ROS, provocan contracciones en el músculo liso vascular e inactivan, también, el NO, conduciendo a una excesiva vasoconstricción. Numerosos trabajos experimentales indican también que las lipoproteínas oxidadas intervienen en la disfunción endotelial, anulando el efecto vasodilatador del NO, incluso en ausencia de cambios anatómicos importantes en la pared. Además, el daño inferido por el estrés oxidativo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos puede comprometer su funcionalidad y

producir, por mecanismos diversos, daño tisular. De hecho, algunas de estas alteraciones se han relacionado con el daño vascular en la progresión de la arteriosclerosis e, incluso, en la apoptosis. (Pennathur S y Heinecke JW, 2007; Gutierrez J y cols, 2006; Birukov KG, 2006; Santaolaria M, 2001; Meneu V, 2000).

Al igual que se ha mencionado para las alteraciones del metabolismo de la arginina, los mecanismos bioquímicos presumiblemente relacionados con la hiperproducción de ROS en las patologías de riesgo cardiovascular son diversos y no excluyentes. Es posible que el propio descenso en la biosíntesis de NO, característico de las etapas iniciales de la disfunción endotelial, permita un aumento de la expresión regulada por citoquinas de moléculas de adhesión que faciliten la adhesión de neutrófilos al endotelio, la agregación plaquetaria y la proliferación de células del músculo liso, eventos clave en el desarrollo de arteriosclerosis (Sydow K y Münzel T, 2003; Rosenson RS, 2004; Hayashi T y cols, 2006). La acumulación de células de la inflamación puede aumentar el nivel de estrés oxidativo ya que son una rica fuente de radicales superóxido. Otros eventos desencadenantes de la hiperproducción temprana de ROS serían la activación de NF- κ B y de sistemas enzimáticos generadores de superóxido como la NADP(H) oxidasa, sensibles al estado redox (Rojas A y cols, 2006); otra fuente de superóxido sería la actividad de la eNOS “desacoplada”. Por lo tanto, al margen de los mecanismos que inicien la cascada patogénica de hiperproducción de ROS, las evidencias experimentales apuntan a su más que probable interrelación con las alteraciones de la vía del NO en las mencionadas patologías.

En un intento por contribuir a elucidar la compleja relación entre metabolismo de la arginina, estrés oxidativo y disfunción endotelial que acompaña a las patologías de riesgo cardiovascular, estudios previos de nuestro grupo de investigación han evaluado estos procesos en modelos animales de diabetes, así como en pacientes afectados de diabetes e hipertensión arterial (Meneu V, 2000; Santaolaria M, 2001; García MD, 2001). En esta ocasión hemos centrado nuestro estudio en un tercer factor de riesgo cardiovascular, la hipercolesterolemia. Su elevada prevalencia y su fuerte asociación con la morbi-mortalidad cardiovascular justifican sobradamente su elección como base

de nuestro estudio (Kannel WB y cols, 1971; Martin MJ y cols, 1986; Assman G y cols, 1998).

Nuestra aproximación experimental ha consistido en analizar, en muestras poblacionales humanas, las repercusiones bioquímicas que la hipercolesterolemia produce sobre diferentes parámetros indicadores del metabolismo de la arginina y el estrés oxidativo. Al mismo tiempo se ha evaluado la posible repercusión que sobre estos procesos tendría el tratamiento con estatinas, fármacos hipolipemiantes por excelencia, a las que se han atribuido propiedades antiateroscleróticas y antioxidantes al margen de su función hipolipemiente (Marketou ME y cols, 2006; Mason RP y cols, 2005; Thomas MK y cols, 2006; Resch U y cols, 2006). De forma didáctica discutiremos en primer lugar los resultados del metabolismo de la arginina y, posteriormente, el daño provocado en las moléculas biológicas por el estrés oxidativo. De forma simultánea comentaremos la influencia de las estatinas sobre cada parámetro.

5.1. Hipercolesterolemia y metabolismo de la arginina

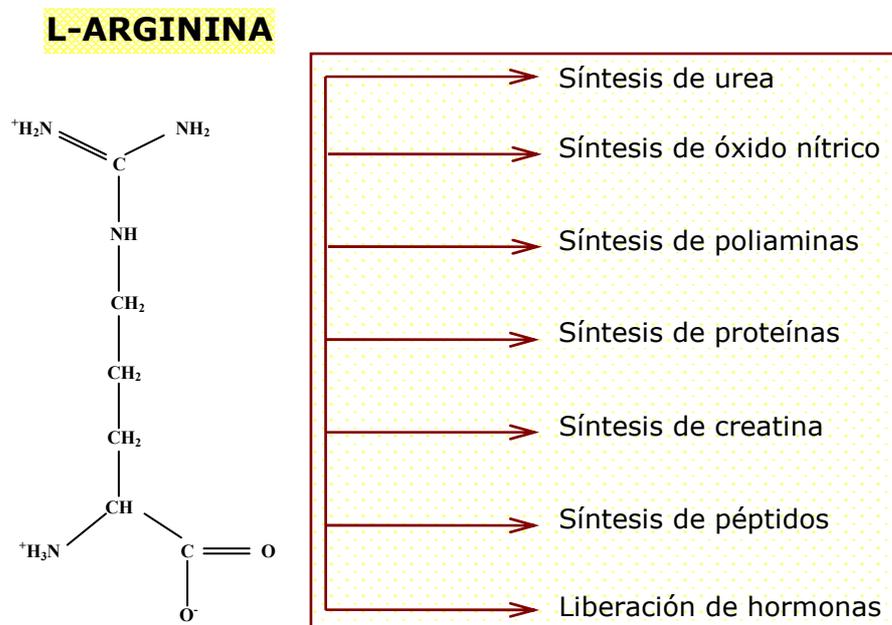


Figura 5.1: Estructura química y funciones metabólicas y fisiológicas de la arginina.

5.1.1. Hipercolesterolemia y producción de óxido nítrico

Uno de los principales compuestos vasoactivos, antiproliferativos y antitrombóticos liberados por el endotelio vascular es el NO, un radical libre, derivado gaseoso e inestable del nitrógeno sintetizado a partir de la arginina (Figura 5.1) por acción de las NOSs (Lowenstein CJ y cols, 1994; Knowles R, 1994). Alteraciones de la funcionalidad del NO han sido ampliamente referidas tanto en la diabetes como en la HTA (Lüscher TF y cols, 1993; Panza JA y cols, 1995; Williams SB y cols, 1996) e hipercolesterolemia (Kuwai T y Hayashi J, 2006; Naseem KM, 2005; Kawashima S y Yokoyama M, 2004; Stokes KY y cols, 2002).

Como el NO es un compuesto muy lábil se suelen medir sus metabolitos finales estables, nitrito y/o nitrato (Wennmalm A y cols, 1993). En los estudios in vitro normalmente se mide nitrito. In vivo, como casi todo el nitrito es oxidado a nitrato por la oxihemoglobina eritrocitaria (Moshage H y cols, 1995; Eich RF y cols, 1996), nitrito y nitrato guardan una relación variable y sólo la suma de ambos se considera indicativa de la producción global de NO en el organismo. En cualquier caso, de acuerdo con nuestras determinaciones, y tal y como cabía esperar, los niveles plasmáticos de nitrito son muy inferiores a los de nitrato, no representando el nitrito más allá del 7% de la suma de nitrato y nitrito en plasma. Nosotros hemos cuantificado tanto el nitrito como el nitrato en plasma y orina aunque, con fines prácticos, sólo hemos utilizado la suma de ambos metabolitos. Aunque las determinaciones las hemos realizados algunas semanas después de la extracción no es probable que éste sea un motivo de variabilidad, ya que está demostrada su estabilidad en plasma congelado al menos durante un año (Moshage H y cols, 1995). Esta afirmación es igualmente válida para la orina, según hemos comprobado nosotros experimentalmente. La validez del procedimiento analítico utilizado para la cuantificación ha sido recientemente refrendada por Marzinzin M y cols (1997). De hecho, los niveles plasmáticos y urinarios de nitrato obtenidos en nuestro estudio se hallan completamente dentro del rango de valores descritos en múltiples estudios (Forte y cols, 1997; Tanaka S y cols, 1997; Surdacki y cols, 1999), incluidos los de nuestro propio laboratorio (Meneu V, 2000; Santaolaria M, 2001; García MD, 2001).

Destacar de nuestras determinaciones de nitrato, en primer lugar, la excelente correlación directa observada entre los niveles plasmáticos y urinarios de este metabolito final del NO en los tres grupos experimentales estudiados, que se mantiene igualmente cuando se fracciona de forma global la población en función del sexo, HTA o Centro de Salud. Estas correlaciones confirman y extienden los resultados previos de nuestro laboratorio (Meneu V, 2000; Santaolaria M, 2001) y sugieren la posibilidad de utilizar indistintamente las determinaciones plasmáticas o urinarias para evaluar la producción de NO en humanos.

Nuestro estudio no ha revelado diferencias significativas en los niveles plasmáticos o urinarios de nitrato en relación con la presencia de hipercolesterolemia o al tratamiento con estatinas. En todo caso, los niveles más bajos corresponden, tanto en plasma como en orina, al grupo control y son muy similares en los otros dos grupos. Por lo tanto, nuestros resultados no apoyan, tal y como se ha propuesto (Feron O y cols, 1999; Böger RH y cols, 2004), una disminución de la producción de NO en la hipercolesterolemia como base explicativa de la anormal relajación vascular endotelio-dependiente que acompaña a esta patología (Stroes ES y cols, 1995, Pacher P y cols, 2007). Por el contrario, nuestros resultados abogarían en favor de la propuesta disminución de la actividad del NO, quizás debida a su excesiva inactivación por radicales libres. Así, Ohara Y y cols (1993) han descrito para la hipercolesterolemia un aumento de la producción endotelial de superóxido, probablemente vía xantina oxidasa, que promovería la degradación del NO formando peroxinitrito. Éste, a su vez, aumentaría el daño vascular directa o indirectamente al generar radicales hidroxilo (Beckman JS y cols, 1990). De acuerdo con esta posibilidad nuestros resultados muestran, para todos los grupos, una excelente correlación entre los niveles urinarios de nitrato y de TBARM, uno de los marcadores más ampliamente utilizados de peroxidación lipídica (véase más adelante).

Pero nuestros resultados, que muestran niveles de nitrato ligeramente superiores en los grupos hipercolesterolémicos, son también compatibles con los observados por Minor y cols que describen un aumento en la producción de óxidos de nitrógeno en aorta de conejos hipercolesterolémicos (Minor RL y cols, 1990). Debemos tener en

cuenta que, a pesar de la importancia fisiológica del NO vascular, no ha podido establecerse su contribución cuantitativa a los niveles plasmáticos y urinarios de nitrato que reflejan, en todo caso, el equilibrio entre su eliminación y la producción de NO por una gran variedad de tipos celulares (Tanaka S y cols, 1997). Además, como ha sido ampliamente constatado, variaciones en la ingesta dietaria de nitrato pueden afectar de forma importante sus niveles (sobre todo en orina), y contribuir de forma decisiva a enmascarar pequeños cambios cuantitativos en la producción endógena de NO (Tanaka S y cols, 1997). Nosotros hemos tratado de minimizar la contribución dietaria tomando las muestras de plasma y orina tras un periodo mínimo de ayuno de 10 horas (Tanaka S y cols, 1997), pero no podemos asegurar que la hayamos eliminado totalmente si consideramos las habituales prescripciones dietéticas recomendadas en los pacientes hipercolesterolémicos. Un efecto sensible de los hábitos nutricionales sobre los niveles de nitrato estaría apoyado por nuestra observación de que el nitrato urinario difiere significativamente ($p=0'05$) entre las dos determinaciones realizadas en nuestro estudio, separadas temporalmente por un periodo de seis meses.

Al desglosar la población global de nuestro estudio en función de la presencia de HTA se observan niveles significativamente más altos ($p=0'003$) de nitrato plasmático en la población hipertensa. Este resultado confirma observaciones previas de nuestro grupo sobre poblaciones diabéticas e hipertensas indicativas de elevaciones de nitrato plasmático cuando coexistían diabetes y/o hipertensión arterial con hipercolesterolemia (Meneu V, 2000; Santaolaria M, 2001). Al igual que ya hemos comentado para la hipercolesterolemia, los estudios realizados hasta el momento no han permitido establecer los efectos de la HTA sobre los niveles plasmáticos y/o urinarios de nitrato y, por extrapolación, con la síntesis de NO (Higashino H y cols, 2007). Sin embargo sí disponemos de ciertas observaciones coincidentes con nuestros resultados experimentales. Así, se ha descrito asociación positiva entre niveles de nitrato y valores de presión arterial en humanos (Li R y cols, 2004) y elevación plasmática de nitrato en ratas espontáneamente hipertensas (Okamoto K y cols, 1974) y en pacientes hipertensos afectos, además, de otras patologías de riesgo cardiovascular como dislipemia o diabetes (Akarasereenont P y cols, 2001; Higashino H y cols, 2007). Por lo tanto, aunque la hipercolesterolemia de forma aislada no modifique sensiblemente los niveles

de nitrato, sí podría incrementarlos al solaparse con HTA, DM u otros factores de RCV (Higashino H y cols, 2007).

Respecto a las posibles causas de la elevación de nitrato (hiperproducción de NO) bajo condiciones de elevado RCV, se han apuntado diferentes posibilidades. Así, podría ser debida al ya comentado efecto antioxidante de ciertos fármacos antihipertensivos como los IECAs que, según indican ciertos estudios, además de inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA), impiden la degradación de bradiquinina, con propiedades vasodilatadores y antiproliferativas mediadas en parte por su efecto estimulador de la liberación de NO por el endotelio (Hornig y cols, 1997). Al margen de la ECA, la angiotensina II estimula la generación de O_2^- por la NAD(P)H oxidasa, que reacciona rápidamente con el NO para formar peroxinitrito, y este último puede oxidar al ácido araquidónico para formar isoprostanos, con potentes efectos vasoconstrictores y antinatriuréticos (Taddei S y cols, 1993). Adicionalmente, la liberación de NO por parte de la iNOS podría incrementarse como consecuencia de la aceleración de los procesos inflamatorios y ateroscleróticos en estos pacientes (Hayashi T y cols, 2006; Higashino H y cols, 2007)

Reseñar también respecto a los niveles de nitrato que, analizados de forma global, son significativamente más altos en mujeres que en hombres ($p=0'006$ para la orina). Este hecho podría estar relacionado con la elevación significativa en la población masculina de ADMA ($p=0'003$ en nuestro estudio), un potente inhibidor de la biosíntesis de NO (véase más adelante; Böger RH y cols, 2000; Böger RH, 2003; Eid HM y cols, 2003), y con el ampliamente descrito efecto protector de los estrógenos sobre el endotelio (Hayashi T y cols, 2006; Jaubert AM y cols, 2007).

Diversos trabajos relacionan los efectos vasoprotectores de las estatinas con su capacidad para estimular la producción endotelial de NO, aún en ausencia de cambios evidentes en el perfil lipídico (Tsunekawa T y cols, 2001; Sardo MA y cols, 2002; Koh KK y cols, 2004; McGown CC y Brookes ZLS, 2007). No obstante, su repercusión sobre los niveles plasmáticos de nitrato difieren dependiendo de la estatina y del estudio, habiéndose descrito desde elevaciones (Tsunekawa T y cols, 2001; Sardo MA y

cols, 2002; Nakashima Y y cols, 1996; Feron O y cols, 2001) hasta ligeras disminuciones (Koh KK y cols, 1999; Koh KK y cols, 2004). Tales observaciones son perfectamente compatibles con nuestros actuales resultados experimentales en los que, como ya hemos comentado, no encontramos diferencias significativas en los niveles plasmáticos o urinarios de nitrato entre pacientes hipercolesterolémicos sin tratamiento y aquellos tratados con estatinas. Sin embargo, la comparación interna entre pacientes tratados con simvastatina y atorvastatina muestra diferencias en el nitrato plasmático (ns) y urinario ($p=0'04$), con niveles superiores e inferiores, respectivamente, a los del grupo control o hipercolesterolémico. A pesar de estos resultados, dado el escaso número de pacientes tratados con cada una de estas dos estatinas, sólo un estudio con una muestra poblacional más amplia podría aportar datos más concluyentes acerca de su efecto sobre la producción de NO en pacientes hipercolesterolémicos.

5.1.2. Hipercolesterolemia y niveles de arginina y sus derivados metilados

A pesar de la elevada afinidad de la NOS por la arginina (K_m del orden de 3 μM) y la relativamente elevada concentración intracelular de este aminoácido (1-2 mM), la disponibilidad de arginina parece ser crítica para la síntesis de NO tal y como lo demuestra el hecho de que sus variaciones en el rango 0'1-10 mM se traducen en incrementos en la síntesis de NO endotelial dosis dependiente (Wascher TC y cols, 1997). Esta falta de saturación aparente de la NOS “in vivo” por la arginina (“paradoja de la arginina”) se ha demostrado en la hipercolesterolemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus, fracaso renal crónico y pacientes con enfermedad coronaria y enfermedad arterial periférica (Bode-Böger SM y cols, 1996; Tentolouris C y cols, 2004; Tsikas D y cols, 2000; Kurz S y Harrison DG, 1997) y concuerda con el beneficio observado tras la suplementación del aminoácido en estas patologías (Kawano H y cols, 2002; Pieper GM, 1998; Wascher TC y cols, 1997; Duan J y cols, 2000). Entre las diferentes hipótesis propuestas para explicar esta situación (véase Introducción) se encuentra la inhibición de la NOS por derivados metilados de la arginina.

