



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

Efecto del entrenamiento físico sobre los factores endoteliales en el sistema arterial de conejo

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Patricia Marchio

Dirigida por:

Dra. María Dolores Mauricio Aviñó

Dr. José M^a Vila Salinas

Valencia, noviembre de 2015

Dña. María Dolores Mauricio Aviñó, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia y **D. José M^a Vila Salinas**, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN: Que **Patricia Marchio** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado «**Efecto del entrenamiento físico sobre los factores endoteliales en el sistema arterial de conejo**» para optar al Grado de Doctora.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia a 13 de noviembre de 2015.

Fdo.:

Dra. María Dolores Mauricio Aviñó

Fdo.:

Dr. José M^a Vila Salinas

Este trabajo ha sido subvencionado en parte por el Ministerio de Ciencia e Innovación con una ayuda otorgada al proyecto de investigación con referencia DEP2010-22318-C02-01.

Agradecimientos

Al Profesor Salvador Lluch, por haberme aceptado en su equipo de investigación y de quien siempre estamos todos aprendiendo.

A mis directores. A la Dra. María Dolores Mauricio, por haberme formado en la técnica del baño de órganos y por haberme guiado durante toda la tesis. Al Dr. José Vila, por dirigir esta tesis y hacerla posible. Gracias por todo lo que he aprendido a su lado estos años, tanto a nivel científico como humano.

Al Dr. Martín Aldasoro, por haber apreciado desde el principio mi vocación por la investigación y mi motivación para realizar esta tesis. Gracias por su inestimable ayuda durante todos estos años.

A los Doctores Luis Such, Antonio Alberola y Javier Chorro por haber puesto a nuestra disposición el modelo de entrenamiento utilizado, su laboratorio y quirófano experimental para la obtención de muestras y por el calor humano que desprende su grupo. A cada uno de los integrantes y colaboradores de su equipo de investigación, y en especial, a los Dres. Laia Brines, Germán Parra, Irene del Canto, Luis Such Miquel, Manuel Zarzoso, Natalia Guerrero, a Carlos Soler, Patricia Genovés, Oscar Arias, Daniel Ferrer y Catia Alves. Gracias por haberme hecho sentir siempre bienvenida en su laboratorio y por su compañerismo.

A la Dra. Soraya Vallés, por confiar en mí y darme la oportunidad de continuar creciendo en el campo de la investigación básica.

A mi compañera Solanye Guerra, por trabajar junto a mí en el laboratorio compartiendo gratos momentos, y por ayudarme en esta tesis.

A los Dres. Gloria Segarra y Pascual Medina, por haberme ayudado cada vez que lo he necesitado.

A las secretarias, por su eficiencia, y, en general, a todos los miembros del Departamento de Fisiología de la Universitat de Valencia.

ÍNDICE

<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
1. Ejercicio físico.....	3
2. Regulación del tono vascular.....	5
2.1. Factores relajantes derivados del endotelio.....	7
2.1.1. Óxido nítrico	7
2.1.1.1. Sistema DDAH - ADMA - NOS.....	12
2.1.2. Prostanoides	13
2.1.3. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio	16
2.1.3.1. Canales de potasio	19
2.2. Factores contráctiles dependientes del endotelio	21
2.3. Ejercicio físico y función endotelial	22
3. Sistema simpático.....	25
3.1. Efectos del ejercicio sobre la respuesta simpática.....	27
<i>HIPÓTESIS</i>	29
<i>OBJETIVOS</i>	33
1. Objetivo general	35
2. Objetivos concretos	35
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	37
1. Grupos de estudio y protocolo de entrenamiento.....	39
2. Extracción de las muestras	40
3. Determinación de la actividad de la enzima citrato sintasa.....	43
4. Estudio de la reactividad vascular	44
4.1. Preparación de las muestras para el baño de órganos.....	44
4.2. Determinación de la tensión pasiva óptima.....	46
4.3. Obtención de las curvas concentración-respuesta	46
4.3.1. Nitroprusiato sódico	47
4.3.2. Acetilcolina.....	47

4.3.3.	Cloruro potásico.....	48
4.3.4.	Endotelina-1	48
4.3.5.	Noradrenalina	48
4.4.	Obtención de las curvas frecuencia-respuesta.....	49
5.	Determinación de los niveles plasmáticos de óxido nítrico	49
6.	Determinación de los niveles plasmáticos de L-arginina y ADMA .	50
7.	Fármacos y soluciones.....	52
8.	Cálculos y análisis estadístico	53
<i>RESULTADOS</i>		55
1.	Actividad de la enzima citrato sintasa	57
2.	Curvas concentración-respuesta	58
2.1.	Respuesta al nitroprusiato sódico.....	58
2.2.	Respuesta a la acetilcolina	61
2.2.1.	Participación de los factores relajantes derivados del endotelio.....	65
2.2.1.1.	Arteria carótida	65
2.2.1.2.	Arteria renal	69
2.2.1.3.	Arteria femoral	73
2.3.	Respuesta al KCl	77
2.4.	Respuesta a la endotelina.....	80
2.5.	Respuesta a la noradrenalina exógena	83
3.	Respuesta a la noradrenalina endógena (estímulo eléctrico).....	86
3.1.	Naturaleza del estímulo eléctrico.....	86
3.2.	Curvas frecuencia-respuesta	87
4.	Niveles plasmáticos de NOx, L-Arginina y ADMA	90
<i>DISCUSIÓN</i>		93
1.	Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental	95
2.	Justificación de la elección de la especie y los vasos de estudio	96
3.	Efectividad del entrenamiento	96