Las metilargininas, productos obligatorios del recambio proteico, se originan durante la degradación hidrolítica de proteínas con residuos de arginina metilados post-

tradicionalmente por acción de metiltransferasas (PRMTs). En el hombre, las principales metilargininas circulantes identificadas hasta el momento son la L-NMMA, ADMA y SDMA, cuyos niveles dependen tanto de su producción como de su ulterior metabolización vía DDAH y excreción renal (Nijveldt RJ y cols, 2004; Cooke JP, 2004; Smith CL y cols, 2005; Teerlink T, 2005). Numerosas evidencias experimentales indican que la actividad de la DDAH es el factor crítico en la regulación de los niveles de ADMA. Su sensibilidad al estrés oxidativo (debida a la presencia de un residuo crítico de cisteína en su centro activo) podría explicar fácilmente su inhibición en condiciones de acumulación de LDLox, hipercolesterolemia, liberación de citoquinas inflamatorias, hiperglicemia, hiperhomocisteinemia, o agentes infecciosos (Cooke JP, 2004; Teerlink T, 2005; Endemann DH y Schiffrin EL, 2004). Adicionalmente, el aumento de la actividad de las PRMTs también podría contribuir a elevar los niveles de metilargininas en algunas de las mencionadas patologías (Böger RH y cols, 2000a; Matsuguma K y cols, 2006).

El interés por las metilargininas surge en 1992 al establecerse que la ADMA es capaz de inhibir las diferentes isoformas de NOS (Vallance P y cols, 1992), abriendo de esta forma la posibilidad de regulación de la síntesis de NO por estos compuestos. De hecho, tanto la L-NMMA como, y principalmente, la ADMA son capaces de inhibir directamente la actividad de las NOS, mientras que los tres análogos metilados de la arginina son capaces de competir con ésta por su sistema de transporte y⁺ (Closs EI y cols, 1997; Kielstein JT y cols, 2004). A partir de estas observaciones, un amplio cuerpo de evidencias experimentales ha permitido relacionar la acumulación de ADMA con la disfunción endotelial que acompaña a las enfermedades de RCV y, como ha sido recientemente revisado por Böger (Böger RH, 2003), proponer a la ADMA como un nuevo factor de RCV. Algunos investigadores incluso proponen a la ADMA como el “Uber marker”, un factor bioquímico que media los efectos vasculares adversos de muchos otros factores de riesgo y marcadores (Cooke JP, 2004). Sin embargo, para otros investigadores no está claramente establecido si el aumento de ADMA es causa o consecuencia de la disfunción endotelial y, por lo tanto, si este derivado metilado de la arginina es un marcador de daño endotelial o, por el contrario, un factor predisponente

para el mismo (Sydow K y Münzel T, 2003) vía alteraciones de la expresión génica (Smith CL y cols, 2005).

En este contexto de interés por las metilargininas, no es de extrañar que diferentes estudios tanto clínicos como experimentales hayan centrado su atención en la hipercolesterolemia, uno de los principales factores de RCV. Sin embargo, los resultados, al igual que ocurre con otros metabolitos, no han sido concluyentes. Si bien algunos de estos estudios han referido elevaciones significativas de ADMA en pacientes hipercolesterolémicos (Böger RH y cols, 1998a; Böger RH y cols, 2000b; Sydow K y Münzel T, 2003; Eid HM y cols, 2003), otros no observan tal elevación (Hermenegildo C y cols, 2002) ni correlación entre los niveles de ADMA y colesterol (Dierkes J y cols, 2004). Más acordes con estas últimas observaciones, los resultados de nuestro estudio no muestran diferencias significativas en los niveles de arginina o de cualquiera de sus derivados metilados analizados (ADMA, SDMA y NMMA) entre el grupo control y los grupos hipercolesterolémicos. Sin embargo no creemos, por los datos de que disponemos y que pasaremos a comentar, que nuestros resultados descarten claramente la relación entre hipercolesterolemia y niveles de metilargininas ya que múltiples factores parecen contribuir a establecer los niveles de ADMA (y probablemente también de otras metilargininas) observados en los diferentes estudios (Bode-Böger SM y cols, 2006).

Al comparar las condiciones de nuestro estudio con las del clásico trabajo de Böger RH y cols (1998a) en el que se refieren niveles elevados de ADMA en condiciones de hipercolesterolemia se observa que existe una coincidencia prácticamente total tanto en el número de pacientes estudiados como en los niveles de colesterol alcanzados en el grupo hipercolesterolémico. También, al igual que en nuestro estudio, ninguno de sus pacientes presentaba síntomas ni signos de enfermedad arteriosclerótica excluidos mediante una completa historia clínica y exploración física. Sin embargo, mientras que en su estudio los niveles de ADMA para el grupo control son del orden de 1 μM y se elevan hasta 2'17 μM en el grupo hipercolesterolémico, nuestros valores para ambos grupos oscilan entre 0'43-0'34 μM , en cualquier caso, muy inferiores a los del referido estudio. De hecho, mientras que los niveles de ADMA del

estudio de Böger RH y cols (1998a) para el grupo control se encuentran en el límite superior de valores descritos, los nuestros ocupan el límite inferior (rango descrito 0'4-1 μ M; revisado en Smith CL y cols, 2005). Por lo tanto, y al margen del efecto de la hipercolestolemia, resulta evidente la existencia de diferencias poblacionales de base que pueden haber determinado la disparidad de resultados entre ambos estudios.

En este sentido, una característica interesante del estudio de Böger RH y cols (1998a) es el bajo nivel de colesterol HDL de las muestras poblacionales (del orden de 40 mg/dL frente a 60 mg/dL de nuestro estudio). Según un trabajo reciente del propio grupo de Böger (Maas R y cols, 2005), niveles de HDL colesterol inferiores <40 mg/dL podrían ser un factor independiente para la elevación de ADMA. De acuerdo con esta posibilidad, los niveles más bajos de ADMA para los grupos control de diferentes estudios se han descrito en poblaciones con niveles elevados de HDL colesterol (Hermenegildo C y cols, 2002; Janatuinen y cols, 2003; Schnabel R y cols, 2005; Ziegler S y cols, 2005; Fliser y cols, 2005) y a la inversa, los niveles más altos en poblaciones con relativa deficiencia de HDL colesterol (Kielstein JT, 2002; Eid HM y cols, 2003). A falta de estudios que analicen de forma aislada y pormenorizada la repercusión de los niveles de colesterol HDL y LDL sobre los de ADMA y otras metilargininas, esta posibilidad reforzaría la importancia del HDL colesterol como factor de protección del RCV (Morgan J y cols, 2004; Pérez-Méndez O, 2004; Viles-Gonzalez JF y cols, 2003).

Pero otros factores pueden haber contribuido igualmente a los bajos niveles de ADMA observados en nuestro estudio y a enmascarar los efectos de la hipercolestolemia. Según indican numerosos estudios, los niveles de homocisteína parecen contribuir de forma importante a la elevación de ADMA (Böger RH y cols, 2001; Stühlinger MC y cols, 2001; Dayal S y Lentz SR, 2005), y sus niveles, no evaluados en nuestro estudio, son altamente sensibles a los hábitos nutricionales y el estilo de vida (de Lorgeril M y cols, 2005; Cooke JP, 2005). Cabe la posibilidad de que las características de nuestra dieta mediterránea, con amplios y probados beneficios sobre el RCV (Estruch R y cols, 2006; Giugliano D y Esposito K, 2005) ejerzan parte de sus efectos a través de mantener unos bajos niveles de ADMA. Resaltar, en este

sentido que, tal y como muestra el estudio “AtheroGene” sobre una muestra de cerca de 2000 pacientes, pequeños cambios en los niveles basales de ADMA (en el rango de 0’6 a 0’7 μM) se traducen en incrementos notables del RCV (Schnabel R y cols, 2005).

Reseñar finalmente que, si bien se han referido aumentos de ADMA en numerosas condiciones patológicas (revisado en Billecke SS y cols, 2006), las elevaciones más evidentes se asocian a disfuncionalidad renal (Zoccali C y cols, 2001; Nijveldt RJ y cols, 2004), de acuerdo con la eliminación urinaria de este metabolito. La ausencia de esta u otras patologías (p.e. diabetes, enfermedad hepática) establecidas en nuestros pacientes supone, a priori, una limitación para esperar elevaciones notables de metilargininas en nuestro estudio.

5.1.3. Hipercolesterolemia y niveles de poliaminas

El metabolismo de la arginina, que es extraordinariamente complejo, incluye su utilización en otras vías como la que conduce a la síntesis de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina. Al igual que ocurre con el NO, para las poliaminas se han propuesto múltiples funciones, algunas de ellas relacionadas con sus efectos pro-proliferativos y antioxidantes que serían, en cierto modo, opuestos a los del NO. Así, en aquellas células con capacidad para utilizar la arginina por ambas vías metabólicas, la alteración de una de ellas puede repercutir sobre la otra; por lo tanto, los niveles de poliaminas pueden ser reflejo indirecto de los cambios en la producción de NO por el organismo, y viceversa (Morgan DML, 1994a; Morgan DML, 1994b).

Puesto que la arginina es el sustrato precursor tanto para la síntesis de poliaminas como para la síntesis de NO, la disponibilidad de arginina en condiciones fisiológicas, patológicas o clínicamente manipuladas podría condicionar la funcionalidad de ambas vías. Es conocido que las poliaminas regulan el flujo de Ca^{++} a través de la membrana mitocondrial, y que la exposición de las células a niveles altos de poliaminas incrementa los niveles intracelulares de Ca^{++} mediante un proceso que parece depender del transporte de poliaminas (Morgan DML, 1994a). La elevación del Ca^{++} intracelular puede activar numerosos procesos entre los que se encuentra la

producción de NO (Morgan DML, 1994a). En estas condiciones, el papel de la arginasa, regulando la relación arginina-ornitina va a ser crucial en determinar la derivación de la arginina hacia la síntesis de NO o de poliaminas, con funciones opuestas en numerosos procesos: antiesclerótico-proesclerótico, antiproliferativo-hiperproliferativo. De hecho existen evidencias experimentales que apoyan un control simultáneo (e inverso) de ambas vías, e incluso del propio transporte celular de arginina. (Durante W y cols, 1997).

Sin embargo, y a pesar de la evidente relación mencionada a nivel biosintético y funcional entre poliaminas y NO, el interés investigador por las poliaminas se encuentra relegado a un segundo plano. Creemos que este hecho viene motivado por el descubrimiento relativamente reciente del NO (Moncada S y Higgs A, 1993) y, sobre todo, por la dificultad para esclarecer los mecanismos bioquímicos por los que realizan las poliaminas sus múltiples funciones. De hecho, desconocemos actualmente el posible significado que tendrían los cambios en los niveles circulantes de poliaminas en relación a la patología vascular.

Como ya se ha descrito en la introducción, las poliaminas se elevan en situaciones de proliferación celular. En relación a las patologías de riesgo vascular, el estudio de las alteraciones del metabolismo de las poliaminas se ha circunscrito, hasta el momento, a la diabetes y, en menor medida, a la HTA. La idea que ha surgido de los escasos estudios de que disponemos es la de que los niveles circulantes de poliaminas podrían reflejar, en cierta medida, el daño vascular o la tendencia de las células endoteliales hacia la hipertrofia y la proliferación que acompaña a las complicaciones vasculares de la diabetes y la HTA (Seghieri G y cols, 1992; Seghieri G y cols, 1997).

Seghieri y cols, en el año 1997, al analizar los niveles eritrocitarios de espermidina y espermina en diabéticos tipo 2 observaron elevaciones significativas de ambas poliaminas en subpoblaciones afectas de complicaciones vasculares, resultados que han sido confirmados en trabajos previos de nuestro grupo (Meneu V, 2000; Santaolaria M, 2001). El único trabajo de que tenemos conocimiento sobre los niveles de poliaminas en pacientes afectos de DM1 (Seghieri G y cols, 1992) indica una

elevación significativa sólo de espermidina circulante, no de espermina, que se relaciona con la presencia de nefropatía avanzada y retinopatía. Los resultados referidos para las poliaminas en la DM1 han podido ser reproducidos en nuestro laboratorio en un modelo experimental de diabetes inducida por aloxano (García MD, 2001), abriendo así el camino para su detallado análisis experimental. La elevación de poliaminas en todos los estudios mencionados (Meneu V, 2000; Seghieri G y cols, 1992; Seghieri G y cols, 1997) se ha descrito en poblaciones diabéticas afectas también de HTA, otro factor de riesgo vascular que, según nuestros últimos estudios, parece ser decisivo en el aumento de poliaminas en los pacientes diabéticos (Santaolaria M, 2001). La relación de los niveles de espermidina y/o espermina con las complicaciones vasculares que acompañan a las mencionadas patologías sugiere que estas poliaminas podrían ser marcadores de daño vascular, proliferación celular o reparación endotelial activa por la existencia de vasos lesionados.

Pero otra posible interpretación sobre el significado y origen de las poliaminas circulantes en las patologías de riesgo vascular sería que reflejen simplemente parte de la respuesta bioquímica-fisiológica del organismo frente a un ambiente pro-oxidante. Espermidina y espermina actúan como verdaderos antioxidantes protegiendo al DNA y a los lípidos del daño oxidativo mediado por radicales libres. (Lovaas E y Carlin G, 1991; Tadolini B, 1988).

El daño directo o indirecto sobre las células endoteliales (a través de radicales libres, productos de glicooxidación y/o peroxidación) podría activar las señales intracelulares para el crecimiento y la proliferación celular (Chakravarthy U y cols, 1998), procesos en los que participan las poliaminas. El NFκB es un factor pleiotrópico de transcripción sensible a redox que regula la expresión de numerosos genes y la producción de NO por la NOS (Ho E y Bray TM, 1999), y la lisofosfatidilcolina, un producto de la fosfolipasa A2 y componente importante de las lipoproteínas aterogénicas, estimula el daño y la proliferación de las células vasculares al reorganizar el metabolismo de la arginina. El proceso de reorganización incluye desde la estimulación de su transporte hasta su canalización hacia la síntesis de poliaminas pasando por la inhibición de la síntesis de NO (Durante W y cols, 1997). De hecho, la

ODC, la enzima encargada de la síntesis de putrescina a partir de la ornitina, es un enzima de corta vida media y fácilmente inducible por numerosos estímulos (Stanley BA y Shantz LM, 1994; Pegg AE y cols, 1994; Pegg AE y cols, 1998) entre los que podrían encontrarse el propio estrés oxidativo o algunas de sus consecuencias. (Lovaas E, 1995; Otieno MA y Kensler TW, 2000).

Algunos resultados de nuestros estudios previos parecen sugerir una conexión entre estrés oxidativo y niveles circulantes de poliaminas. Así, los niveles de putrescina en diferentes grupos y condiciones experimentales evolucionan paralelamente a diferentes parámetros de estrés oxidativo, principalmente de forma inversa a los niveles plasmáticos de MDA (Santaolaria M, 2001). Igualmente, la elevación de espermidina y espermina en la diabetes clínica o experimental puede revertirse con el suministro exógeno de arginina, con probados efectos antioxidantes (Meneu V, 2000; García MD, 2000). El descenso de poliaminas en estas condiciones se acompaña de una menor excreción urinaria de MDA, uno de los marcadores más utilizados de daño oxidativo. Tales resultados serían compatibles con el propuesto papel antioxidante de las poliaminas (Chapman GE y Wallace HM, 1994), si bien no descartan que los efectos observados sean indirectos ni, incluso, que los cambios en los niveles de cada una de las poliaminas tengan significados bioquímico-fisiológicos diferentes.

En nuestro empeño por establecer el significado de los cambios de los niveles de poliaminas en la patología vascular hemos continuado nuestros estudios centrándolos en este caso en la hipercolesterolemia, otro de los factores decisivos de riesgo cardiovascular en gran medida coincidente con la diabetes y la HTA. Al igual que estas dos últimas patologías, la hipercolesterolemia también se asocia a alteraciones de la síntesis y/o actuación del NO y a otras alteraciones del metabolismo de la arginina. Sin embargo, no tenemos constancia de que se haya analizado previamente su impacto sobre los niveles circulantes de poliaminas, hecho que nos ha llevado a plantearnos el presente estudio. En él hemos pretendido analizar la posible relación entre los niveles circulantes de colesterol y los de poliaminas sanguíneas, así como sus conexiones con otras alteraciones del metabolismo de la arginina y la situación de estrés oxidativo. Además, dados los efectos antioxidantes y de prevención del daño vascular descritos

para las estatinas, nos hemos planteado también analizar los efectos sobre los niveles de poliaminas de este tratamiento farmacológico de la hipercolesterolemia.

Con nuestras determinaciones de putrescina, espermidina y espermina en individuos normocolesterolémicos (controles), hipercolesterolémicos, e hipercolesterolémicos tratados con estatinas pertenecientes a los Centros de Salud de Onda y Vila-real (Castellón) no hemos podido constatar un efecto significativo de la hipercolesterolemia, ni del tratamiento con estatinas, sobre los niveles sanguíneos de ninguna de las tres poliaminas. Sí hemos observado, sin embargo, un patrón de comportamiento uniforme para las tres poliaminas que presentan los niveles más altos en el grupo control, intermedios en el hipercolesterolémico, y los más bajos en el grupo tratado con estatinas. La poliamina para la que los cambios resultan más evidentes es la espermidina. Resaltar que los niveles experimentales se encuentran dentro de los rangos descritos, y acordes con el patrón habitual de concentraciones relativas, espermidina > espermina > putrescina, lo que aboga por la fiabilidad de nuestras determinaciones. Por lo tanto, y de acuerdo con estos resultados, los efectos de la hipercolesterolemia sobre los niveles de poliaminas sanguíneas serían más bien discretos y, en cualquier caso, en el sentido de su disminución.

Ciertas características de las condiciones de nuestro estudio y de la propia biosíntesis de poliaminas ya nos hacían presumir que los cambios en los niveles de poliaminas, de existir como consecuencia de la hipercolesterolemia, no serían dramáticos. En primer lugar se encuentra el hecho de que los cambios previamente observados en los niveles de poliaminas en las patologías diabética e hipertensiva son muy moderados, incluso en pacientes con complicaciones vasculares (Meneu V, 2000; Santaolaria M, 2001; Seghieri G y cols, 1992). Al analizar las características clínicas de nuestros grupos experimentales se constata que la elevación de colesterol en el grupo hipercolesterolémico, aunque significativa, es bastante discreta (244 mg/dL) y, además, ninguno de los pacientes del estudio estaba diagnosticado de complicaciones vasculares que pudiesen derivar de la hipercolesterolemia. Es más que probable que estas condiciones, las más frecuentes en la práctica asistencial de los Centros de Salud, no sean las más idóneas para analizar el efecto de la hipercolesterolemia sobre los niveles

de poliaminas. Un replanteamiento del estudio, centrándolo en condiciones de hipercolesterolemia más acusadas y, probablemente, en pacientes afectos de complicaciones, seguramente aportaría resultados más concluyentes. En este sentido orientaremos nuestros próximos trabajos experimentales.