4.	Respuesta relajante	98
4.1.	Arteria carótida	99
4.2.	Arteria renal	103
4.3.	Arteria femoral	105
5.	Respuesta contráctil	108
5.1.	Respuesta contráctil inespecífica.	108
5.2.	Respuesta contráctil dependiente de receptor.	110
6.	Niveles plasmáticos de nitratos y nitritos, L-Arginina y ADMA ...	112
7.	Consideraciones finales	114
	<i>CONCLUSIONES</i>	119
	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	123

INTRODUCCIÓN

1. Ejercicio físico

El sedentarismo se ha convertido en un problema de salud pública relacionado con la vida moderna. Es un factor de riesgo independiente para la aterosclerosis y enfermedad cardiovascular y se estima que es responsable de aproximadamente un tercio de las muertes por enfermedad coronaria, cáncer de colon o diabetes tipo 2 (1-4).

Aproximadamente el 50% de las muertes por enfermedad cardiovascular aterosclerótica podría prevenirse con la modificación del estilo de vida. Sin embargo, la mayoría de las personas pasan más del 50% de su tiempo realizando actividades sedentarias (5). A nivel vascular, la inactividad se asocia con cambios en la estructura arterial, produciendo remodelación vascular. La función vasodilatadora parece estar conservada pero se produce un aumento persistente de la actividad vasoconstrictora, principalmente a expensas de la endotelina-1 (ET-1) y la angiotensina II (AT-II) (2,6).

El término actividad física o ejercicio físico se refiere a cualquier movimiento corporal que ocasiona una contracción de la musculatura esquelética y consumo de energía. Concretamente, el entrenamiento es una actividad física regular, estructurada, con el objetivo de mejorar y/o mantener el estado físico y el bienestar (7). La práctica regular de ejercicio físico se asocia con una reducción del 20-40% de la incidencia de eventos vasculares primarios y secundarios y del riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular (1,2,8). Para lograr efectos beneficiosos en adultos, se recomienda la realización de al menos 150 minutos semanales de actividad física aeróbica de intensidad moderada o 75 minutos de actividad vigorosa, o una combinación de ambas, en sesiones de un mínimo de 10 minutos de duración cada una, asociadas a la práctica de actividades de fortalecimiento de los grandes grupos musculares, al menos dos veces por semana (9).

Los beneficios clínicos del entrenamiento no se limitan a la prevención y tratamiento de las enfermedades ateroscleróticas como la hipertensión, los accidentes cerebrovasculares o la enfermedad coronaria, sino que también involucran a la diabetes tipo 2, la osteoporosis, la obesidad, la depresión o las enfermedades neurodegenerativas. Además, reduce la probabilidad de padecer algunos tipos de cáncer, como el de colon y el de mama, y previene la pérdida de autonomía en las personas mayores (3,4,10). Sin embargo, al menos un 40% de los beneficios del ejercicio no pueden atribuirse solo a la modificación de los factores de riesgo, sino que también estarían relacionados con los efectos directos y repetitivos que produce el ejercicio sobre la pared vascular, induciendo adaptaciones tanto funcionales como estructurales (2,11).

En reposo, el corazón proporciona un gasto cardíaco suficiente para mantener las necesidades metabólicas basales y la tensión arterial dentro de valores normales. El inicio agudo de la contracción muscular que provoca el ejercicio aumenta la demanda muscular de nutrientes y de oxígeno (12). Durante el ejercicio se produce una distribución del gasto cardíaco con un aumento del flujo sanguíneo hacia el corazón y el músculo esquelético activo para mantener una tensión arterial adecuada en respuesta a la vasodilatación inducida por el ejercicio (12–14). Esto se logra a expensas de una reducción del flujo sanguíneo a los órganos poco activos o inactivos, como el músculo esquelético que no participa en el ejercicio, la piel, la circulación renal o la esplácnica. Esta disminución se atribuye principalmente a un aumento de la resistencia por vasoconstricción inducida por predominio simpático y liberación de sustancias contráctiles (12–14).

2. Regulación del tono vascular

El tono vascular es la propiedad que tienen los vasos de aumentar o disminuir la tensión de sus paredes en respuesta a un determinado estímulo. Está regulado por la influencia simultánea de sustancias vasoactivas intravasculares (hormonas y derivados plaquetarios), neurotransmisores (sistema nervioso autónomo perivascular (15)) y la producción de sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio (16–18).

El endotelio es un órgano formado por una capa de células que recubre la superficie interna del sistema vascular y linfático. Altamente especializado y metabólicamente muy activo, ejerce un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular (16,19). Además de mantener la integridad estructural y funcional del vaso, el endotelio desempeña múltiples funciones a través de acciones autocrinas, paracrinas y endocrinas. Entre éstas se encuentra el mantenimiento del tono vascular y por consiguiente del flujo sanguíneo, la regulación de la reactividad de las células circulantes y de la permeabilidad vascular, además de intervenir en las respuestas inmunitaria, inflamatoria y hemostática (16–18).

Una propiedad fundamental de la célula endotelial es la heterogeneidad, tanto en su estructura como en su función. Los fenotipos de las células endoteliales varían entre los diferentes órganos, entre los diferentes segmentos del vaso dentro del mismo órgano, y entre las células endoteliales vecinas de un mismo órgano y tipo de vaso sanguíneo. Esta heterogeneidad implica diferencias en la capacidad de expresión de antígenos de superficie y de receptores dependiendo del lecho vascular, lo que se traduce en la posibilidad de generar diferentes respuestas a un mismo estímulo (16,19–21).

Los efectos endoteliales sobre la regulación del tono del músculo liso vascular se deben a la producción y liberación de potentes agentes

vasodilatadores y vasoconstrictores. Los factores vasodilatadores más importantes liberados por el endotelio son el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF); y los contráctiles, los aniones superóxido (O₂⁻), los endoperóxidos derivados de la ciclooxigenasa (COX) como el tromboxano A₂ (TXA₂), y la ET-1 (22,23) (Figura 1). Estas sustancias se liberan en respuesta a estímulos humorales y/o mecánicos, y pueden afectar tanto la función como la estructura del vaso sanguíneo (16).

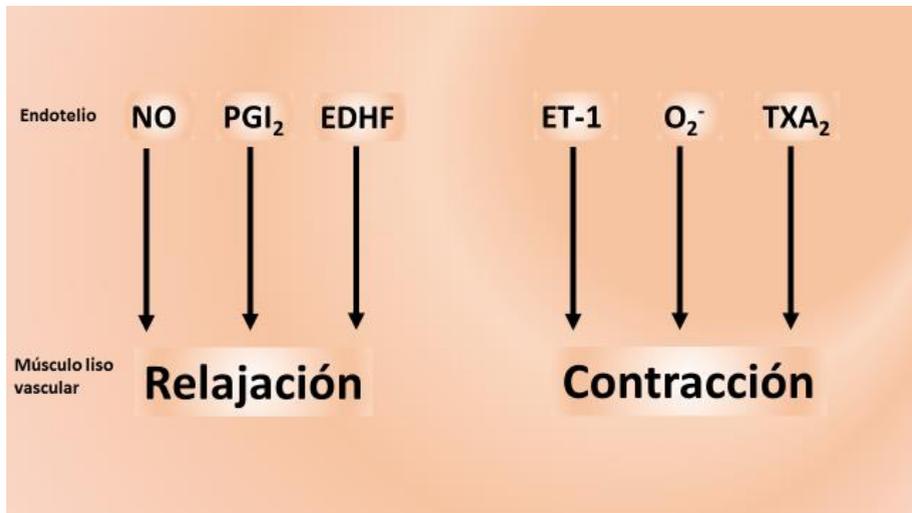


Figura 1. Principales sustancias endoteliales relajantes y contráctiles que regulan el tono vascular.

NO: Óxido nítrico, **PGI₂:** prostaciclina, **EDHF:** factor hiperpolarizante derivado del endotelio, **ET-1:** Endotelina-1, **O₂⁻:** anión superóxido, **TXA₂:** tromboxano A₂.

2.1. Factores relajantes derivados del endotelio

Los factores endoteliales son liberados en respuesta a estímulos mecánicos, como el *shear stress* o tensión de cizallamiento, o humorales como la acetilcolina (ACh), que actúa a través de la activación de receptores muscarínicos, induciendo vías vasodilatadoras en la célula endotelial que producen relajación del músculo liso vascular (16,17). La regulación del tono del vaso varía a lo largo del árbol vascular. Mientras que el NO predomina en las arterias de conducción, el EDHF lo hace en los lechos más pequeños, como las arterias coronarias o los vasos de resistencia (17). Sin embargo, se han descrito mecanismos de compensación entre ellos cuando se altera el funcionamiento de alguna de las vías (16,17).

2.1.1. Óxido nítrico

Es un vasodilatador muy potente, de vida media muy corta, que contribuye a mantener el tono vascular mediante la relajación de los vasos sanguíneos tanto *in vitro* como *in vivo* (16).

Es responsable de la mayor parte de las propiedades ateroprotectoras atribuidas al endotelio: vasodilatador, antiagregante plaquetario, inhibidor de la proliferación de moléculas de adhesión, y antioxidante, entre otras (18).

El NO se sintetiza a partir de la L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS) para formar L-citrulina y NO (Figura 2) (16,23). La estimulación de las células endoteliales produce un aumento de la concentración de calcio y la formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina que activa la NOS (16,17,23). Entre los mecanismos fisiológicos que estimulan la producción de NO se encuentran el *shear stress*, hormonas como las catecolaminas, productos plaquetarios como la serotonina y autacoides como la histamina o la bradiquinina (16,17,24).