Por otro lado conocemos, por nuestros estudios previos, que los niveles de poliaminas tienden a mantenerse constantes ante cambios importantes de las condiciones fisiopatológicas, y que las variaciones a nivel sanguíneo de putrescina, espermidina y espermina son mucho menos evidentes que a niveles tisulares (Teixeira D, 1999). Este hecho puede explicarse por los complicados mecanismos que existen a nivel orgánico para mantener sus niveles de forma órgano/tejido específica y, probablemente, refuerza la importancia fisiológica de estos metabolitos. Nosotros hemos comprobado que, en el ratón, los niveles sanguíneos de poliaminas se mantienen incluso bajo privación completa de arginina dietaria (Teixeira D y cols, 2002); condiciones en las que prácticamente todas las vías metabólicas que derivan de la arginina, incluida la síntesis de NO y urea, se ven severamente limitadas (Teixeira D, 1999).

Es probable, sin embargo, que la disponibilidad de arginina en el hombre tenga un mayor reflejo en los niveles sanguíneos de poliaminas, al menos bajo condiciones patológicas ya que, en nuestros trabajos previos con pacientes diabéticos, observamos que la suplementación de arginina disminuía significativamente los niveles sanguíneos de espermidina y espermina (Meneu V, 2000). Destacar en este sentido que los resultados del presente trabajo, en el que hemos cuantificado los niveles sanguíneos tanto de poliaminas como de arginina, nos han permitido observar por primera vez una clara relación inversa entre los niveles del aminoácido y los de espermidina y espermina. Esta relación, contraria a la esperada por la condición de la arginina de ser el sustrato precursor de las poliaminas, nos hace planteamos si la elevación sanguínea de estas dos poliaminas no será una respuesta compensatoria del organismo frente a condiciones de deficiencia “relativa” de arginina. Recordemos que tanto la arginina como las poliaminas exhiben efectos antioxidantes y cabe la posibilidad de que puedan reemplazarse mutuamente.

Como ya se ha comentado, los efectos de la hipercolesterolemia sobre los niveles de poliaminas en nuestro estudio no son significativos cuando se analiza la población global. Sin embargo, creemos conveniente destacar ciertos resultados que, a nuestro entender, sugieren que tales efectos sí existen, y que pueden estar enmascarados por las propias condiciones del estudio.

El primero de ellos es la correlación inversa entre el LDL colesterol y la espermina que se observa exclusivamente en el grupo hipercolesterolémico. Es probable que exista un “umbral” mínimo de colesterol que debemos rebasar para que los efectos sobre las poliaminas sean estadísticamente evidentes, y que no hemos alcanzado en nuestro estudio. Un efecto del colesterol sobre los niveles de poliaminas, o su significado clínico-fisiológico, puede también deducirse de la pérdida de la correlación entre poliaminas y microalbuminuria, que se observa en el grupo control, tanto en el grupo hipercolesterolémico como en el tratado con estatinas. Destacar, finalmente, que una de las correlaciones más evidentes de nuestro estudio, la inversa entre niveles de espermidina y urea, sólo se pierde en el grupo hipercolesterolémico, coincidiendo precisamente con la aparición, exclusiva de este grupo, de una correlación directa entre espermina y nitrato urinario. Creemos que la consideración conjunta de estos resultados permite deducir un más que probable efecto modulador del colesterol, no ya sólo sobre los niveles sanguíneos de poliaminas, sino globalmente sobre el metabolismo de la arginina, incluyendo su uso en la síntesis de urea y como precursor del NO.

Como hemos constatado en este y en anteriores estudios, las poliaminas se elevan en la HTA. La inclusión en nuestro estudio de pacientes afectos de esta patología creemos que puede haber contribuido a enmascarar los efectos propios de la hipercolesterolemia. De hecho, sólo en la población hipertensa se observa una correlación inversa entre el colesterol total y el LDL colesterol con los niveles de espermina, y se hacen particularmente evidentes los descensos en los niveles de poliaminas por la hipercolesterolemia. Sin embargo, en la población normotensa, el colesterol tiene efectos contrarios, y tiende a incrementar los niveles de putrescina y espermina. El efecto de las estatinas, en cualquiera de estos grupos, sigue siendo la disminución de los niveles de poliaminas. La posibilidad de que la coexistencia de HTA

e hipercolesterolemia tenga efectos opuestos a los de cada una de estas patologías aisladas sobre los niveles de poliaminas creemos que merece un ulterior y más detallado análisis experimental.

Un resultado inesperado de nuestro estudio ha sido el desigual comportamiento, respecto a los cambios en los niveles de poliaminas, de las poblaciones procedentes de los Centros de Salud de Onda y Vila-real. La diferencia más destacable es que, en esta última, el colesterol disminuye considerablemente los niveles de las tres poliaminas en la población con HTA, siendo los efectos estadísticamente significativos para putrescina y espermidina. No disponemos de una respuesta satisfactoria para estos resultados pero resulta evidente que debemos encaminar nuestros ulteriores estudios también en el sentido de la búsqueda de otros factores “indeterminados” de confusión. En esta búsqueda nos puede orientar la comparación de las características de las muestras poblacionales de ambos Centros (**Tabla 5.I.**).

Numerosos estudios han demostrado que los beneficios de las estatinas sobre la patología vascular exceden en mucho a sus efectos hipolipemiantes (Stancu C y Sima A, 2001; Massy ZA y Guijarro C, 2001). Dichos efectos antiateroscleróticos parecen ser debidos a sus propiedades antiinflamatorias (Schönbeck U y Libby P, 2004), antioxidantes (Rosenson RS, 2004) y de inhibición de la proliferación celular (Mach F, 2004), y estarían de acuerdo con una esperable disminución de los niveles de poliaminas durante el tratamiento con estos fármacos. Nuestros resultados indican claramente que el tratamiento de la hipercolesterolemia con estatinas se acompaña, efectivamente, de disminuciones en los niveles de poliaminas. Sin embargo, desconocemos las repercusiones bioquímico-fisiológicas de esta disminución si tenemos en cuenta que los efectos son en el mismo sentido que los producidos por el aumento de colesterol. El colesterol provoca a largo plazo cambios anatomo-patológicos en la pared vascular, con proliferación de células del músculo liso, y atracción de fibroblastos. En esta situación de aumento de la división y crecimiento celular, podría considerarse “esperable” una elevación de los niveles de poliaminas. Sin embargo en nuestro estudio observamos una disminución de las mismas. La complejidad de la homeostasis de las poliaminas, junto a la falta de datos disponibles que analicen los efectos sobre la misma

del colesterol y las estatinas, nos impiden por el momento dar una explicación satisfactoria para este resultado experimental.

	C.S.Onda	C.S.Vila-real	t-test
Edad (años)	55 ± 1	51 ± 1	0'002
Índice masa corporal (kg/m ²)	29'3 ± 0'4	26'6 ± 0'4	<0'001
Índice cintura-cadera (cm/cm)	91 ± 1	96'70 ± 1	<0'001
Glucemia basal (mg/dL)	98 ± 2	91'15 ± 1	<0'001
Colesterol total (mg/dL)	219 ± 4	211'21 ± 4	ns
HDL colesterol (mg/dL)	56 ± 1	59'14 ± 2	ns
LDL colesterol (mg/dL)	138 ± 3	126'31 ± 3	0'02
Triglicéridos	133 ± 7	134'36 ± 16	ns
Cociente aterogénico	4'11 ± 0'13	3'80 ± 0'12	ns
Urea plasma (mg/dL)	37 ± 1	37 ± 1	ns
Creatinina plasma (mg/dL)	0'93 ± 0'02	0'91 ± 0'01	ns
Proteína C reactiva (mg/dL)	0'65 ± 0'07	0'48 ± 0'04	0'033
Microalbuminuria (mg/L)	4'3 ± 0'8	7'1 ± 2'2	ns
Grupos SH totales plasma (μM)	315 ± 6	296 ± 7	ns
Grupos CO proteicos plasma (μM)	71 ± 3	60 ± 4	0'038
Hidroperóxidos plasma (μM)	9'27 ± 0'27	9'48 ± 0'25	ns
TBARM plasma (μM)	45'5 ± 0'7	37'7 ± 0'5	<0'001
TBARM orina (μM)	0'49 ± 0'02	0'37 ± 0'02	<0'001
MDA orina (μmol/mmol creatinina)	5'34 ± 0'31	5'11 ± 0'33	ns
Nitrato plasma (μM)	32'12 ± 2'35	37'11 ± 2'20	ns
Nitrato orina (μmoles/mmol creatinina)	97'4 ± 8'1	104'5 ± 5'7	ns
Nitrato orina (μM)	1038 ± 79	1307 ± 68	0'01
Cociente espermidina/espermina	1'87 ± 0'09	1'71 ± 0'08	ns
Arginina plasmática (μM)	90 ± 3	90 ± 3	ns
L-NMMA plasma (μM)	1'20 ± 0'08	0'83 ± 0'06	<0'001
ADMA plasma (μM)	0'389 ± 0'031	0'407 ± 0'032	ns
SDMA plasma (μM)	0'372 ± 0'038	0'273 ± 0'023	0'028
Cociente arginina/ADMA	360 ± 50	290 ± 26	ns

Tabla 5.I. Características de las muestras poblacionales de los Centros de Salud de Onda y de Vila-real. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística; MDA: material reactivo con ácido tiobarbitúrico; L-NMMA: L-N^G-monometil arginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica). Los datos están expresados como media ± error estándar de la media (ESM). Letras minúsculas diferentes indican diferencias mínimas significativas con p ≤ 0'05

5.2. Hipercolesterolemia y daño oxidativo

Como ya hemos comentado ampliamente, otro de los factores que contribuirían de forma importante a la disfunción endotelial que acompaña a la hipercolesterolemia, además de las alteraciones en el metabolismo de la arginina, sería el aumento de la producción de ROS a nivel vascular. Los radicales libres son moléculas altamente reactivas, con electrones no apareados en el orbital externo, capaces de deteriorar moléculas orgánicas y estructuras celulares cuando se pierde el equilibrio entre ROS y antioxidantes biológicos (Halliwell B, 1987).

Sin embargo, a pesar de la relevancia constatada del estrés oxidativo en el proceso de aterogénesis, no se han establecido claramente los procesos bioquímicos desencadenantes de la hiperproducción de radicales libres en la hipercolesterolemia. Numerosos investigadores implican en este proceso a neutrófilos y células de la inflamación, una rica fuente de radicales superóxido. Estas células serían reclutadas hacia zonas disfuncionales del endotelio como consecuencia de la expresión aumentada de moléculas de adhesión, favorecida por el propio descenso en la biosíntesis de NO que caracteriza las etapas iniciales de la disfunción endotelial (Sydow K y Münzel T, 2003; Rosenson RS, 2004; Hayashi T y cols, 2006). Otros eventos implicados en la hiperproducción temprana de ROS en la hipercolesterolemia serían la activación de NF- κ B y de sistemas enzimáticos generadores de superóxido como la NAD(P)H oxidasa, sensibles tanto a los niveles de colesterol como al estado redox (Rojas A y cols, 2006). Otra fuente de superóxido sería la actividad de la eNOS “desacoplada”.

A medida que la enfermedad progresa se instaura claramente la situación de estrés oxidativo como consecuencia de un proceso de amplificación y diversificación de radicales reactivos al que contribuyen, por un lado, la generación de LDLox, mucho más efectivo que el LDLn en producir daño endotelial y, por otro, el bloqueo acelerado del NO por los aniones superóxido generando peroxinitrito, otro intermediario altamente reactivo (Rosenson RS, 2004; Cominacini L y cols, 2001). De hecho, la formación de peroxinitrito se ve muy favorecida ya que los macrófagos activados presentes en el área lesionada expresan el isoenzima inducible de la NOS (iNOS), capaz

de producir grandes cantidades de NO, que rápidamente interactúa con el anión superóxido (Hayashi T y cols, 2006).

La práctica totalidad de los componentes biológicos son sensibles a la acción deletérea de los radicales libres pero, de particular relevancia para el daño tisular, es la alteración oxidativa de los ácidos grasos, lo que se conoce como peroxidación lipídica (Halliwell B y Chirico S, 1993). Las mayores fuentes lipídicas in vivo son las lipoproteínas y las membranas celulares, siendo los TGs de las LDL y los fosfolípidos de membrana especialmente susceptibles y, por tanto, la principal diana del daño oxidativo a lípidos (Griffiths HR y cols, 2002). En la mayoría de patologías humanas se encuentran elevados los productos finales de peroxidación lipídica, sin embargo sólo en algunas de ellas, como la ATC, tienen relevancia fisiopatológica (Griffiths HR y cols, 2002). Señalar que el aumento de marcadores de peroxidación lipídica es mucho más acusado en enfermedades agudas (infarto de miocardio, quemaduras, hepatitis fulminante, etc.), que en crónicas (diabetes, hipercolesterolemia, arteriosclerosis, reumatismos), tal vez porque este incremento se debe a la destrucción celular, siendo en estas últimas enfermedades más gradual (Spiteller G, 1996), tal y como confirman los resultados del presente trabajo.

El proceso de peroxidación lipídica envuelve una serie de reacciones en cascada cuyos productos finales son hidroperóxidos y aldehídos, entre los que se encuentra el MDA (Griffiths HR y cols, 2002). Existen múltiples marcadores de peroxidación lipídica (dienos conjugados, hidroperóxidos, MDA, isoprostanos...), y numerosos ensayos para su cuantificación. Ningún ensayo de forma aislada permite valorar el proceso de peroxidación lipídica en su totalidad, por lo que en nuestro estudio hemos cuantificado dos de ellos: MDA (más concretamente TBARM) e hidroperóxidos lipídicos.

Las proteínas también son excelentes dianas para el ataque de radicales libres bajo condiciones de estrés oxidativo. Tanto la oxidación directa de las cadenas laterales de los aminoácidos (proceso mayoritario in vivo catalizado por metales), como la reacción secundaria con productos de oxidación de lípidos o carbohidratos distorsionan

la estructura y propiedades de las proteínas y, consecuentemente, su funcionalidad. Las lipoproteínas representan muy bien la alteración funcional que acontece con la oxidación proteica, ya que la modificación de los residuos de histidina y lisina en las LDL impide su reconocimiento por el receptor, siendo reconocida y eliminada por los receptores “basureros” (*scavengers*) (Steinberg D y cols, 1989), además de iniciar toda la cascada de respuestas iniciales formadoras de la placa de ateroma.

Los productos formados como consecuencia de la modificación oxidativa de las proteínas son químicamente muy diversos y requieren para su determinación de métodos analíticamente complejos, específicos y sensibles, por lo que raramente se procede a su evaluación como indicadores de daño oxidativo (Dean RT y cols, 1997; Ciolino HP y Levine RL, 1997). Los aminoácidos más susceptibles de daño oxidativo son aquellos capaces de deslocalizar sus cargas, como aquellos con grupos tioles o aromáticos, si bien muchos residuos alifáticos también pueden ser diana de oxidación (Griffiths HR y cols, 2002). De hecho, entre las modificaciones covalentes originadas por la oxidación directa o indirecta de las proteínas, una de las más comunes es la aparición de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) en aminoácidos como prolina, arginina, lisina o treonina (Levine RL y cols, 1990; Baynes JW y cols, 1989), siendo su acumulación considerada un marcador del daño oxidativo a proteínas en el envejecimiento y ciertas patologías (Dean RT y cols, 1997; Ciolino HP y Levine RL, 1997).

En nuestro estudio hemos cuantificado dos marcadores de daño oxidativo a proteínas, grupos carbonilo y sulfhidrilo. El primero de ellos, los grupos carbonilo, como más genérico y sensible, ya que evalúa la oxidación conjunta de diferentes aminoácidos. El segundo, los grupos sulfhidrilo, que mide exclusivamente la oxidación de residuos de cisteína por lo que, de forma aislada, es un marcador poco sensible de daño oxidativo (Griffiths HR y cols, 2002).

La evaluación comparativa y conjunta de los resultados para los cuatro marcadores de daño oxidativo analizados en este estudio confirma, en términos globales, la situación de estrés oxidativo en la hipercolesterolemia y, al mismo tiempo,

orienta sobre su extensión y dianas preferenciales. Igualmente, dadas las características de nuestras muestras poblacionales, los resultados obtenidos permiten analizar la respuesta de los diferentes parámetros a variables no controladas, al margen de los propios niveles de colesterol, y orientar sobre futuros estudios. Por ello discutiremos seguidamente, de forma individualizada, los resultados más destacables para cada uno de los marcadores de daño oxidativo evaluados en este estudio.

5.2.1. Hipercolesterolemia y peroxidación lipídica

El malondialdehído es el marcador más ampliamente utilizado para evaluar la peroxidación lipídica. Existen diversos procedimientos para su valoración entre los que se encuentran la detección de material reactivo con ácido tiobarbitúrico (TBARM), reacción de Schiff, y métodos histoquímicos. De todos ellos el más extendido es la medición de TBARM por su sencillez y bajo costo (Griffiths y cols, 2002). En nuestro estudio hemos valorado el TBARM tanto en plasma como en orina, lo que nos ha permitido establecer la falta de correlación entre ambos parámetros.

De acuerdo con los resultados globales de nuestro estudio, los niveles más bajos de TBARM tanto en plasma como en orina corresponden al grupo control, se elevan en el grupo hipercolesterolémico (aunque de forma muy discreta), y se recuperan en el grupo tratado con estatinas, con muy pequeña variación intergrupos, y sin alcanzar las diferencias significación estadística. Por lo tanto, y aunque sólo sea a nivel cualitativo, nuestros resultados confirman la elevación de TBARM en la hipercolesterolemia (en nuestro caso a nivel plasmático y urinario), así como el efecto beneficioso sobre este parámetro del tratamiento con estatinas (Dobreanu M y cols, 2002; Kowalski J y cols, 2005; Molcanyiova A y cols, 2006). El hecho de que la hipercolesterolemia eleve los niveles de MDA y el tratamiento con estatinas los disminuya, apoyaría el carácter pro y antioxidante atribuido en cada caso, respectivamente (véase Introducción).