La NOS cataliza la conversión de la L-arginina a L-citrulina y NO en

presencia de oxígeno molecular, y las reacciones requieren los siguientes cofactores: nicotinamida-adenina-di nucleótido fosfato reducido, flavinas mono y di nucleótidos, hemo, tetrahidrobiopterina y zinc (16,17,23). El NO formado difunde por una parte al lado luminal del vaso donde inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, y por otra parte difunde al músculo liso vascular donde se une y activa la enzima guanilato ciclasa soluble, que cataliza la conversión de guanosina 5-trifosfato (GTP) en guanosina monofosfato cíclica (GMPc). La mayoría de los efectos fisiológicos del NO están asociados a la activación de la guanilato ciclasa soluble (23). El GMPc activa las proteínas quinasa dependientes de GMPc tipo I (cGKI) y II (cGKII). La cGKI se expresa preferentemente en el músculo liso vascular, en las plaquetas y, en menor medida, en el endotelio. En el músculo liso vascular, la activación de cGKI produce la relajación por un mecanismo calcio-dependiente, ya sea reduciendo la concentración de calcio intracelular o alterando la sensibilidad al calcio de las proteínas contráctiles (16,17,23,25). Por otro lado, el NO también puede producir relajación en algunos lechos vasculares por activación de canales de potasio (26).

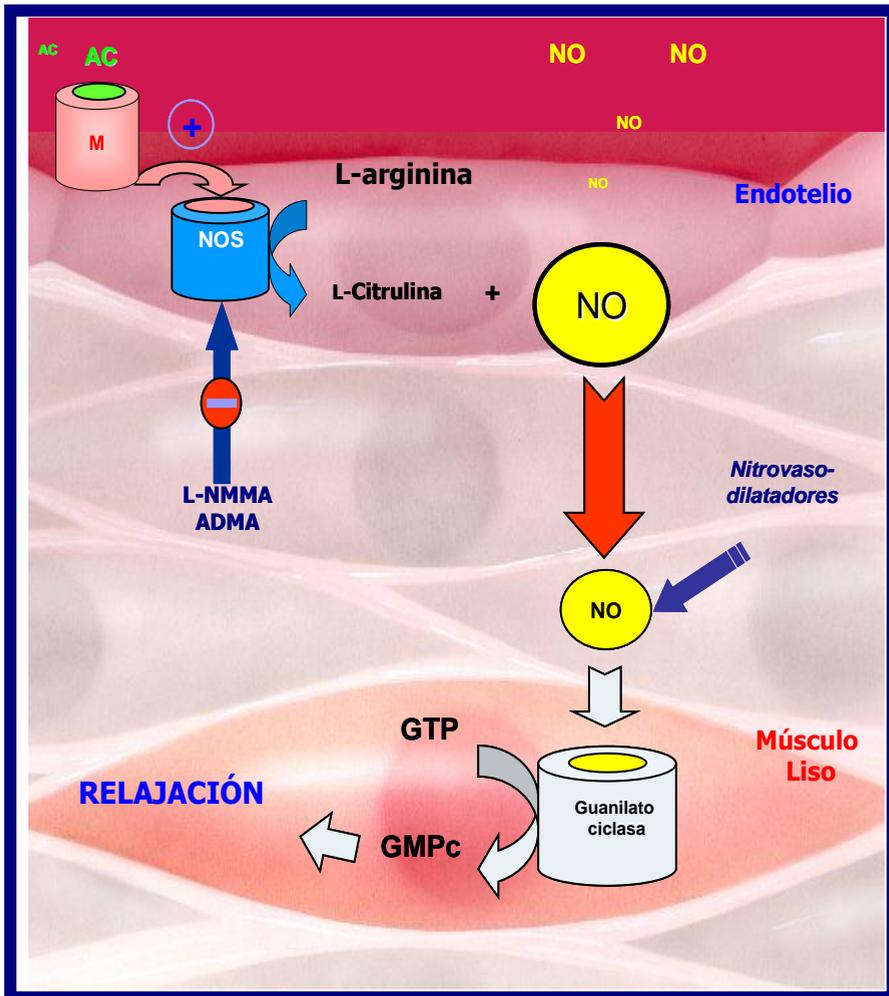


Figura 2. Esquema de la vía de formación de NO y relajación vascular a través del GMPC. AC: Acetilcolina; M: receptor muscarínico; NOS: óxido nítrico sintasa L-NMMA, N^G-monometil-L-arginina; ADMA, N^G,N^G-dimetil-L-arginina asimétrica GTP, guanosina 5-trifosfato; GMPC, guanosina monofosfato cíclica; +, estímulo; -, inhibición.

El NO que difunde al lado luminal de la célula endotelial es metabolizado a nitratos y nitritos. Estos circulan por la sangre y son excretados por la orina. Dado que la vida media plasmática del NO es corta (entre 0.5 y 5 s) y los nitratos y nitritos son los metabolitos estables del NO, su determinación en sangre y orina constituye una medida indirecta de la síntesis de NO *in vivo*. Los niveles plasmáticos de nitritos reflejan la actividad de la NOS, mientras que los nitratos urinarios, la producción sistémica de NO (27–29).

Existen tres isoformas de la NOS: neuronal (nNOS o NOS-1), inducible (iNOS o NOS-2) y endotelial (eNOS o NOS-3). La eNOS y la nNOS son enzimas calcio-calmodulina dependientes y la iNOS es calcio independiente y es inducida por citoquinas y moléculas relacionadas con patógenos (23,30). Aunque los tres subtipos pueden estar presentes en un mismo órgano, la regulación epigenética de la expresión de los genes hace que la eNOS sea la isoforma predominante en las células endoteliales y en el control del tono vascular (23).

La eNOS, además de encontrarse en las células endoteliales, se encuentra en los cardiomiocitos y en las plaquetas. Es importante para la homeostasis cardiovascular, la remodelación vascular y la angiogénesis. Su localización en las caveolas favorece las altas concentraciones de NO en la vecindad de las células sanguíneas y el músculo liso vascular (23,24).

La nNOS además de expresarse en los nervios perivasculares también se encuentra en el endotelio y el músculo liso vascular. La nNOS está presente tanto en el sistema nervioso central como periférico, donde el NO liberado juega un papel fundamental como neurotransmisor y neuromodulador en la regulación de la plasticidad sináptica, el ciclo sueño-vigilia y la secreción hormonal. El glutamato y los aminoácidos relacionados, como el *N*-metil-D-aspartato (NMDA), estimulan la formación de NO al aumentar la

concentración intracelular de calcio. Se ha descrito en diversas enfermedades neurodegenerativas un aumento de la producción de NO sintetizado a partir de la nNOS (26,31,32).

La iNOS está involucrada en la mayoría de los efectos fisiopatológicos atribuidos al NO. En condiciones fisiológicas, la iNOS no se expresa de forma constitutiva en los mamíferos, pero es inducida por estímulos pro-inflamatorios como bacterias y/o citoquinas. La iNOS se une fuertemente a la calmodulina de manera no covalente y es calcio independiente. Una vez inducida, continúa sintetizando NO en grandes cantidades por un tiempo prolongado. Además de vasodilatación patológica, la inducción de la iNOS puede tener efectos tóxicos. En células del músculo liso vascular, inhibe la respiración celular en los macrófagos que puede llevar a la disfunción y muerte celular (26,30–32). También se ha descrito que la sobreexpresión de iNOS en situaciones en las que hay déficit de eNOS puede constituir un mecanismo adaptativo para restaurar los beneficios atribuibles a la eNOS (33).

La actividad de la NOS puede ser inhibida por análogos de la L-arginina. Estos pueden ser exógenos, como el N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), o endógenos, como el N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) y el N^G,N^G-dimetil-L-arginina (ADMA) (Figura 2). El ADMA es un potente inhibidor de la NOS que es producido en varios tejidos (26,31). Estas sustancias disminuyen los niveles basales de GMPc y producen contracción arterial y disminución del flujo sanguíneo *in vitro* (31).

Los dadores de NO son una clase de fármacos heterogéneos que ejercen sus acciones independientemente de la NOS, mediante la liberación de NO y activación de la guanilato ciclasa (Figura 2). Los nitrosotioles, como el nitroprusiato sódico (NP), y las nitrosaminas liberan NO espontáneamente (30). Estos fármacos son cruciales en el tratamiento de enfermedades

cardiovasculares asociadas con un déficit en la vía endógena de producción de NO ya que restauran la vasodilatación y suprimen la tendencia a la agregación plaquetaria que se observa en situaciones que cursan con disfunción endotelial (30).

2.1.1.1. Sistema DDAH - ADMA - NOS

El ADMA y el L-NMMA son sustancias endógenas análogas a la L-arginina que compiten con ella por el sitio de unión a la NOS para inhibir la enzima y bloquear la síntesis de NO (34). Se sintetizan a partir de la metilación y proteólisis de las argininas estructurales proteicas por las enzimas proteína-arginina-metiltransferasas (PRMTs) (35,36) y en condiciones normales, actúan como un sistema de retroalimentación negativa (23).

Las dimetilarginina dimetilaminohidrolasas (DDAHs) son las enzimas encargadas de hidrolizar el ADMA a L-citrulina y de este modo regulan la actividad de la NOS y por consiguiente la producción de NO (35,36). Existen dos isoformas, la DDAH-1, que es la predominante en el túbulo proximal del riñón y en el hígado, y la DDAH-2, que predomina a nivel vascular (35,36).

En situaciones de estrés oxidativo aumenta la actividad de las PRMTs (35) y en algunas enfermedades crónicas disminuye la actividad de las DDAHs (35), lo que se traduciría en un aumento de los niveles de ADMA y por lo tanto, en una disminución de la producción de NO. Así pues, el ADMA es un predictor independiente de mortalidad cardiovascular y niveles elevados de ADMA pueden contribuir a la aparición de complicaciones cardiovasculares.