Uno de los factores que puede haber contribuido a limitar las diferencias cuantitativas entre grupos es el discreto grado de hipercolesterolemia (<250 mg/dL) en el que se ha movido nuestro estudio. Resaltar en este sentido que, incluso con cifras

superiores de colesterol, los efectos a nivel cuantitativo difieren entre distintos estudios. Así, Mateos R y cols (2005) refieren una elevación discreta pero significativa de MDA plasmático en ratas sometidas a dieta hiperlipídica (20 gramos de colesterol por kg de dieta) durante 3 meses, sin señalar, desafortunadamente, el cambio alcanzado en los niveles de colesterol. Asimismo, Kowalski J y cols (2005) describen elevación significativa de MDA plasmático en pacientes con enfermedad coronaria e hiperlipemia respecto a sujetos sanos, y disminución significativa de sus niveles tras 6 semanas de tratamiento con atorvastatina, pero no con fluvastatina. Similares resultados obtienen Dobreanu M y cols (2002) en pacientes con estenosis coronaria y tras tratamiento con atorvastatina, y Molcanyiova A y cols (2006) tras 8 semanas de tratamiento con simvastatina, sin alcanzar en este caso valores de significación estadística. Sin embargo (**Tabla 5.II.**), la falta de correlación entre los niveles plasmáticos o urinarios de TBARM y los de colesterol total o su fracción LDL, observada en nuestro estudio, no parece apoyar un papel decisivo del umbral alcanzado de colesterol. En todo caso, no pueden descartarse efectos atribuibles a la fracción de colesterol HDL dado que, en nuestro estudio, ésta sí se correlaciona inversamente con el MDA plasmático en la población global y en el grupo hipercolesterolémico. Estos resultados apoyarían el papel protector ampliamente descrito para el HDL colesterol en el RCV.

POBLACIÓN GLOBAL		
	MDA plasma	MDA orina
Colesterol	ns	ns
HDLc	r=-0,152 p=0,048	ns
LDLc	ns	ns
TGC	r=0,183 p=0,016	r=0,202 p=0,008
C.Ater	r=0,189 p=0,013	r=0,188 p=0,014

Tabla 5.II. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros del metabolismo del colesterol y los niveles de MDA en plasma y orina en la población general. Colesterol: colesterol total; HDLc y LDLc: colesterol HDL y LDL, respectivamente; TGC: triglicéridos; C. Ater: cociente aterogénico; MDA: malondialdehído. La cifra superior representa el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la cifra inferior la significación estadística (p). (ns: no significación estadística).

Otro factor, en este caso metodológico, que puede haber contribuido a limitar la significación de nuestras diferencias cuantitativas entre los grupos es la metodología utilizada para evaluar los niveles de MDA. La valoración de TBARM sobreestima los

niveles de MDA al medir también la unión de TBA a otras moléculas, a no ser que se proceda a la ulterior identificación por HPLC del aducto específico TBA-MDA (Griffiths HR y cols, 2002; Mateos R y cols, 2005). En nuestro caso, el elevado número de muestras y la no disponibilidad de metodología adecuada de HPLC propia, han limitado la valoración a TBARM-inespecífico, lo que explicaría que nuestros niveles de MDA sean considerablemente más elevados que los referidos en otros estudios con pacientes hipercolesterolémicos (Griffiths HR y cols, 2002; Molcanyiova A y cols, 2006). Al margen de este hecho, la comparación de los resultados de MDA obtenidos en distintos laboratorios se ve dificultada por la inestabilidad del mismo, que rápidamente se transforma en dióxido de carbono y ácido acético por medio de la aldehído deshidrogenada, y por la observación experimental de que la intensidad del color en la reacción con TBA depende del tipo de ácido empleado (Griffiths HR y cols, 2002). Teniendo en cuenta estas limitaciones consideramos que nuestros valores (40-46 μM en plasma y 4-6 μM en orina; con muy escasa dispersión) pueden considerarse más que fiables para la moderada hipercolesterolemia que presentaban nuestros pacientes.

Trabajos previos de nuestro grupo han mostrado elevaciones significativas de MDA plasmático y urinario en modelos animales de diabetes y sujetos afectados de DM2 y, principalmente, en pacientes con DM2 e HTA, dos patologías de RCV que comparten con la hipercolesterolemia la disfunción endotelial y el estrés oxidativo (Meneu V, 2000; Santaolaria ML, 2001; García MD, 2001). El efecto particular de la HTA queda confirmado en el presente estudio en el que observamos diferencias significativas en el MDA plasmático cuando desglosamos la población en función de la presencia o no de HTA, al margen de los niveles de colesterol. Es probable que al superponerse varias patologías que provocan disfunción endotelial, se solapen los efectos oxidantes de las mismas, explicando que se alcance significación estadística (Meneu V, 2000; Santaolaria ML, 2001). Esta posibilidad se desprende también de otros estudios. Así, pacientes que asocian hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia presentan niveles más altos de dienos conjugados que los afectados sólo de hipercolesterolemia (Molcanyiova A y cols, 2006), y la disminución significativa de MDA tras 3 meses de tratamiento con estatinas sólo se hace evidente en pacientes en los que coexisten DM2, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (Skrha J y cols, 2004). En este sentido, una

deducción global de los estudios mencionados, y del nuestro en particular, sería que los efectos de la DM2 y de la HTA sobre los niveles de MDA son más acusados que los debidos a la hipercolesterolemia, al menos en el rango de colesterol que cubren nuestros estudios.

De acuerdo con los resultados de nuestro estudio, los niveles plasmáticos y/o urinarios de MDA difieren significativamente cuando se fracciona la población global no sólo en función de la HTA sino de otras variables tales como sexo, consumo de alcohol o tabaco o Centro de Salud. Además, los niveles plasmáticos de este parámetro se correlacionan positivamente con la edad, la glucemia y el IMC y, por lo que respecta al nivel de triglicéridos, éste se correlaciona positivamente con el MDA tanto plasmático como urinario. Atendiendo a este comportamiento resulta fácil predecir que pequeñas modificaciones en cualquiera de estos factores puede condicionar los niveles de MDA obtenidos en distintos estudios y, en consecuencia, explicar sus diferencias a nivel cuantitativo y/o cualitativo.

El segundo marcador de daño oxidativo a lípidos valorado en nuestro estudio han sido los hidroperóxidos lipídicos, productos primarios transitorios y deletéreos que derivan del ataque de los componentes lipídicos por radicales hidroxilo e hidroxilo (Niki E y cols, 2005). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas celulares son particularmente vulnerables a este tipo de daño oxidativo (dado que contienen grupos metileno separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-metileno), lo que puede alterar profundamente la estructura y función de las membranas. La determinación de hidroperóxidos lipídicos resulta especialmente interesante en nuestro estudio sobre hipercolesterolemia dada la susceptibilidad de las LDL a la oxidación, y la muy directa implicación de las LDL oxidadas en la formación de la placa de ateroma (Södergren E y cols, 1998; Chancharme L y cols, 2002). Según algunos investigadores, hasta el 65% de los hidroperóxidos lipídicos que se encuentran en plasma podrían proceder de la oxidación de las LDL (Nourooz-Zadeh J y cols, 1996).

Diferentes estudios refieren elevación de hidroperóxidos lipídicos en sujetos hipercolesterolémicos (Moriel P y cols, 2000; Nourooz-Zadeh J y cols, 2001; Lankin VZ y cols, 2005), con DM2 (Lankin VZ y cols, 2005) y con HTA (Moriel P y cols, 2000), así como en la asociación de hipercolesterolemia e HTA (Moriel P y cols, 2000) o hipercolesterolemia y DM2 (Nourooz-Zadeh J y cols, 2001). Contrariamente, nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre los grupos de estudio (globalmente o tras fraccionamiento de la población atendiendo a diferentes variables), ni tampoco correlaciones evidentes entre los niveles de colesterol o sus fracciones y los de hidroperóxidos lipídicos. Nuestro único dato coincidente con los estudios reseñados es que los valores mínimo (2,36 μM) y máximo (17,69 μM) para este parámetro se detectan, respectivamente, en los grupos control e hipercolesterolémico.

Carecemos, hasta el momento, de una explicación satisfactoria para estas discrepancias. A diferencia de lo ya comentado para el MDA, no podemos aludir en este caso diferencias metodológicas en la cuantificación de los hidroperóxidos lipídicos, ya que se ha seguido exactamente el mismo procedimiento experimental (Nourooz-Zadeh J y cols, 1994; Nourooz-Zadeh J y cols, 1995). También resulta más difícil proponer, como origen de las discrepancias, variaciones en las características de las muestras poblacionales de los diferentes grupos, a pesar que nuestros resultados indican que los niveles de hidroperóxidos son significativamente más altos en mujeres que en hombres, y en aquellos que no refieren consumo de alcohol (vino y/o cerveza).

Resaltar, en este sentido, que la mayor parte de los trabajos que señalan elevaciones significativas de hidroperóxidos lipídicos refieren a pacientes clínicamente complicados. Así, el aumento de hidroperóxidos en sujetos con hipercolesterolemia familiar sólo alcanza significación estadística cuando se desglosan en función de la presencia de enfermedad cardiovascular (Nourooz-Zadeh J y cols, 2001), resultados que concuerdan con la existencia de niveles plasmáticos elevados de hidroperóxidos en diversas patologías cardiovasculares como infarto de miocardio con cirugía de by-pass o angioplastia coronaria (Reilly M y cols, 1997), o con placas arterioscleróticas (Pratico D y cols, 1997; Mallat Z y cols, 1999). De hecho, algunos autores sugirieron que la elevación de hidroperóxidos lipídicos se relaciona con la extensión de la arteriosclerosis

(Nourooz-Zadeh J y cols, 2001). En apoyo de esta posibilidad recordemos que ninguno de nuestros pacientes padecía complicaciones clínicas diagnosticadas como consecuencia de la hipercolesterolemia, y que nuestros resultados muestran correlaciones débiles, aunque significativas, entre los niveles de hidroperóxidos lipídicos y los del cociente aterogénico y/o proteína C reactiva.

Respecto a los niveles de hidroperóxidos lipídicos observados en nuestro estudio ($9.2-9.4 \mu\text{M}$ para los tres grupos; SEM $<0.40 \mu\text{M}$) señalar que se sitúan en el límite superior del amplio rango de valores publicados. En estudios realizados sobre controles sanos y pacientes con patologías de riesgo cardiovascular (hipercolesterolemia, DM2 e HTA) se han descrito valores del orden de $3-5 \mu\text{M}$ (Nourooz-Zadeh J y cols, 2001; Meneu V, 2000; Santaolaria ML, 2001), que sólo se sobrepasan (hasta $9 \mu\text{M}$) en el caso de que existan complicaciones clínicas (Nourooz-Zadeh J y cols, 2001). Sin embargo, en otros estudios se refieren valores en el rango $6-9 \mu\text{M}$, tanto para individuos sanos (Södergren E y cols, 1998; Firuzi O y cols, 2006) como afectados de DM2 (Södergren E y cols, 1998). Es probable que las características propias de los diferentes estudios, que en ocasiones obligan a realizar los análisis en muestras de plasma congeladas, hayan contribuido, según indica una excelente y reciente revisión, a las diferencias tanto cualitativas como cuantitativas referidas para los niveles de hidroperóxidos lipídicos (Firuzi O y cols, 2006).

Reseñar que numerosos factores pueden afectar tanto la aparición de hidroperóxidos lipídicos como su descomposición en aldehídos estables (Niki E y cols, 2005). Este hecho ayudaría a explicar la falta de correlación entre niveles plasmáticos de hidroperóxidos y MDA (Nourooz-Zadeh J y cols, 1995; Meneu V, 2000; presente estudio) y de MDA plasmático y urinario (Nacitarhan S y cols, 1995; Meneu V, 2000; presente estudio), así como la correlación inversa observada en este y otros estudios (Meneu V, 2000) entre hidroperóxidos y MDA urinario. La arginina y/o algunos de sus metabolitos podrían ser factores que afectasen al equilibrio hidroperóxidos/MDA, a juzgar por los resultados obtenidos por nuestro grupo en diferentes patologías de riesgo cardiovascular (Meneu V, 2000; Santaolaria ML, 2001; presente estudio).

La arginina, además de bloquear grupos aldehído reactivos, es precursora del NO (Wu G y Morris SM, 1998), capaz de reaccionar con el anión superóxido para formar peroxinitrito, que puede causar peroxidación lipídica indirectamente al generar radicales hidroxilo (Moncada S y Higgs A, 1993; Marin J y Moncada S, 1997). Contradictoriamente, la peroxidación lipídica dependiente de peroxinitrito puede ser inhibida por el NO (Rubbo H y cols, 1994) y, éste puede actuar como antioxidante, al menos a nivel cerebral, donde Rauhala P y cols (1996) han demostrado que detiene la peroxidación lipídica. Por uno u otro mecanismo, la arginina podría afectar el estrés oxidativo y repercutir sobre la peroxidación lipídica.

Se ha observado, en este sentido, que la administración oral moderada de arginina a pacientes afectos de DM2 reduce considerablemente el nivel urinario de MDA (Lubec B y cols, 1997; Meneu V, 2000), sin afectar prácticamente al MDA plasmático, e incrementando la tasa de hidroperóxidos lipídicos circulantes (Meneu V, 2000). Tales resultados son compatibles con la posibilidad de que la arginina bajo ciertas condiciones afecte la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos en aldehídos estables, por lo que su disponibilidad podría ser uno de los factores que contribuya a regular la relación hidroperóxidos/MDA. De hecho, nuestro estudio muestra correlación inversa significativa ($r=-0,501$; $p=0,004$) entre niveles plasmáticos de arginina e hidroperóxidos cuando se considera la población global. Pero también cabe esta posibilidad para las poliaminas, metabolitos derivados de la arginina con propiedades antioxidantes, que nuestro estudio relaciona con los niveles circulantes de hidroperóxidos lipídicos (correlación con la espermina: $r=0,426$; $p=0,017$ en la población global; $r=0,992$; $p=0,008$, en el grupo hipercolesterolémico tratado con estatinas). Así, se ha observado que la suplementación de arginina disminuye significativamente los niveles circulantes de poliaminas (Meneu V, 2000),

Comentar finalmente, en relación a los factores que podrían afectar la relación hidroperóxidos/MDA, que nuestro estudio no descarta el posible papel del colesterol. De hecho, la correlación inversa ya mencionada entre los niveles de hidroperóxidos lipídicos y los de MDA en orina sólo es evidente en la población global ($r=-0,445$; $p=0,011$) y en el grupo control ($r=-0,755$; $p=0,019$), perdiéndose en los dos grupos

hipercolesterolémicos. Desconocemos el significado de esta observación experimental dado que, aunque por diferentes mecanismos, tanto los hidroperóxidos como el MDA resultan tóxicos para las moléculas y estructuras celulares (Niké E y cols, 2005), y que no se ha establecido su contribución individual en la instauración de las complicaciones cardiovasculares que acompañan a la hipercolesterolemia.

5.2.2. Hipercolesterolemia y oxidación proteica

A diferencia de la extensa literatura que refiere a la evaluación de la oxidación lipídica en patologías de riesgo cardiovascular, son muy pocos los estudios referentes a la oxidación proteica (Dean RT y cols, 1997; Ciolino HP y Levine RL, 1997). Sin embargo, como ya hemos comentado, las proteínas son también dianas altamente susceptibles al ataque por radicales libres, hecho que conlleva frecuentemente la pérdida de su actividad biológica y la aparición/desaparición de grupos cuantificables con metodologías relativamente simples (Griffiths HR y cols, 2002; Firuzi O y cols, 2006). Tales condiciones nos han llevado a incluir en nuestro estudio la determinación de grupos sulfhidrilo (SH) y carbonilo en proteínas plasmáticas y, a juzgar por los resultados obtenidos, proponemos que la cuantificación de grupos carbonilo puede ser una opción válida para evaluar de forma específica y sensible el estrés oxidativo que acompaña concretamente a la hipercolesterolemia.

Nuestros resultados de grupos SH proteicos muestran niveles discretamente inferiores en el grupo hipercolesterolémico y más elevados y similares en los grupos control y tratado con estatinas, sin alcanzar las diferencias significación estadística. Este resultado por lo tanto, aunque sólo sea a nivel cualitativo, apoyaría la existencia de mayor oxidación proteica en la hipercolesterolemia así como su prevención por el tratamiento con estatinas. Recordar que la determinación de grupos sulfhidrilo mide exclusivamente la oxidación de residuos de cisteína por lo que, considerado de forma aislada, es un marcador poco sensible de daño oxidativo (Griffiths HR y cols, 2002). Es más que probable que esta característica, junto con otros factores que comentaremos seguidamente, ayude a explicar la disparidad de resultados entre los escasos estudios que refieren los niveles de grupos SH sanguíneos en la hipercolesterolemia.

De acuerdo con nuestro estudio, se han descrito niveles inferiores de tioles intracelulares en eritrocitos de ratas hipercolesterolémicas (Kempaiah RK y Srinivasan K, 2004), y en pacientes con enfermedad coronaria estable diagnosticada angiográficamente (Tosukhowong P y cols, 2003). En el mismo sentido, Oberg BP y cols (2004) observan descensos no significativos de tioles plasmáticos en pacientes afectos de enfermedad renal al fraccionar la población de acuerdo con los niveles de colesterol. Contrariamente, otros estudios refieren elevaciones de grupos tiólicos en pacientes hipercolesterolémicos respecto a controles normocolesterolémicos (Rossi R y cols, 2001) o hipocolesterolémicos (Muldoon MF y cols, 1996).