2.1.2. Prostanoides

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso que produce diferentes sustancias denominadas eicosanoides que son capaces de modular el tono vascular, la actividad plaquetaria y la respuesta inflamatoria, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (37,38).

El primer paso en la síntesis de los eicosanoides consiste en la liberación de AA a partir de los fosfolípidos de membrana, reacción que es catalizada por las fosfolipasas, principalmente la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y en menor medida la fosfolipasa C (23). En las células endoteliales, la activación de la PLA₂ es un mecanismo calcio-dependiente (25,26). Una vez liberado, el AA puede ser metabolizado por diferentes sistemas enzimáticos y no enzimáticos, en función del tipo celular y estado fisiológico y/o patológico (Figura 3). Estas vías incluyen la de la COX, que conduce a la síntesis de prostaglandinas (PGs) y tromboxanos; la de la lipoxigenasa (LOX), que conlleva a la síntesis de leucotrienos, ácidos 5-hidroxi-eicosatetraenoicos (HETEs) y lipoxinas, y la del citocromo P450, que produce epóxidos, HETEs y diHETEs; o ser transformados en isoprostanos por vía no enzimática (23,37).

La vía más importante es la de la ciclooxigenasa, o PG G/H sintasa (Figura 3), que tiene una doble función. Primero convierte el AA en PGG₂ mediante oxidación y ésta en PGH₂ (o endoperóxido) por peroxidación. La actividad de la COX puede ser inhibida por la indometacina, que es un inhibidor no selectivo de la COX-1 y 2 (30).

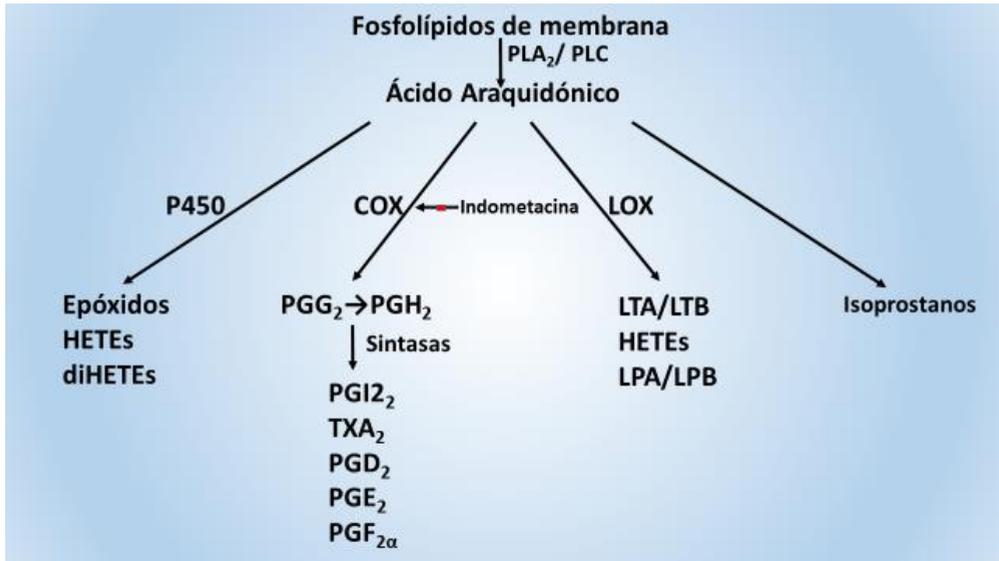


Figura 3. Síntesis de prostanoideos.

PLA₂: Fosfolipasa A₂, **PLC:** Fosfolipasa C, **P450:** citocromo P450, **HETEs:** ácidos 5-hidroxi-eicosatetraenoicos, **diHETEs:** ácidos 5-dihidroxi-eicosatetraenoicos, **COX:** ciclooxigenasa, **PGG₂:** prostaglandina G₂, **PGH₂:** prostaglandina H₂ o endoperóxido, **PGI₂:** prostaciclina, **TXA₂:** tromboxano A₂, **PGD₂:** prostaglandina D₂, **PGE₂:** prostaglandina E₂, **PGF_{2α}:** prostaglandina F_{2α}, **LOX:** lipooxigenasa, **LTA/LTB:** leucotrienos A y B, **LPA/LPB:** lipoxinas A y B.

Hay tres isoformas de COX. La COX-1 es una proteína integral de membrana que se encuentra en las membranas microsomales. Es estable y se expresa constitutivamente en los adultos. Su expresión endotelial puede aumentar en situaciones de *shear stress*. La COX-2 también se expresa constitutivamente en varios tejidos, como el endotelio y en menor medida el músculo liso vascular y también es estimulada por el *shear stress*. Es inducida en situaciones de estrés oxidativo o estados inflamatorios y se expresa predominantemente en las células endoteliales que presentan lesiones

vasculares en los territorios carotídeo, aórtico o coronario, siendo una enzima clave en la producción de PGI₂ en situaciones de injuria vascular (26,37–39). La COX-3 es una variante de la COX-1 que se expresa en la corteza cerebral y el corazón. Tiene la particularidad de ser inhibida por el acetaminofeno.

La PGH₂ es rápidamente convertida en las diferentes prostaglandinas mediante sintasas específicas (Figura 3) dando lugar a efectos vasodilatadores y vasoconstrictores (23), dependiendo del receptor prostanoide (P) con el que interactúa. Los productos vasodilatadores derivados de la vía de la COX son la PGI₂, la prostaglandina E₂ (PGE₂), y la prostaglandina D₂ (PGD₂) y los vasoconstrictores la prostaglandina F_{2α} (PG F_{2α}) y el TXA₂ y la misma PGI₂ en altas concentraciones (23).

Desde el punto de vista de la regulación cardiovascular, la PGI₂ y el TXA₂ son los dos prostanoideos más importantes. La PGI₂ se sintetiza predominantemente en las células endoteliales y su principal efecto es la inhibición plaquetaria y la vasodilatación dependiente del endotelio. También es un potente agente antiproliferativo del músculo liso vascular, reduce el estrés oxidativo y previene la adhesión celular a la pared vascular. La activación de los receptores de PGI₂ (IP) estimula la adenilato ciclasa y aumenta la producción de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) la cual disminuye el calcio intracelular y relaja el músculo liso vascular (17,23,26). Por otra parte, la activación del receptor IP también puede activar directamente canales de K⁺ (23,25,26).

El TXA₂ se sintetiza a partir de la PGH₂ por la tromboxano sintasa, que se expresa en el músculo liso vascular y en menor medida, en las células endoteliales (23). Produce activación plaquetaria, vasoconstricción y proliferación del músculo liso vascular, efectos que están asociados a la activación de receptores TP. Puesto que la PGI₂ actúa como un agonista débil de los receptores TP, concentraciones elevadas de prostaciclina también

pueden producir despolarización del músculo liso vascular con la consiguiente contracción (40).

2.1.3. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

La hipótesis de la existencia de un tercer mecanismo de vasodilatación dependiente del endotelio se basa en la observación de que, pese a la inhibición conjunta de las vías de la NOS y la COX, hay una vasodilatación remanente en la mayoría de los lechos vasculares. Dado que la hiperpolarización de las células del músculo liso vascular es un requisito para esta relajación se denominó factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) (41), o hiperpolarización dependiente de endotelio (EDH), debido a que actualmente se sabe que no es necesario un factor para mediar dicha respuesta (42).

Básicamente, la vasodilatación inducida por el EDHF implica la hiperpolarización de la célula endotelial en respuesta al *shear stress* o a diferentes agonistas que aumentan la concentración intracelular de Ca^{2+} y la apertura de los canales de K^+ de baja e intermedia conductancia en la célula endotelial con la consiguiente salida de iones K^+ al espacio intersticial. La hiperpolarización de la célula endotelial es un requisito para la hiperpolarización de músculo liso vascular. El aumento de K^+ en el espacio intersticial produce la entrada de K^+ a la célula muscular mediante diversos mecanismos: a través de uniones mioendoteliales tipo gap, por activación de la bomba $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ y/o la activación de canales de K^+ rectificadores de entrada rápidos (Kir) induciendo hiperpolarización del músculo liso (41) (Figura 4a). Se ha propuesto un segundo mecanismo que no requiere la hiperpolarización de la célula endotelial. En este caso, la hiperpolarización del miocito se debe a la apertura de las diferentes poblaciones de canales de K^+ , principalmente los de alta conductancia y/o K_{ATP} , que son sensibles al bloqueo

con iberiotoxina y glibenclamida respectivamente (43–46) (Figura 4b). Entre los candidatos que parecen actuar mediante este mecanismo se encuentran los propios iones K^+ , las corrientes iónicas, el AMPc, el citocromo P450, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el monóxido de carbono (CO), el péptido atrial natriurético, los metabolitos derivados del ácido araquidónico, los radicales libres (ROS) como el H_2O_2 , o el mismo NO dada su habilidad para hiperpolarizar el músculo liso en algunos lechos vasculares (para revisión, ver (14,41,44,47,48).

Sea cual sea el mecanismo, la hiperpolarización del músculo liso vascular produce vasodilatación principalmente disminuyendo la entrada de Ca^{2+} al músculo liso por el cierre de los canales de calcio voltaje-dependiente presentes en el músculo liso vascular (26,41,43,44,47,48).