De los estudios citados, quizás el más similar al nuestro sea el de Muldoon MF y cols (1996) ya que se realizó en humanos, en general sanos, y sin otro factor de RCV. Además, los niveles plasmáticos de grupos tiólicos referidos en este estudio se encuentran en el rango de los observados en nuestros pacientes y de los descritos para individuos sanos (Jenkins DJA y cols, 1999; Firuzi O y cols, 2006), hecho que facilita sensiblemente la comparación entre estudios, además de aportar fiabilidad a nuestras determinaciones. Sin embargo, los resultados de este estudio, contrariamente a los del nuestro, indican elevación plasmática de grupos tiólicos en la hipercolesterolemia. Destacar que sus niveles medios de CT eran, comparados con los nuestros, superiores en el grupo hipercolesterolémico (269 frente a 244 mg/dL) e inferiores en el grupo hipocolesterolémico (165 frente a 175 mg/dL), condiciones, por lo tanto, mucho más favorables para estimar diferencias significativas entre los grupos atribuibles al nivel de colesterol.

Una observación que destaca en el estudio de Muldoon MF y cols (1996) es el elevado grado de dispersión de los resultados (DS 185 μ M para el caso de varones hipercolesterolémicos), algo completamente opuesto a nuestros resultados experimentales. Además, curiosamente, este estudio refiere diferencias estadísticamente significativas al comparar por sexos, atribuibles a los elevados niveles de grupos SH en el grupo de varones hipercolesterolémicos (valor medio 846 μ M) ya que el resto muestran niveles bastante homogéneos. En nuestro estudio, contrariamente, el sexo ha sido la única variable para la que no se han observado diferencias significativas en los

grupos SH al fraccionar globalmente la población. Por lo tanto, al igual que ya mencionamos para el MDA, las diferencias entre estudios pueden ser principalmente atribuibles a una combinación de baja sensibilidad de este marcador junto con su afectación por la suma de múltiples y pequeñas diferencias entre las muestras poblacionales tales como consumo de tabaco o alcohol o porcentaje de pacientes hipertensos.

Reseñar que los niveles plasmáticos de grupos SH cuantificados en nuestro estudio (al igual que en el de Muldoon MF y cols, 1996), en el que no hemos procedido a la separación de las proteínas previamente a la reacción con DTNB (Ellman GL, 1959; Oberg BP y cols, 2004), reflejan la contribución global de diferentes compuestos con grupos SH libres (Wlodek PJ y cols, 2006). Entre ellos, el mayor contribuyente con diferencia son las proteínas plasmáticas pero, además, el aminoácido cisteína libre y glutatión, principalmente. El glutatión plasmático libre es muy bajo (10-15 μM) ya que es fundamentalmente intracelular, si bien su descenso, que se considera un reflejo de sus niveles titulares, se ha constatado ampliamente en situaciones de estrés oxidativo (Balbis E y cols, 2007; Seghrouchni I y cols, 2002; Aguilar B y cols, 2004). La concentración plasmática de cisteína es bastante superior, del orden de 100 μM , si bien no se ha referido su descenso en situaciones de estrés oxidativo como en la hipercolesterolemia. Por lo tanto, en el caso de nuestro estudio, ligeros descensos de grupos SH en cualquiera de estos componentes individuales, o en su conjunto, permitirían explicar el moderado descenso de este parámetro observado en el grupo hipercolesterolémico. Proponemos el análisis individual de cada componente por separado para valorar si refleja específicamente la oxidación de grupos SH proteicos y/o, complementariamente, valorar situaciones de hipercolesterolemia más extremas. Reseñar, en este sentido, que las grandes ventajas del procedimiento utilizado, además de su rapidez y fiabilidad, son su sencillez y su falta de afectación por la congelación de las muestras (Firuzi O y cols, 2006), características que hacen posible su utilización en estudios como el nuestro e, incluso, en la clínica rutinaria. Carecemos actualmente de tales posibilidades analíticas para cisteína o GSH libre (Wlodek PJ y cols, 2006; Ashfaq S y cols, 2006)

Como ya hemos comentado, en investigaciones previas de nuestro grupo en las que se determinaron diversos marcadores de estrés oxidativo en pacientes afectos de DM2 y/o HTA, los daños observados fueron mucho mayores que los obtenidos en el presente estudio (Meneu V, 2000; Santaolaria M, 2001). En el mismo sentido, un estudio reciente sobre daño oxidativo en situaciones de riesgo cardiovascular como HTA e hipercolesterolemia, muestra que los resultados para la hipercolesterolemia son mucho más discretos en la mayoría de parámetros analizados (Espinosa O, 2007). Por lo tanto, el moderado efecto de la hipercolesterolemia “per se” podría explicar la discreción del descenso de grupos SH plasmáticos y su falta de significación estadística. Si a este hecho se añade la afectación de este parámetro por diferentes variables (HTA, consumo de alcohol o tabaco), cabe plantearse nuevos estudios modificando el tamaño de la muestra, los niveles de colesterol del punto de partida, así como el control de las variables indicadas.

El segundo marcador de daño oxidativo a proteínas evaluado en nuestro estudio ha sido los grupos carbonilos. Éstos son productos de oxidación no sólo de proteínas, sino también de lípidos y glúcidos, por lo que es necesaria la separación previa de la fracción proteica del plasma para cuantificar exclusivamente los grupos carbonilo proteicos. Ofrecen información cuantitativa de la totalidad de proteínas oxidadas, sin aportar datos acerca del origen o funcionalidad de las mismas, para lo cual serían necesarios otros métodos, sobre todo inmunohistoquímicos (Griffiths HR y cols, 2002). En cuanto al estudio que nos ocupa, no pretendíamos identificar las proteínas oxidadas de forma particular, sino cuantificarlas en general ya que no tenemos referencia de ningún estudio en el que se indiquen los niveles plasmáticos de grupos carbonilo proteicos en individuos afectos exclusivamente de hipercolesterolemia. El método empleado para la determinación es el clásico procedimiento colorimétrico de Levine y cols (1990), que no es tan sensible y discriminatorio como el ELISA descrito más recientemente (Buss H y cols, 1997), pero cuyos resultados en muestras de plasma guarda muy buena correlación con los de este último procedimiento.

De acuerdo con los resultados de nuestro estudio, los niveles plasmáticos de grupos carbonilo proteicos podrían representar el indicador más fiable y sensible del

estrés oxidativo asociado a condiciones de hipercolesterolemia moderada. Esta afirmación se sustenta, en primer lugar, en el hecho de que este parámetro, a diferencia de los comentados previamente, se eleva de forma clara y significativa (del orden del 40%) en los grupos hipercolesterolémicos respecto al control tanto en la población global como tras el fraccionamiento de ésta en función de cualquiera de las variables incluidas en nuestro estudio (Centro de Salud, determinación, sexo, HTA o consumo de tabaco o alcohol). En segundo lugar, los grupos carbonilo proteicos se correlacionan directa y fuertemente en nuestro estudio con todos los parámetros del metabolismo lipídico a excepción del HDLc, hecho de gran importancia ya que son los parámetros utilizados para el establecimiento de los grupos experimentales (**Tabla 5.III.**).

	GRUPOS CARBONILO PROTEICOS					
	Global	Control	Hipercolesterolémico	Estatinas	No HTA	HTA
Colect	r=0,449 p<0,001	r=0,286 p=0,047	r=0,475 p<0,001	ns	r=0,527 p<0,001	r=0,252 p=0,042
HDLc	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LDLc	r=0,354 p<0,001	r=0,308 p=0,033	ns	ns	r=0,427 p<0,001	ns
TGC	r=0,601 p<0,001	ns	r=0,644 p<0,001	r=0,535 p<0,001	r=0,663 p<0,001	r=0,346 p=0,004
C.Ater	r=0,320 p<0,001	ns	r=0,228 p=0,044	ns	r=0,355 p<0,001	ns

Tabla 5.III. Correlaciones biparamétricas estadísticamente significativas entre los parámetros del metabolismo lipídico y los grupos carbonilos proteicos en la población global, en los grupos de estudio, y de forma global en función de la presencia de HTA. Letra r minúscula indica coeficiente de correlación de Pearson; letra p minúscula indica grado de significación estadística. (HTA: hipertensión arterial; ns: no significación estadística).

Resaltar, además, que la correlación colesterol total-grupos carbonilo es la única que se mantiene en todos los grupos experimentales (con la excepción del tratado con estatinas) y tras el fraccionamiento de la población global por sexos, presencia de HTA o Centros de Salud. Por lo tanto, estos resultados apoyan claramente el estado prooxidante ampliamente descrito en condiciones de hipercolesterolemia (Böger RH y cols, 1998b; Heitzer T y cols, 2001; Moriel P y cols, 2000), y extienden sus efectos más fácilmente evaluables al incremento de grupos carbonilo en dianas proteicas del plasma. La relevancia de este resultado radica en la falta de datos en la literatura sobre los niveles de grupos carbonilos proteicos en sujetos hipercolesterolémicos.

Un reciente trabajo de Kumar en ratas sometidas a dieta hipercolesterolémica (suplemento de la dieta con 4% de colesterol durante 30 días), refiere niveles elevados de grupos carbonilo proteicos en el tejido renal (Kumar SA y cols, 2006), demostrando así el daño oxidativo que provoca sobre este tejido la hipercolesterolemia. Es hasta el momento el único trabajo del que tenemos constancia que midan grupos carbonilos en situación de hipercolesterolemia pero, obviamente, es un modelo animal. El artículo no reseña los niveles plasmáticos de colesterol alcanzados con el tratamiento, lo que nos permitiría una más ajustada comparación con nuestros trabajos. Sin embargo, y a pesar de las evidentes diferencias entre ambos estudios (modelo animal frente a humano, niveles de colesterol desconocidos en el caso de las ratas, estudio en tejido renal y no en plasma) sus valores promedio de grupos carbonilo proteicos oscilan entre 0'82 y 1'82 nmol/mg proteína en los grupos control e HC respectivamente, en excelente acuerdo con nuestros resultados experimentales de 0'7-1,5 nmol/mg de proteína (40-90 μ M).

Igualmente, nuestros niveles de grupos carbonilo proteicos son muy similares a los de diferentes estudios en muestras poblacionales humanas (Jenkins DJA y cols, 1999; Marangon K y cols, 1999; Çakatay U, 2000; Firuzi O y cols, 2006), incluidos trabajos previos de nuestro laboratorio (Meneu V, 2000; Santaolaria M, 2001), lo que aporta fiabilidad a nuestros resultados experimentales. En los últimos trabajos reseñados, realizados en poblaciones diabéticas y/o hipertensas, se detectaron niveles de grupos carbonilo en proteínas plasmáticas de hasta 2 nmol/mg proteína (Meneu V, 2000; Santaolaria M, 2001), sensiblemente más altos que los obtenidos en este caso que nos ocupa de la hipercolesterolemia. Esta observación concuerda con la del resto de parámetros de daño oxidativo incluidos en este estudio, y apoya la idea ya comentada de que en la HC el estrés oxidativo es menos evidente que en otras patologías que provocan daño vascular (DM2, HTA).

Recordemos que los grupos carbonilo proteicos son un marcador de daño oxidativo a proteínas más general que los grupos sulfhidrilo, ya que detectan daño oxidativo en diferentes aminoácidos (prolina, arginina, lisina o treonina)(Levine RL y cols, 1990; Baynes JW y cols, 1989), y no sólo en residuos de cisteína. Pueden originarse por modificación oxidativa directa de las cadenas laterales de estos

aminoácidos por ROS y/o introducidos secundariamente por reacción de cisteína, histidina o lisina con aldehídos producidos durante la peroxidación lipídica. Quizá sea este el motivo de que el nivel de grupos carbonilo proteicos sea considerado el más general y establecido biomarcador de daño oxidativo severo a proteínas (revisado en Çakatay U, 2005). Al margen del mecanismo por el que se originen, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el ataque oxidativo a las proteínas puede ser un evento temprano importante en la patogénesis de las complicaciones secundarias a la hipercolesterolemia. Su clara elevación bajo nuestras condiciones de moderada hipercolesterolemia, cuando los cambios en los restantes indicadores de daño oxidativo son todavía incipientes, podría evidenciar la existencia de una patología subclínica (estrés oxidativo y disfunción vascular) incluso a niveles relativamente bajos de colesterol. Tal posibilidad ha sido ya apuntada para otras patologías de RCV como la diabetes (Çakatay U, 2005).

Ante la falta de estudios en este sentido, resulta difícil especular sobre las causas y consecuencias de la observada elevación plasmática de grupos carbonilo proteicos en nuestras condiciones experimentales de moderada hipercolesterolemia. La acumulación de proteínas oxidadas debe reflejar no sólo la velocidad de oxidación proteica sino también su velocidad de degradación, que también depende de numerosas variables (Stadtman ER y Levine RL, 2003). Una asociación entre el aumento de productos de peroxidación lipídica y la aparición de grupos carbonilo proteicos ha sido descrita en diferentes trabajos (Stadtman ER y Levine RL, 2003 ; Dalle-Donne I y cols, 2003a y b; Dalle-Donne I y cols, 2003; Kayali R y cols, 2003; Telci A y cols, 2000; Çakatay U y cols, 2000). En nuestro estudio la hipercolesterolemia se asocia a discretas elevaciones en el MDA plasmático y urinario que, aunque no se correlacionan significativamente con los grupos carbonilo, no podemos descartar que jueguen un papel adicional en aumentar la oxidación proteica. Los grupos tiólicos de las proteínas (por ejemplo de la albúmina, la proteína más abundante del plasma) también pueden prevenir la aparición de grupos carbonilo proteicos actuando como secuestradores de especies oxidantes (Takenaka Y y cols, 1991; Shacter E, 2000). Este efecto preventivo también podría estar disminuido en nuestras condiciones experimentales dado que, como ya hemos señalado, nuestro estudio muestra ligeras disminuciones de esta reserva antioxidante (grupos SH

plasmáticos) en los grupos hipercolesterolémicos. Otra posibilidad no evaluada en nuestro estudio para explicar el incremento de grupos carbonilo proteicos implicaría también, pero por un doble mecanismo, al estrés oxidativo. En un primer paso el exceso de ROS promovería la liberación de iones divalentes unidos a proteínas (transferrina, ferritina, etc) los cuales, a su vez, se unirían a proteínas diana convirtiendo el sitio de unión en un centro de generación masiva de nuevas ROS que oxidarían directamente la proteína (Ramirez DC y cols, 2005; Dimitrov JD y cols, 2006). De hecho, los grupos carbonilo son uno de los productos mayoritarios de la oxidación sitio-específica de proteínas catalizada por metales de transición (Stadtman ER y Levine RL, 2000 y 2003; Alonso E y Rubio V, 1987 y 1995; Alonso E y cols, 1992)

La acción antioxidante de las estatinas, como ya hemos comentado, podría estar implicada en su efecto protector frente a la enfermedad cardiovascular (Shishehbor MH y cols, 2003; Haendeler J y cols, 2004; Pereira EC y cols, 2004). En apoyo de esta posibilidad el tratamiento con atorvastatina, pero no con simvastatina, se ha traducido en éste y en otros estudios (Dobreanu M y cols, 2002; Kowalski J y cols, 2005) en una disminución significativa de los niveles de diferentes marcadores de peroxidación lipídica. En el mismo sentido, la atorvastatina ha sido efectiva en nuestro estudio en restaurar la disminución de los niveles de grupos SH de los pacientes hipercolesterolémicos. Sin embargo, ni las estatinas en general, ni la simvastatina o atorvastatina en particular han reducido los niveles plasmáticos de grupos carbonilo proteicos en nuestro estudio. Carecemos, por el momento, de una explicación bioquímica satisfactoria para este resultado. Reseñar sin embargo, en este sentido, que trabajos recientes asignan los potentes efectos antioxidantes de las estatinas (fundamentalmente atorvastatina) a su acción sobre la regulación de vías metabólicas concretas implicadas en la generación/eliminación de ROS. Entre ellas se encontrarían la activación de tioredoxina por S-nitrosilación (Haendeler J y cols, 2004) y la inhibición de la aparición de oxidantes derivados de las vías de la mieloperoxidasa y del óxido nítrico (Shishehbor MH y cols, 2003). Nuestros resultados, que muestran disminución de la excreción urinaria de nitrato en pacientes tratados con atorvastatina, estarían de acuerdo con ésta última observación experimental. Cabe la posibilidad de

que la aparición de grupos carbonilo proteicos dependa, mayoritariamente, de vías redox insensibles a la acción de las estatinas.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en este estudio sobre la influencia de la hipercolesterolemia moderada sobre diferentes parámetros de daño oxidativo y del metabolismo de la arginina, realizados en tres muestras poblacionales seleccionadas: control, hipercolesterolémico e hipercolesterolémico tratado con estatinas nos permite establecer las siguientes conclusiones:

1. La evaluación comparativa y conjunta de los resultados para los cuatro marcadores de daño oxidativo analizados en este estudio (TBARM, hidroperóxidos lipídicos y grupos sulfhidrilo y carbonilo proteicos) confirma, en términos globales, la situación de estrés oxidativo asociada a la hipercolesterolemia y su parcial reversión por el tratamiento con estatinas.

2. Las condiciones particulares de este estudio, principalmente, el moderado grado de hipercolesterolemia de la población y la ausencia de pacientes con enfermedad cardiovascular complicada, permitirían explicar las discretas variaciones cuantitativas de la mayor parte de los marcadores de daño oxidativo evaluados (TBARM, hidroperóxidos lipídicos y grupos sulfhidrilo proteicos).

3. En el mismo sentido, la coexistencia en nuestro estudio de pacientes normotensos e hipertensos, y el hecho de que ciertos parámetros de daño oxidativo, como grupos sulfhidrilo y TBARM, alcancen diferencias estadísticamente significativas en función de su presencia, nos hacen plantear que la modificación oxidativa presente en la hipercolesterolemia sea mucho más discreta que para otros FRCV y que, para ser significativamente cuantificable, debe partirse de niveles de colesterol más elevados o pacientes con enfermedad cardiovascular complicada. En este sentido pueden orientarse nuevos estudios.

4. Los grupos carbonilo proteicos pueden representar el indicador más fiable de estrés oxidativo en condiciones de hipercolesterolemia moderada. Tal proposición se fundamenta en su elevación clara y significativa en la población hipercolesterolémica, su no afectación por el resto de variables incluidas en este estudio y su fuerte

correlación con los niveles de colesterol total y LDLc. La aparición de grupos carbonilo proteicos no es sensible al tratamiento con estatinas.

5. La evaluación conjunta de los resultados para los diferentes metabolitos relacionados con la arginina analizados en este estudio (NO, poliaminas y derivados metilados de la arginina) no apoya, en términos globales, alteraciones significativas del metabolismo de este aminoácido asociadas exclusivamente a condiciones de hipercolesterolemia moderada. Sí sugiere, sin embargo, la aparición de dichas alteraciones ante el efecto sumatorio de varias patologías de RCV (p.e. HTA).

6. Dado que la hipercolesterolemia no se asocia en nuestro estudio a cambios cuantitativamente detectables en los niveles plasmáticos o urinarios de nitrato (que guardan entre sí una excelente correlación), nuestros resultados no apoyan la hipótesis de que la hipercolesterolemia afecte la producción orgánica de óxido nítrico. Sin embargo, la excelente correlación observada entre nitrato urinario y TBARM, sí podría ser indicativa de alteraciones en la funcionalidad del NO bajo condiciones prooxidantes sobre las que la atorvastatina y la simvastatina tendrían efectos opuestos.

7. La coincidencia en la población femenina de nuestro estudio de una elevación significativa de los niveles de nitrato junto a una significativa disminución de ADMA, apoyaría el ampliamente descrito efecto protector de los estrógenos a nivel endotelial sobre la producción de NO e implicaría en este efecto, a nivel mecanístico, a los derivados metilados de la arginina.

8. La constancia de los niveles de ADMA en el rango de hipercolesterolemia manejado en este estudio, a diferencia de lo observado en otras muestras poblacionales, apoyaría la importancia del HDL colesterol como factor de protección del RCV y, probablemente, de otras condiciones bioquímicas de base asociadas a la dieta mediterránea.

9. La discreta variación de los niveles circulantes de poliaminas en nuestro estudio refuerza la importancia fisiológica de estos metabolitos cuyos niveles, de

acuerdo con numerosos estudios, tienden a mantenerse constantes ante cambios importantes de las condiciones fisiopatológicas.

BIBLIOGRAFÍA

Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P (2003). Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23(8)**:1455-1459.

Aguilar B, Rojas JC, Collados MT (2004). Metabolism of homocysteine and its relationship with cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis*, **18**:75-87.

Alexander RW (1995). Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: Oxidative stress and mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*, **25**:155-161.

Alonso E, Cervera J, García-España A, Bendala E, Rubio V (1992). Oxidative inactivation of carbamoyl phosphate synthetase (ammonia). Mechanism and sites of oxidation, degradation of the oxidized enzyme, and inactivation by glycerol, EDTA, and thiol protecting agents. *J Biol Chem*, **267(7)**:4524-4532.

Alonso E, Rubio V (1987). Inactivation of mitochondrial carbamoyl phosphate synthetase induced by ascorbate, oxygen, and Fe³⁺ in the presence of acetylglutamate: protection by ATP and HCO₃⁻ and lack of inactivation of ornithine transcarbamylase. *Arch Biochem Biophys*, **258(2)**:342-350.

Alonso E, Rubio V (1995). Affinity cleavage of carbamoyl-phosphate synthetase I localizes regions of the enzyme interacting with the molecule of ATP that phosphorylates carbamate. *Eur J Biochem*, **229(2)**:377-384.

Anber V, Griffin BA, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J (1996). Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis*, **124**:261-271.

Änggard E. (1994). Óxido nítrico: mediador, asesino y medicamento a la vez. *Lancet (Ed. Esp.)*, **25**:242-258.

Argimón JM, Jiménez J (1991). Métodos de investigación clínica y epidemiológica. ISBN: 84-8174-478-6. EDIDE S.L. Barcelona.

Armani A, Toth PP. (2006). Colesevelam hydrochloride in the management of dyslipidemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, **4(3)**:283-291.

Aronow WS, Ahn C (1994). Correlation of serum lipids with the presence or absence of coronary artery disease in 1793 men and women aged >62 years. *Am J Cardiol*, **73**:702-703.

Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, Vaccarino V, Harrison DG, Quyyumi AA (2006). The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. *J Am Coll Cardiol*, **47**:1005-1011.

Assman G, Cullen P, Schulte H (1998). The Münster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J*, **19** (suppl A):2-11.

Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS (1998). Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis*, **138**(2):271-280.

Balbis E, Patriarca S, Furfaro AL, Cottalasso D, Pronzato MA, Carlier P, Botta F, Marinari UM, Fontana L, Traverso N (2007). Oxidative stress and antioxidant defence in a healthy nonagenarian population. *Redox Rep*, **12**:59-62.

Ballantyne CM, Herd JA, Dunn JK, Jones PH, Farmer JA, Gotto AMJ (1997). Effects of lipid lowering therapy on progression of coronary and carotid artery disease. *Curr Opin Lipidol*, **8**:354-361.

Baron AD (1996). The coupling of glucose metabolism and perfusion in human skeletal muscle. The potential role of endothelium-derived nitric oxide. *Diabetes*, **45**:105-109.

Baylis C (2006). Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol*, **2**(4):209-220.

Baynes JW, Watkins NG, Fisher CI, Hull CJ, Patrick JS, Ahmed MU, Dunn JA, Thorpe SR (1989). The Amadori products on protein: structure and reactions. *Prog Clin Biol Res*, **304**:43-67.

Beamunt JL, Carlson LA, Cooper GR, Fajfar Z, Fredrickson DS, Strasser T (1970). Classification of Hyperlipoproteinemias. *Bull WHO* **43**:891-915.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(4):1620-1624.

Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A (2000). Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med*, **32**(3):164-176.

Bengtson C (1973). Ischaemic heart disease in women: a study based on a randomized population sample of women with myocardial infarction in Goteborg, Sweden. *Acta Med Scan Suppl*, **549**:121-128.

Betteridge J (2000). What is oxidative stress?. *Metabolism*, **49**:3-8.

Billecke SS, Kitzmiller LA, Northrup JJ, Whitesall SE, Kimoto M, Hinz AV, D'Alecy LG (2006). Contribution of whole blood to the control of plasma asymmetrical dimethylarginine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **291**(4):1788-1796.

Birukov KG (2006). Oxidized lipids: the two faces of vascular inflammation. *Curr Atheroscler Rep*, **8**(3):223-231.

Bissonnette S, Habib R, Sampalis F, Boukas S, Sampalis JS (2006). Efficacy and tolerability of ezetimibe 10 mg/day coadministered with statins in patients with primary hypercholesterolemia who do not achieve target LDL-C while on statin monotherapy: A Canadian, multicentre, prospective study-the Ezetrol(R) Add-On Study. *Can J Cardiol*, **22**(12):1035-1044.

Blair A, Shaul W, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem*, **274**(45):32512-32519.

Blum CB (1994). Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Am J Cardiol*, **73**:3D-11D.

Blumenthal RS, Gloth ST, Reis SE, Heldman AW, Resar JR, Coombs VJ (1996). Acute administration of estrogen improves coronary vasomotion in men. *J Am Col Cardiol*, **27**:287A.

Bode-Böger SM, Böger RH, Alfke H, Heinzl D, Tsikas D, Creutzig A, Alexander K, Frölich JC (1996a). L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia: a randomized, controlled study. *Circulation*, **93**:85-90.

Bode-Böger SM, Böger RH, Kienke S, Junker W, Frölich JC (1996b). Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun*, **219**:598-603.

Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Breithardt G, Fobker M, Reinecke H (2006). Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol*, **17**(4):1128-1134.

Böger RH, Bode-Böger SM, Mugge A, Kienke S, Brandes R, Dwenger A, Frolich JC (1995). Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis*, **117(2)**:273-284.

Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP (1998a). Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation*, **98**:1842-1847.

Böger RH, Bode-Böger SM, Phivthong-ngam L, Brandes RP, Schwedhelm E, Mugge A, Bohme M, Tsikas D, Frolich JC (1998b). Dietary L-arginine and alpha-tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms. *Atherosclerosis*, **141(1)**:31-43.

Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM (2000a). LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetric dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*, **87**:99-105.

Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR (2000b). Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**:1557-1564.

Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG (2001). Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci*, **100(2)**:161-167.

Böger RH (2003). The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res*, **59(4)**:824-833.

Böger RH, Tsikas D, Bode-Böger SM, Phivthong-Ngam L, Schwedhelm E, Frölich JC (2004). Hypercholesterolemia impairs basal nitric oxide synthase turnover rate: a study investigating the conversion of L-[guanidino-(15)N(2)]-arginine to (15)N-labeled nitrate by gas chromatography-mass spectrometry. *Nitric Oxide*, **11(1)**:1-8.

Borcea V, Nourooz-Zadeh J, Wolff SP, Klevesath M, Hofmann M, Urich H, Wahl P, Ziegler R, Tritschler H, Halliwell B, Nawroth PP (1999). α -Lipoic acid decreases oxidative stress even in diabetic patients with poor glycemic control and albuminuria. *Free Radic Biol Med*, **22**:1495-1500.

Brachet P, PrévotEAU H, Mathé V, Tomé D (1996). Modulation of putrescine transport in rat intestinal brush-border membrane vesicles by fasting and refeeding. *Digestion*, **57**:374-381.

Burnett JR, Huff MW (2006). Cholesterol absorption inhibitors as a therapeutic option for hypercholesterolaemia. *Expert Opin Investig Drugs*, **15(11)**:1337-1351.

Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC (1997). Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med*, **23**:361-366.

Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Ortega L, Perez F, Diaz C, Hernandez G, Egido J (1998). HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, **32(7)**:2057-2064.

Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE (1994). Aging is associated with endothelial dysfunction in men years before the age related decline in women. *J Am Coll Cardiol*, **24**:471-476.

Ceriello A (2000). Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*, **49**:27-29.

Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, McAuley E, Archer DB (1998). Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes*, **47**:945-952.

Chancharme L, Thérond P, Nigon F, Zarev S, Mallet A, Bruckert E, Chapman MJ (2002). LDL particle subclasses in hypercholesterolemia: molecular determinants of reduced lipid hydroperoxide stability. *J Lipid Res*, **43**:453-462.

Chapman GE, Wallace HM (1994). Spermine prevents lipid peroxidation induced by essential fatty acids in human breast cancer cells. *Biochem Soc Trans*, **22**:401.

Chen L, Haught WH, Yang B, Saldeen TG, Parathasarathy S, Mehta JL (1997). Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. *J Am Coll Cardiol*, **30(2)**:569-575.

Ciolino HP, Levine RL (1997). Modification of proteins in endothelial cell death during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **22**:1277-1282.

Cipolla B, Guille F, Moulinoux JP, Bansard JY, Roth S, Staerman F, Corbel L, Quemener V, Lobel B (1994). Erythrocyte polyamines and prognosis in stage D2 prostatic carcinoma patients. *J Urol*, **151**:629-633.

Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Förstermann U (1997). Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide*, **1(1)**:65-73.

Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E (1997). Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages: a novel mechanism of protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**:265-272.

Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Campagnola M, Pastorino AM, Lo Cascio V, Sawamura T (2001). The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL-receptor-1 reduces intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem*, **276**:13750-13755.

Cooke JP (2004). Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation*, **109(15)**:1813-1818.

Cooke JP (2005). ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med*, **10(1)**:11-17.

Cooke JP, Dzau VJ (1997). Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation*, **96(2)**:379-382.

Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Bernini F (1999). New insights into the pharmacodynamics and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther*, **84**:413-428.

Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Luscher TF (1998). BH₄ alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest*, **101**:1530-1537.

Cracowski JL, Stanke-Labesque F, Souvignet C, Bessard G (2000). Isoprostanes: new markers of oxidative stress in human diseases. *Presse Med*, **29**:604-611.

Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP (1992). L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*, **90**:1248-1253.

CTO Medicina S.L. Manual CTO de Medicina y Cirugía (2000). 3ed. Madrid: Cañizares artes gráficas S.A. p. 427.

Curzen NP, Griffiths MJD, Evans TW (1994). Role of the endothelium in modulating the vascular response to sepsis. *Clin Sci*, **86**:359-374.

Curzen NP, Jourdan KB, Mitchell JA (1996). Endothelial modification of pulmonary vascular tone. *Intensive Care Med*, **22**:596-607.

Çakatay U, Telci A, Salman S, Satman L, Sivas A (2000). Oxidative protein damage in type I diabetic patients with and without complications. *Endocr Res*, **26(3)**:365-379.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003a). Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*, **9(4)**:169-176.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003b). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, **329(1-2)**:23-38.

Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO (1995). Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg*, **82**:1598-1610.

Dayal S, Lentz SR (2005). ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med*, **10(1)**:27-33.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, **324**:1-18.

Dierkes J, Westphal S, Martens-Lobenhoffer J, Luley C, Bode-Böger SM (2004). Fenofibrate increases the L-arginine:ADMA ratio by increase of L-arginine concentration but has no effect on ADMA concentration. *Atherosclerosis*, **173(2)**:239-244.

Dietschy JM (1997). Theoretical considerations of what regulates low-density lipoprotein and high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Clin Nutr*, **65**:1581-1589.

Dimitrov JD, Ivanovska ND, Lacroix-Desmazes S, Doltchinkova VR, Kaveri SV, Vassilev TL (2006). Ferrous ions and reactive oxygen species increase antigen-binding and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. *J Biol Chem*, **281(1)**:439-446.

Drexler H (1998). Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol*, **82**:3S-4S.

Dobreanu M, Galateanu C, Simionescu A, Deac R (2002). Effects of Atorvastatin on some inflammatory parameters in severe primary hypercholesterolemia. *Rom J Intern Med*, **40(1-4)**:61-73.

Duan J, Murohara T, Ikeda H, Katoh A, Shintani S, Sasaki K, Kawata H, Yamamoto N, Imaizumi T (2000). Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hindlimb ischemia: nitric oxide-dependent mechanism. *Circulation*, **102**:370-376.

Durante W, Liao L, Peyton KJ, Schafer AI (1997). Lysophosphatidylcholine regulates cationic amino acid transport and metabolism in vascular smooth muscle cells. Role in polyamine biosynthesis. *J Biol Chem*, **272**:30154-30159.

Dubnoff JW (1957). Glycocyamine and creatine. *Methods Enzymol*, **III**:635-639.

Edwards JE, Moore RA (2003). Statins in hypercholesterolemia: A dose-specific meta-analysis of lipid changes in randomised, double blind trials. *BMC Fam Pract*, **4**:18.

Eich RF, Li T, Lemon DD, Doherty DH, Curry SR, Aitken JF, Mathews AJ, Johnson KA, Smith RD, Phillips GN, Olson JS (1996). Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*, **35**:6976-6983.

Eid HM, Eritsland J, Larsen J, Arnesen H, Seljeflot I (2003). Increased levels of asymmetric dimethylarginine in populations at risk for atherosclerotic disease. Effects of pravastatin. *Atherosclerosis*, **166**:279-284.

Ellman, GL (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, **82(1)**:70-77.

Endemann DH, Schiffrin EL (2004). Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, **15(8)**:1983-1992.

Espinosa O (2007). Estrés oxidativo y expresión de proteínas relacionadas en enfermedades de alto riesgo cardiovascular: estudio especial de la hipertensión arterial. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

Essig M, Nguyen G, Prie D, Escoubet B, Traer JD, Friedlander G (1997). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. *Circ Res*, **83**:683-690.

Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvado J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, Fiol M, Gómez-Gracia E, López-Sabater MC, Vinyoles E, Aros F, Conde M, Lahoz C, Lapetra J, Saez G,

Ros E, PREDIMED Study Investigators (2006). Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*, **145**:1–11.

Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL (1999). Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, **103**(6):897-905.

Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL (2001). Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation*, **103**(1):113-118.

Firuzi O, Mladenka P, Ricciari V, Spadaro A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L (2006). Parameters of oxidative stress status in healthy subjects: their correlations and stability after sample collection. *J Clin Lab Anal*, **20**:139-148.

Fliser D, Kronenberg F, Kielstein JT, Morath C, Bode-Böger SM, Haller H, Ritz E (2005). Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: the mild to moderate kidney disease study. *J Am Soc Nephrol*, **16**(8):2456-2461.

Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N (1997). Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet*, **349**:837-842.

Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS (1967). Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* **276**:32-44, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281.

Frei B (1999). On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med*, **222**:196-204.

Friedewald WT, Levy RI, Frederikson DS (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without the use of the ultracentrifuge. *Clin Chem*, **18**:499-502.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**:373-376.

García MD (2001). Aporte dietario de arginina y patología diabética. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Gaw A, Packard CJ, Murray EF (1993). Effects of simvastatin on apoB metabolism and LDL subfraction distribution. *Arterioscler Thromb*, **13**:170-189.

Genest J (2006). Combination of statin and ezetimibe for the treatment of dyslipidemias and the prevention of coronary artery disease. *Can J Cardiol*, **22(10)**:863-868.

Gergel D, Cederbaum AI (1997). Interaction of Nitric Oxide with 2-Thio-5-nitrobenzoic Acid: Implications for the Determination of Free Sulfhydryl Groups by Ellman's Reagent. *Arch Biochem Biophys*, **347(2)**:282-288.

Gibbons GH, Dzau VJ (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*, **330(20)**:1431-1438.

Gips SJ, Álvarez RJ, Miliken EE, Dang CV (1996). 17-Betaestradiol inhibits apoptosis of cultured endothelial cells. *J Am Coll Cardiol*, **27**:384A.

Giugliano D, Esposito K (2005). Mediterranean diet and cardiovascular health. *Ann N Y Acad Sci*, **1056**:253-260.

González I. (1997). Hipertensión arterial, diabetes y arterioesclerosis. La encrucijada del endotelio (I). *Hipertensión*, **14**:163-172.

Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB (2002). Biomarkers. *Mol aspects med*, **23**:101-208.

Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J (1998). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth cells in culture. *Circ Res*, **83**:490-500.

Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A (2006). Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res*, **99(9)**:924-932.

Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D (2002). Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, **105**:1656-1662.

Gylling H (2004). Cholesterol metabolism and its implications for therapeutic interventions in patients with hypercholesterolaemia. *Int J Clin Pract*, **58 (9)** 859-866.

Haendeler J, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S (2004). Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins. *Circulation*, **110**(7):856-861.

Halliwell B (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J*, **1**:358-364.

Halliwell B, Chirico S (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*, **57**(5):715-725.

Hamilton CA (1997). Low-density lipoprotein and oxidised low-density lipoprotein: their role in the development of atherosclerosis. *Pharmacol Ther*, **74**(1):55-72.

Hansen GH, Niels-Christiansen LL, Immerdal L, Danielsen EM (2003). Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut*, **52**:1414-1431.

Harrison DG (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, **100**:2153-2157.

Hayashi T, Esaki T, Sumi D, Mukherjee T, Iguchi A, Chaudhuri G (2006). Modulating role of estradiol on arginase II expression in hyperlipidemic rabbits as an atheroprotective mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**(27):10485-10490.

Hayoz D, Ziegler T, Brunner HR, Ruiz J (1998). Diabetes mellitus and vascular lesions. *Metabolism*, **47**:16-19.

Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, Munzel T (2000). BH₄ improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res*, **86**:36-41.

Heitzer T, Just H, Munzel T (1996). Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation*, **94**:6-9.

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104**(22):2673-2678.

Hermenegildo C, Medina P, Peiro M, Segarra G, Vila JM, Ortega J, and Lluch S (2002) Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**:5636-5640.

Higashino H, Miya H, Mukai H, Miya Y (2007). Serum nitric oxide metabolite (NO(x)) levels in hypertensive patients at rest: a comparison of age, gender, blood pressure and complications using normotensive controls. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **34(8)**:725-731.

Ho E, Bray TM (1999). Antioxidants, NFκB activation, and diabetogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, **222**:205-213.

Hoffman R, Brook GJ, Aviram M (1992). Hypolipidemic drugs reduce lipoprotein susceptibility to undergo lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis*, **93(1-2)**:105-113.

Hokanson JE, Austin M (1996). Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk*, **3**:213-229.

Hornig B, Kohler C, Drexler H (1997). Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation*, **95**:1115-1118.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, **109**:1125-1131.

Hrboticky N, Draude G, Hapfelmeier G, Lorenz R, Weber PC (1999). Lovastatin decreases the receptor-mediated degradation of acetylated and oxidized LDLs in human blood monocytes during the early stage of differentiation into macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19(5)**:1267-1275.

<http://www.fda.gov/.../conditions/atherosclerosis.html>

<http://www.medynet.com/elmedico/aula/tema12/hiper2.htm>

Hulthe J, Fagerberg B (2002). Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**:1162-1167.

Ichiki T, Takeda K, Tokunou T, Lino N, Egashira K, Shimokawa H, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A (2001). Downregulation of angiotensin II type 1 receptor by hydrophobic-3-hydroxy-3-

methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in vascular smooth cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**:1896-1901.

Inoue T, Uchida T, Kamishirado H, Takayanagi K, Morooka S (2001). Antibody against oxidized low density lipoprotein may predict progression or regression of atherosclerotic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, **37**:1871-1876.

Inouye M, Mio T, Sumino K (2000). Dicarboxylic acids as markers of fatty acid peroxidation in diabetes. *Atherosclerosis*, **148**:197-202.

Itabe H, Takano T (2000). Oxidized low density lipoprotein: the occurrence and metabolism in circulation and in foam cells. *J Atheroscler Thromb*, **7(3)**:123-131.

Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP (1999). Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, **99(24)**:3092-3095.

Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A (2001). Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. *Jpn Circ J*, **65**:775-778.

Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A (2002). Angiotensin-converting enzyme activity is involved in the mechanism of increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with diabetes mellitus. *Circ J*, **266**:811-815.

Ito MK (2003). Advances in the understanding and management of dyslipidemia: using niacin-based therapies. *Am J Health Syst Pharm*, **60(13 Suppl 2)**:15-21.

Janatuinen T, Laakso J, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimäki T, Raitakari OT, Knuuti J (2003). Plasma asymmetric dimethylarginine modifies the effect of pravastatin on myocardial blood flow in young adults. *Vasc Med*, **8(3)**:185-189.

Jang JJ, Ho HV, Kwan HH, Fajardo LF, Cooke JP (2000). Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia. Role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, **102**:1414-1419.

Jaubert AM, Mehebik-Mojaat N, Lacasa D, Sabourault D, Giudicelli Y, Ribière C (2007). Nongenomic estrogen effects on nitric oxide synthase activity in rat adipocytes. *Endocrinology*, **148(5)**:2444-2452.

Jenkins DJ, Kendall CW, Vidgen E, Agarwal S, Rao AV, Rosenberg RS, Diamandis EP, Novokmet R, Mehling CC, Perera T, Griffin LC, Cunnane SC (1999). Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum lipids, oxidative measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial. *Am J Clin Nutr*, **69**:395-402.

Jiang JL, Li NS, Li YJ, Deng HW (2002). Probuocol preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level. *Br J Pharmacol*, **135(5)**:1175-1182.

Kalinowski L, Dobrucki IT, Malinski T (2002). Cerivastatin potentiates nitric oxide release and eNOS expression through inhibition of isoprenoids synthesis. *J Physiol Pharmacol*, **53(4 Pt 1)**:585-595.

Kannel WB, Castelli WP, Goedon T, McNamara PM (1971). Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. *Ann Intern Med*, **74**:1-12.

Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Kugiyama K, Yasue H, Ogawa H (2002). Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is improved by L-arginine administration: possible role of oxidative stress. *Atherosclerosis*, **161(2)**:375-380.

Kawashima S, Yokoyama M (2004). Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24(6)**:998-1005.

Kayali R, Telci A, Cakatay U, Karaca C, Akcay T, Sivas A, Altug T (2003). Oxidative protein damage parameters in plasma in chronic experimental diabetes in rats. *Eur J Med Res*, **8(7)**:307-312.

Kempaiah RK, Srinivasan K (2004). Antioxidant status of red blood cells and liver in hypercholesterolemic rats fed hypolipidemic spices. *Int J Vitam Nutr Res*, **74(3)**:199-208.

Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC, Haller H, Ritz E, Fliser D (2002). Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol*, **13(1)**:170-176.

Kielstein JT, Impraïm B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Frölich JC, Hoepfer MM, Haller H, Fliser D (2004). Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation*, **109(2)**:172-177.

Kimura M, Kurose I, Russell J, Granger DN (1997). Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17(8)**:1521-1526.

Klag MJ, Ford DE, Mead LA, He J, Welton PK, Liang KY (1993). Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med*, **328**:313-318.

Knapp AC, Huang J, Starling G, Kiener PA (2000). Inhibitors of HMG-CoA reductase sensitize human smooth cells to fas-ligand and cytokine-induced cell death. *Atherosclerosis*, **152**:217-227.

Knowles R (1994). Nitric oxide synthases. *The Biochemist*, **Oct/Nov**:3-7.

Koh KK, Cardillo C, Bui MN, Hathaway L, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA, Cannon RO (1999). Vascular effects of estrogen and cholesterol-lowering therapies in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Circulation*, **99**(3):354-360.

Koh KK, Son JW, Ahn JY, Jin DK, Kim HS, Choi YM, Ahn TH, Kim DS, Shin EK (2004). Vascular effects of diet and statin in hypercholesterolemic patients. *Int J Cardiol*, **95**(2-3):185-191.

Kostner GM, Gavish D, Leopold B, Bolzano K, Weintraub MS, Breslow JL (1989). HMG-CoA reductase inhibitors lower LDL cholesterol without reducing Lp(a) levels. *Circulation*, **80**:1313-1319.

Kowalski J, Pawlicki L, Grycewicz J, Blaszczyk J, Irzmanski R, Ceglinski T, Kowalczyk E, Liban-Galka B (2005). Estimation of antioxidative effect of atorvastatin and fluvastatin used in primary prevention of coronary heart disease: effect on lipid peroxidation. *Wiad Lek*, **58**(7-8):386-390.

Kumar SA, Sudhahar V, Varalakshmi P (2006). Oxidative renal injury and lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic atherogenesis: Role of eicosapentaenoate-lipoate (EPA-LA) derivative. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **75**(1):25-31.

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefter DJ, Sessa WC, Walsh K (2000). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*, **6**:1004-1010.

Kurz S, Harrison DG (1997). Insulin and the arginine paradox. *J Clin Invest*, **99**:369-370.

Kuwai T, Hayashi J (2006). Nitric oxide pathway activation and impaired red blood cell deformability with hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*, **13**(6):286-294.

L'Abbé MR, Trick KD, Beare-Rogers JL (1991). Dietary (n-3) fatty acids affect rat heart, liver and aorta protective enzyme activities and lipid peroxidation. *J Nutr*, **121**:1331-1340.

Laboratorios Boehringer. Instrucciones de trabajo. Metódicas manuales de los Laboratorios Boehringer.

Lago F (2002). Dislipemias. Guías clínicas 2002; 3(17). Disponible en <http://www.fisterra.com/guias2/dislipemia.asp>

Lankin VZ, Lisina MO, Arzamastseva NE, Konovalova GG, Nedosugova LV, Kaminnnyi AI, Tikhaze AK, Ageev FT, Kukharchuk VV, Belenkov YN (2005). Oxidative stress in atherosclerosis and diabetes. *Bull Exp Biol Med*, **140(1)**:41-43.

Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation*, **97**:1129-1135.

Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG (2001). Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*, **103**:1282-1288.

Leborgne L, Fournadjiev J, Pakala R, Dilcher C, Cheneau E, Wolfram R, Hellinga D, Seaborn R, O'Tio F, Waksman R (2003). Antioxidants attenuate atherosclerosis plaque development in a balloon-denuded and-radiated hypercholesterolemic rabbit. *Cardiovasc Radiat Med*, **4(1)**:25-28.

Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P (2002). S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**:13527-13532.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A-G, Ahn B-W, Shaltiel S, Stadtman ER (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, **186**:465-478.

Li H, Förstermann U (2000). Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathology*, **190**:244-254.

Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igho-Pemu P, Lankford B, Morgan J, Nkemdechi S, Liu G, Pack C, Silvestrov N, von Deutsch DA, Song Q, Abukhalaf IK, Ofili E (2004). Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens*, **17(7)**:560-567.

Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP (2002). Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, **106**:987-992.

Lorgeril de M, Salen P, Defaye P (2005). Importance of nutrition in chronic heart failure patients. *Eur Heart J*, **26(21)**:2215-2217.

Loscalzo J, Welch G (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*, **38(2)**:87-104.

Lovaas E (1995). Hypothesis: spermine may be an important epidermal antioxidant. *Med Hypotheses*, **45**:59-67.

Lovaas E, Carlin G (1991). Spermine: an anti-oxidant and anti-inflammatory agent. *Free Radic Biol Med*, **11**:455-461.

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*, **120**: 227-237.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**:265-275.

Lubec B, Hayn M, Kitzmüller E, Vierhapper H, Lubec G (1997). L-Arginine reduces lipid peroxidation in patients with diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med*, **22**:355-357.

Lüscher TF, Tanner FC, Tschundi MR, Noll G (1993). Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annu Rev Med*, **44**:395-418.

Maas R, Wenske S, Zabel M, Ventura R, Schwedhelm E, Steenpass A, Klemm H, Noldus J, Böger RH (2005). Elevation of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and coronary artery disease in men with erectile dysfunction. *Eur Urol*, **48(6)**:1004-1011.

Mach F (2004). Statins as immunomodulatory agents. *Circulation*, **109(Suppl II)**:15-17.

Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, Leseche G, Tedgui A, Maclouf J, Murphy RC (1999). The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J Clin Invest*, **103(3)**:421-427.

Manolito TA, Furberg CD, Shemanski L (1993). Associations of postmenopausal estrogen use with cardiovascular disease and its risk in older women. *Circulation*, **88**:2163-2171.

Marangon K, Devaraj S, Jialal I (1999). Measurement of protein carbonyls in plasma of smokers and in oxidized LDL by an ELISA. *Clin Chem*, **45**:577-578.

Marin J, Moncada S (1997). Óxido nítrico y enfermedades vasculares. En: Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo. Real Academia de Farmacia. Fundación José Casares Gil. Madrid, 225-265.

Marketou ME, Zacharis EA, Nikitovic D, Ganotakis ES, Parthenakis FI, Maliaraki N, Vardas PE (2006). Early effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress and proinflammatory cytokines in hyperlipidemic subjects. *Angiology*, **57(2)**:211-218.

Marrugat J, Solanas P, D'Agostino R, Sullivan L, Ordovas J, Cerdón F, Ramos R, Sala J, Masia R, Rohlfs I, Elosua R, Kannel WB (2003). Estimación del riesgo coronario en España mediante la función de Framingham calibrada. *Rev Esp Cardiol*, **56**:253-261.

Martin MJ, Hulley SB, Brownwe WS, Kuller LH, Wentworth D (1986). Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implication from a cohort of 361.662 men. *Lancet*, **2**:933-939.

Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC, Beger HG, Morris SM, Brückner UB (1997). Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate and S-nitrosothiols. *Nitric Oxide*, **1**:177-189.

Masia R, Pena A, Marrugat J, Sala J, Pavesa M, Covas M (1998). High prevalence of cardiovascular risk factors in Gerona, Spain, a province with low myocardial infarction incidence. *J epidemiol Community Health*, **52**:707-715.

Mason RP, Walter MF, Jacob RF (2004). Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on endothelial function. Role of microdomains and oxidative stress. *Circulation*, **109(SII)**:34-41.

Mason RP, Walter MF, Day CA, Jacob RF (2005). Intermolecular differences of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors contribute to distinct pharmacologic and pleiotropic actions. *Am J Cardiol*, **96(5)**:11-23.

Massy ZA, Guijarro C (2001). Statins: effects beyond cholesterol lowering. *Nephrol Dial Transplant*, **16**:1738-1741.

Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L (2005). Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J chromatogr*, **827**:76-82.

Matsuguma K, Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Kaneyuki U, Shibata R, Fujimura T, Matsuoka H, Kimoto M, Kato S, Imaizumi T, Okuda S (2006). Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, **17**(8):2176-2183.

McGown CC, Brookes ZL (2007). Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. *Br J Anaesth*, **98**(2):163-175.

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF (1999). Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion. *Hypertension*, **34**:539-545.

Meneu V (2000). Metabolismo de la arginina en la patología diabética: estudio en humanos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Milstien S, Katusic Z (1999). Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**:681-684.

Mineo C, Shaul PW (2003). HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase. A novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc Med*, **13**:226-231.

Minor RL Jr, Myers PR, Guerra R Jr, Bates JN, Harrison DG (1990). Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest*, **86**(6):2109-2116.

Molcányiová A, Stancáková A, Javorský M, Tkác I (2006). Beneficial effect of simvastatin treatment on LDL oxidation and antioxidant protection is more pronounced in combined hyperlipidemia than in hypercholesterolemia. *Pharmacol Res*, **54**(3):203-207.

Mollnau H, Wendt M, Szocs K (2002). Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*, **90**:58-65.

Moncada S, Higgs A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, **329**:2002-2012.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1988a). The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, **12**(4):365-372.

Moncada S, Radomski MW, Palmer RM (1988b). Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol*, **37(13)**:2495-2501.

Morgan DML (1994a). Polyamines, arginine and nitric oxide. *Biochem Soc Trans*, **22**:879-883.

Morgan DML (1994b). Difluoromethylornithine (DFMO), an inhibitor of nitrite production by macrophages?. *Biochem Soc Trans*, **22**:389.

Morgan DML, Wallace HM (1994). Polyamines in clinical and basic science: introductory remarks. *Biochem Soc Trans*, **22**:845-846.

Morgan J, Carey C, Lincoff A, Capuzzi D (2004). High-density lipoprotein subfractions and risk of coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep*, **6(5)**:359-365.

Moriel P, Plavnik FL, Zanella MT, Bertolami MC, Abdalla DS (2000). Lipid peroxidation and antioxidants in hyperlipidemia and hypertension. *Biol Res*, **33(2)**:105-112.

Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM (1995). Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*, **41**:892-896.

Muldoon MF, Kritchevsky SB, Evans RW, Kagan VE (1996). Serum total antioxidant activity in relative hypo- and hypercholesterolemia. *Free Radic Res*, **25(3)**:239-245.

Mulhaupt F, Matter CM, Kwak BR, Pelli G, Veillard NR, Burger F, Graber P, Luscher TF, Mach F (2003). Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc Res*, **59**:755-756.

Muller C (1938). Xantomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. *Acta Med Scan Suppl*, **89**:75-84.

Muñiz J, Juane R, Hervada J, Lopez I, Castro A (1991). Concentraciones séricas de colesterol en la población gallega de 40-69 años de edad. *Clin Invest Arterioscl*, **3**:143-148.

Nacitarhan S, Ozben T, Tuncer N (1995). Serum and urine malondialdehyde levels in NIDDM patients with and without hyperlipidemia. *Free Radic Biol Med*, **19**:893-896.

Nadler JL, Winer L (1996). Free Radicals, nitric oxide, and diabetic complications. En: Diabetes mellitus. A fundamental and clinical text (LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM eds). *Lippincott-Raven Publishers, New York*,840-847.

Nakashima Y, Toyokawa Y, Tanaka S, Yamashita K, Yashiro A, Tasaki H, Kuroiwa A (1996). Simvastatin increases plasma NO²⁻ and NO³⁻ levels in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **127(1)**:43-47.

Napoli C, Ackah E, de Nigris F, del Soldato P, D'Armiento FP, Crimi E, Condorelli M, Sessa WC (2002). Chronic treatment with nitric oxide-releasing aspirin reduces plasma low-density lipoprotein oxidation and oxidative stress, arterial oxidation-specific epitopes, and atherogenesis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99(19)**:12467-12470.

Naseem KM (2005). The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*, **26(1-2)**:33-65.

Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM (2000). Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res*, **41**:1495-1508.

Neaton JD, Kuller LH, Wentworth D, Borhani NO (1984). Total and cardiovascular mortality in relation to cigarette smoking, serum cholesterol concentrations, and diastolic blood pressure among black and white males followed up for five years. *Am Heart J*, **108**:759-769.

Nijveldt RJ, Siroen MP, Teerlink T, van Leeuwen PA (2004). Elimination of asymmetric dimethylarginine by the kidney and the liver: a link to the development of multiple organ failure?. *J Nutr*, **134(10)**:2848-2852.

Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun*, **338**:668-676.

Nofer JR, Tepel M, Kehrel B (1997). Low-density lipoproteins inhibit the Na⁺/H⁺ antiport in human platelets: a novel mechanism enhancing platelet activity in hypercholesterolemia. *Circulation*, **95**:1370-1377.

Nourooz-Zadeh J, Smith CC, Betteridge DJ (2001). Measures of oxidative stress in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*, **156(2)**:435-441.

Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Samardi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP (1995). Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes*, **44**:1054-1058.

Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP (1994). Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem*, **220**:403-409.

Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Ling KL, Wolff SP (1996). Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem J*, **313**:781-786.

Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, Himmelfarb J (2004). Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int*, **65**(3):1009-1016.

Okamoto K, Yamori Y, Nagaoka A (1974). Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ Res*, **34**(1):143-153.

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*, **91**(6):2546-2551.

Oliva MR, Sáez GT (1996). Radicales libres y cáncer. En: Nutrición y cáncer. X Ciclo de Estudios sobre Alimentación y Nutrición de la Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. pp: 71-87.

Omori H, Nagashima H, Tsurumi Y, Takagi A, Ishizuka N, Hagiwara N, Kawana M, Kasanuki H (2002). Direct in vivo evidence of a vascular statin: a single dose of cerivastatin rapidly increases vascular endothelial responsiveness in healthy normocholesterolemic subjects. *Br J Clin Pharmacol*, **54**:395-399.

Otieno MA, Kensler TW (2000). A role for protein kinase C-delta in the regulation of ornithine decarboxylase expression by oxidative stress. *Cancer Res*, **60**:4391-4396.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, **87**(1):315-424.

Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO (1995). Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation*, **91**:1732-1738.

Pegg AE, Shantz LM, Coleman CS (1994). Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation. *Biochem Soc Trans*, **22**:846-852.

Pegg AE, Xiong H, Feith DJ, Shantz LM (1998). S-Adenosylmethionine decarboxylase: structure, function and regulation by polyamines. *Biochem Soc Trans*, **26**:580-586.

Pennathur S, Heinecke JW (2007). Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *Curr Diab Rep*, **7(4)**:257-264.

Peña (de la) NC, Sosa-Melgarejo JA, Ramos RR, Mendez JD (2000). Inhibition of platelet aggregation by putrescine, spermidine, and spermine in hypercholesterolemic rabbits. *Arch Med Res*, **31(6)**:546-550.

Pereira EC, Bertolami MC, Faludi AA, Sevanian A, Abdalla DS (2004). Antioxidant effect of simvastatin is not enhanced by its association with alpha-tocopherol in hypercholesterolemic patients. *Free Radic Biol Med*, **37**:1440-1448.

Pérez-Méndez O (2004). High density lipoproteins (HDL). A therapeutic objective in the atherosclerosis prevention?. *Arch Cardiol Mex*, **74(1)**:53-67.

Pieper GM (1998). Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes. Protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension*, **31**:1047-1060.

Pieper GM, Jordan M, Dondlinger LA, Adams MB, Roza AM (1995). Peroxidative stress in diabetic blood vessels. Reversal by pancreatic islet transplantation. *Diabetes*, **44**:884-889.

Pietsch A, Erl W, Lorenz RL (1996). Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells. *Biochem Pharmacol*, **52(3)**:433-439.

Prasard K, Lee P (2003). Suppression of oxidative stress as a mechanism of reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by aspirin. *J Cardiovasc Ther*, **8(1)**:61-69.

Pratico D, Iuliano L, Mauriello A, Spagnoli L, Lawson JA, Rokach J, Maclouf J, Violi F, FitzGerald GA (1997). Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, **100(8)**:2028-2034.

Pritchard KA, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, Wolin MS, Stemerman MB (1995). Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res*, **77(3)**:510-518.

Puddu GM, Cravero E, Arnone G, Muscari A, Puddu P (2005). Molecular aspects of atherogenesis: new insights and unsolved questions. *J Biomed Sci*, **12(6)**:839-853.

Ramirez DC, Mejiba SE, Mason RP (2005). Copper-catalyzed protein oxidation and its modulation by carbon dioxide: enhancement of protein radicals in cells. *J Biol Chem*, **280(29)**:27402-27411.

Ramos R, Solanas P, Cerdón F, Rohlfs I, Elosua R, Sala J, Masia R, Faixedas MT, Marrugat J (2003). Comparación de la función de Framingham original y la calibrada del REGICOR en la predicción del riesgo coronario poblacional. *Med Clin (Barc)*, **121**:521-526.

Razani B, Woodman SE, Lisanti MP (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*, **54(3)**:431-467.

Rauhala P, Sziraki I, Chiueh CC (1996). Peroxidation of brain lipids in vitro: nitric oxide versus hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med*, **21**:391-394.

Reilly MP, Delanty N, Roy L, Rokach J, Callaghan PO, Crean P, Lawson JA, FitzGerald GA (1997). Increased formation of the isoprostanes IPF_{2α}-I and 8-epi-prostaglandin F_{2α} in acute coronary angioplasty: evidence for oxidant stress during coronary reperfusion in humans. *Circulation*, **96(10)**:3314-3320.

Resch U, Tatzber F, Budinsky A, Sinzinger H (2006). Reduction of oxidative stress and modulation of autoantibodies against modified low-density lipoprotein after rosuvastatin therapy. *Br J Clin Pharmacol*, **61(3)**:262-274.

Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Muller MR, Husslein P, Kashanipour A, Minar E, Baghestaian M (2002). Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**:1194-1199.

Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E (1999). Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) investigators. *Circulation*, **100**:230-235.

Rodríguez JC, Calonge S, Bichara G (1993). Prevalencia de los factores de riesgo de cardiopatía isquémica en la isla de Lanzarote. *Med Clin (Barc)*, **111**:546-551.

Rojas A, Figueroa H, Re L, Morales MA (2006). Oxidative Stress at the Vascular Wall. Mechanistic and Pharmacological Aspects. *Arch Med Res* 37:436–448.

Rosenson RS (2004). Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis*, 173:1-12.

Ross R (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, 138:419-420.

Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I, Di Simplicio P (2001). Physiological levels of S-nitrosothiols in human plasma. *Circ Res*, 89(12):47.

Rubanyi GM (1993). The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, 22(S4):1-14.

Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 269:26066-26075.

Sakai M, Kobori S, Matsumura T, Biwa T, Sato Y, Takemura T, Hakamata H, Horiuchi S, Shichiri M (1997). HMG-CoA reductase inhibitors suppress macrophage growth induced by oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 133(1):51-59.

Sánchez De Medina F (2000). Patología molecular de las HDL. *Ars Pharmaceutica*, 41(1):59-65.

Santaolaria ML (2001). Alteraciones en el metabolismo de la arginina y daño oxidativo en la hipertensión arterial y en la diabetes: estudio en humanos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Santos MT, Valles J, Aznar J, Vilches J (1980). Determination of plasma malondialdehyde-like material and its clinical application in stroke patients. *J Clin Pathol*, 33:973-976.

Sardo MA, Castaldo M, Cinquegrani M, Bonaiuto M, Maesano A, Versace A, Spadaro M, Campo S, Nicocia G, Altavilla D, Saitta A (2002). Effects of atorvastatin treatment on sICAM-1 and plasma nitric oxide levels in hypercholesterolemic subjects. *Clin Appl Thromb Hemost*, 8(3):257-263.

Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T (2005). Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res*, 97(5):53-59.

Schönbeck U, Libby P (2004). Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation*, **109(21)**:18-26.

Scott J (2004). Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr Opin Genet Dev*, **14(3)**:271-279.

Seghieri G, Gironi A, Mammini P, Alviggi L, DeGiorgio LA, Bartolomei G, Ignesti G, Franconi F (1992). Erythrocyte spermidine levels in IDDM patients. *Diabetes Care*, **15**:543-545.

Seghieri G, Anichini R, Ciuti M, Gironi A, Bennardini F, Franconi F (1997). Raised erythrocyte polyamine levels in non-insulin-dependent diabetes mellitus with great vessel disease and albuminuria. *Diabetes Res Clin Pract*, **37**:15-20.

Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Rivière J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A (2002). Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta*, **321**:89-96.

Sehayek E, Butbul E, Avner R (1994). Enhanced cellular metabolism of very low density lipoprotein by simvastatin: a novel mechanism of action of HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Clin Invest*, **24**:173-178.

SemFYC (Sociedad española de Medicina Familiar y Comunitaria), papps (Programa de Actividades Preventivas y de Promoción de la salud) (2004). Disponible en <http://www.papps.org/publicaciones/index.html>

SemFYC (Sociedad española de Medicina Familiar y Comunitaria), grupo de dislipemias (2003). Recomendaciones semfyc-Dislipemias 2ªed. Barcelona.

Shacter E (2000). Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*, **319**:428-436.

Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL, Hazen SL (2003). Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation*, **108(4)**:426-431.

Simionescu M, Stancu C, Costache G, Sima A (2002). Endothelial cell response to hyperlipemia. Activation-dysfunction-injury, the protective role of simvastatin. *Vascul Pharmacol*, **38(5)**:275-282.

Sinclair DG, Braude S, Haslam PL, Evans TW (1994). Pulmonary endothelial permeability in patients with severe lung injury: Clinical correlates and natural history. *Chest*, **106**:535-539.

Singh S, Evans TW (1997). Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J*, **10**:699-707.

Skrha J, Stulc T, Hilgertova J, Weiserova H, Kvasnicka J, Ceska R (2004). Effect of simvastatin and fenofibrate on endothelium in Type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol*, **493(1-3)**:183-189.

Smith CL, Anthony S, Hubank M, Leiper JM, Vallance P (2005). Effects of ADMA upon gene expression: an insight into the pathophysiological significance of raised plasma ADMA. *PLoS Med*, **2(10)**:264.

Södergren E, Nourooz-Zadeh J, Berglund L, Vessby B (1998). Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *J Biochem Biophys Methods*, **37**:137-146.

Spiteller G (1996). Enzymic lipid peroxidation - a consequence of cell injury? *Free Radic Biol Med*, **21**:1003-1009.

Stadtman ER, Levine RL (2000). Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci*, **899**:191-208.

Stadtman ER, Levine RL (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, **25(3-4)**:207-218.

Stancu C, Niculescu L, Toporan D, Sima A, Ioan A, simionescu M (2001). Statins produce antiatherosclerosis effects in coronary Herat disease patients. Proceedings of the Romanian Academy (in press).

Stancu C, Sima A (2001). Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*, **5(4)**:378-387.

Stanley BA, Shantz LM (1994). S-Adenosylmethionine decarboxylase structure-function relationships. *Biochem Soc Trans*, **22**:863-869.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, **320(14)**:915-924.

Steinmetz KL, Schonder KS (2005). Colesevelam: potential uses for the newest bile resin. *Cardiovasc Drug Rev*, **23(1)**:15-30.

Stokes KY, Cooper D, Taylor A, Granger DN (2002). Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med*, **33(8)**:1026-1036.

Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Luscher T, Rabelink T (1997). BH₄ restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest*, **99**:41-46.

Stroes ES, Koomans HA, de Bruin TW, Rabelink TJ (1995). Vascular function in the forearm of hypercholesterolemic patients off and on lipid-lowering medication. *Lancet*, **346**:467-471.

Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP (2001). Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, **104**:2569-2575.

Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JC (1999). Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, **33**:652-658.

Sydow K, Münzel T (2003). ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis Suppl*, **4**:41-51.

Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A (1993). Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*, **21**:929-933.

Tadolini B (1988). Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipids polar heads. *Biochem J*, **249**:33-36.

Takenaka Y, Miki M, Yasuda H, Mino M (1991). The effect of α -tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. *Arch Biochem Biophys*, **285**:344-350.

Tanaka S, Yashiro A, Nakashima Y, Nanri H, Ikeda M, Kuroiwa A (1997). Plasma nitrite/nitrate level is inversely correlated with plasma low-density lipoprotein cholesterol level. *Clin Cardiol*, **20(4)**:361-365.

Teerlink T (2005). ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med*, **10(1)**:73-81.

Teixeira D (1999). Repercusiones metabólicas y fisiológicas de la manipulación de arginina en el ratón. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Teixeira D, Santaolaria ML, Meneu V, Alonso E (2002). Dietary arginine slightly and variably affects tissue polyamine levels in male swiss albino mice. *J Nutr*, **132(12)**:3715-3720.

Teixeira D, Santaolaria M, Alonso E (2003). La arginina en su contexto metabólico y fisiológico. *Acta Bioquím Clín Lat*, **37(2)**:165-179.

Telci A, Cakatay U, Kayali R, Erdoğan C, Orhan Y, Sivas A, Akçay T (2000). Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res*, **32(1)**:40-43.

Tentolouris C, Tousoulis D, Stefanadis C (2004). L-Arginine "paradox" in coronary atherosclerosis. *Circulation*, **110(7)**:e71.

Thannhauser SJ, Magendatz H (1938). The different clinical groups of xanthomatous disease: a clinical physiological study of 22 cases. *Ann Intern Med*, **11**:1662-1746.

Thomas MK, Narang D, Lakshmy R, Gupta R, Naik N, Maulik SK (2006). Correlation between inflammation and oxidative stress in normocholesterolemic coronary artery disease patients 'on' and 'off' atorvastatin for short time intervals. *Cardiovasc Drugs Ther*, **20(1)**:37-44.

Tokoro T, Wang J, Kitajima I (2003). The novel HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin, induces a protective action in vascular endothelial cells through the production of nitric oxide (NO). *Yakugaku Zasshi*, **124(3)**:121-126.

Tosukhowong P, Sangwatanaroj S, Jatuporn S, Prapunwattana P, Saengsiri A, Rattanapruks S, Srimahachota S, Udayachalerm W, Tangkijvanich P (2003). The correlation between markers of oxidative stress and risk factors of coronary artery disease in Thai patients. *Clin Hemorheol Microcirc*, **29(3-4)**:321-329.

Touyz RM, Chen X, Tabet F (2002). Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res*, **90**:1205-1213.

Tsikas D, Böger RH, Sandmann J, Bode-Böger SM, Frölich JC (2000). Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett*, **478**:1-3.

Tsunekawa T, Hayashi T, Kano H, Sumi D, Matsui-Hirai H, Thakur NK, Egashira K, Iguchi A (2001). Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, improves endothelial function in elderly diabetic patients within 3 days. *Circulation*, **104(4)**:376-379.

Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ (2000). High density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. ***J Biol Chem***, **275(15)**:11278-11283.

U.S. Preventive Task Force, 2000. ***Am J Prev Med***, **20(suppl 3)**:73-76.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis i chronic renal failure. ***Lancet***, **339**:572-575.

Vallance P, Calver A, Collier J (1992). The vascular endothelium in diabetes and hypertension. ***J Hypertens Suppl***, **10(1)**:25-29.

Vane JR, Anggård EE, Botting RM (1990). Regulatory functions of the vascular endothelium. ***N Engl J Med***, **323(1)**:27-36.

Vasankari T, Ahotupa M, Toikka J, Mikkola J, Irjala K, Pasanen P, Neuvonen K, Raitakari O, Viikari J (2001). Oxidized LDL and thickness of carotid intima-media are associated with coronary atherosclerosis in middle-aged men: lower levels of oxidized LDL with statin therapy. ***Atherosclerosis***, **155**:403-412.

Vaughan CJ, Gotto AM, Basson CT (2000). The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. ***J Am Coll Cardiol***, **35**:1-10.

Velasco JA (2000). Guías de práctica clínica en prevención cardiovascular y rehabilitación cardíaca. ***Rev Esp Cardiol***, **53**:1095-1120.

Vergnani L, Hatric S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovych V, Fellin R, Malinski T (2000). Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability. ***Circulation***, **101(11)**:1261-1266.

Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Corti R, Badimon JJ (2003). Emerging importance of HDL cholesterol in developing high-risk coronary plaques in acute coronary syndromes. ***Curr Opin Cardiol***, **18(4)**:286-294.

Xu CB, Stenman E, Edvinsson L (2002). Reduction of bFGF-induced smooth muscle cell proliferation and endothelin receptor mRNA expresión by mevastatin and atorvastatin. ***Biochem Pharmacol***, **64**:497-505.

- Wander RC, Du S-H, Ketchum SO, Rowe KE (1996). Tocopherol influences in vivo indices of lipid peroxidation in postmenopausal women given fish oil. *J Nutr*, **126**:643-652.
- Wang DQ (2006). Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption. *Annu Rev Physiol*, **69**:221-248.
- Wascher TC, Posch K, Wallner S, Hermetter A, Kostner GM, Graier WF (1997). Vascular effects of L-arginine: anything beyond a substrate for the NO-synthase? *Biochem Biophys Res Commun*, **234**:35-38.
- Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Konkol C, Sauer H, Bohm M, Nickenig G (2001). Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol*, **59**(3):646-654.
- Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Steinbeck G, Seidel D, Reichart B (1997). Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation: a four-year randomized trial. *Circulation*, **96**:1398-1402.
- Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson A-S, Waagstein F (1993). Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res*, **73**:1121-1127.
- Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA (1996). Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*, **27**:567-574.
- Włodek PJ, Smolenski OB, Chwatko G, Iciek MB, Miłkowski A, Bald E, Włodek L (2006). Disruption of thiol homeostasis in plasma of terminal renal failure patients. *Clin Chim Acta*, **366**:137-145.
- Wolff SP (1993). Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the etiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull*, **49**:642-652.
- Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK (2003a). Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**:729-736.
- Wolfrum S, Grimm M, Heidbreder M, Dendorfer A, Katus HA, Liao JK, Richardt G (2003b). Acute reduction of myocardial infarct size by a hydroxy-methyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor is mediated by endothelial nitric oxide synthase. *J Cardiovasc Pharmacol*, **41**:474-480.

Wong ND, Cupples LA, Ostfeld AM, Levy D, Kannel WB (1989). Risk factors for long term coronary prognosis after initial myocardial infarction: the Framingham heart Study. *Am J Epidemiol*, **130**:469-480.

Wu G, Morris S (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, **336**:1-17.

Ziegler S, Mittermayer F, Plank C, Minar E, Wolzt M, Schernthaner GH (2005). Homocyst(e)ine-lowering therapy does not affect plasma asymmetrical dimethylarginine concentrations in patients with peripheral artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*, **90(4)**:2175-2178.

Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R (2001). Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*, **358(9299)**:2113-2117.

Zou MH, Shi C, Cohen RA (2002). Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric-oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*, **109**:817-826.