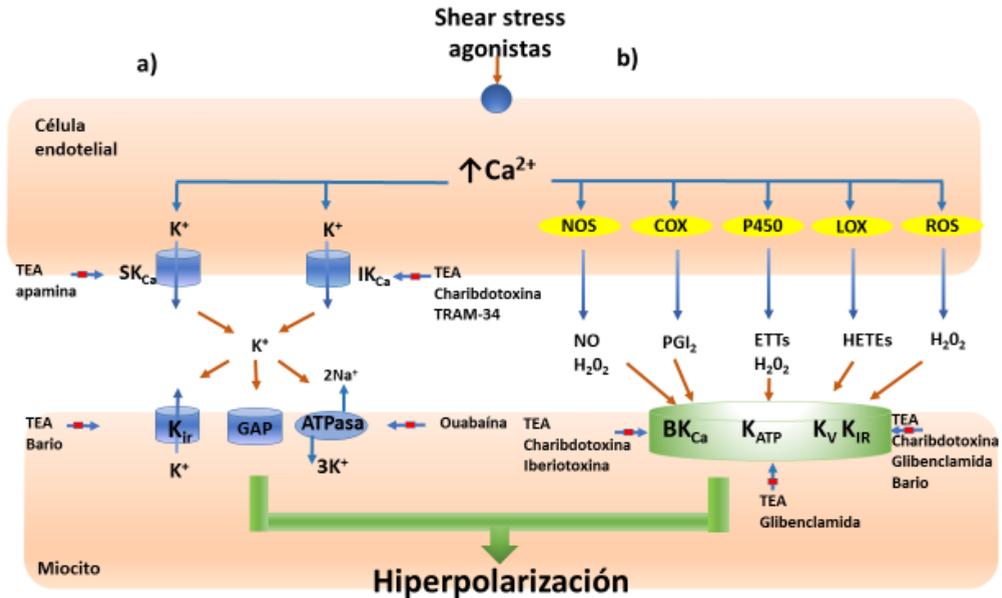


Figura 4. Hipótesis de mecanismos vasodilatadores mediados por EDHF.

a) Mecanismo clásico: liberación de K^+ desde las células endoteliales hacia el músculo liso vascular a través de uniones mioendoteliales tipo gap (GAP), la activación de la bomba $Na^+-K^+-ATPasa$ ($ATPasa$) y/o a activación de los canales de K^+ rectificadores de entrada rápidos (K_{ir})

b) Difusión de sustancias desde el endotelio hacia el miocito. Ca^{2+} : ion calcio, K^+ : ion potasio, Na^+ : ion sodio, GAP : uniones gap mioendoteliales, SK_{Ca} : canales de potasio activados por calcio de baja conductancia, IK_{Ca} : canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia, BK_{Ca} : canales de potasio activados por calcio de alta conductancia, NOS : óxido nítrico sintasa, $P450$: citocromo P450, COX : ciclooxigenasa, H_2O_2 : peróxido de hidrogeno, PGI_2 : prostaciclina, K_{ATP} : canales de potasio sensibles a ATP, K_V : canales de potasio voltaje dependientes, K_{IR} : canales rectificadores de potasio, $EETs$: epoxyácidos, $HETEs$: ácidos 5-hidroxiieicosatetraenoicos, LOX : lipooxigenasa, TEA : tetraetilamonio.

Aunque la vasodilatación por EDHF ha sido descrita tanto en arterias de resistencia como de conducción, su contribución parece ser más prominente en las arterias pequeñas y disminuye inversamente al tamaño del vaso. Esto podría estar relacionado con la disminución de la capa celular y el mayor número de uniones mioendoteliales del tipo gap, que, junto con la disminución del tamaño del vaso, refuerzan la comunicación eléctrica entre las células endoteliales y el músculo liso vascular (41,47).

Los mecanismos de dilatación mediados por EDHF varían entre las especies, lechos vasculares, y posiblemente entre estímulos dentro del mismo vaso (26,43,44,48). Puesto que el NO ejerce un tono inhibitorio sobre los mecanismos del EDHF, sus efectos se manifestarán principalmente en presencia de inhibidores de la NOS. En este sentido, se ha observado un aumento compensador de la liberación de EDHF cuando la biodisponibilidad de NO está reducida, como en la hipertensión, la diabetes o la insuficiencia renal, contribuyendo al mantenimiento de la dilatación dependiente de endotelio (41,47).

2.1.3.1. Canales de potasio

Los canales de potasio son los más abundantes y heterogéneos dentro de los canales iónicos. Su función es permitir el paso de los iones potasio a través de la membrana plasmática. Establecen el potencial de reposo de la membrana, regulan el volumen celular, y desempeñan un papel importante en varios eventos de señalización celular, como la regulación del tono del músculo liso vascular y el flujo sanguíneo. Se clasifican en cuatro grupos: voltaje dependientes (K_V), activados por calcio (K_{Ca}), de dos poros (K_{2P}) y los canales rectificadores Kir (23).

Los canales K_V y K_{2P} se expresan tanto en el músculo liso vascular como en las células endoteliales de diferentes lechos. Los K_V participan en el

control del potencial de la membrana celular y en el tono del músculo liso vascular. Se activan por despolarización en respuesta al estímulo físico o mediado por agonista (23). Los canales K_{2P} intervienen en el establecimiento del potencial de membrana y en la regulación de excitabilidad celular. Además, se ha descrito su participación en la regulación del tono vascular miogénico (23). Los canales Kir se caracterizan por conducir la corriente de potasio más rápidamente hacia adentro que hacia afuera de la célula en un amplio rango de potenciales. Se activan por el aumento de la concentración extracelular de K⁺ produciendo hiperpolarización y relajación del músculo liso vascular. Por último, los canales de potasio activados por calcio desempeñan un papel importante en el control del tono miogénico sobre todo en arterias pequeñas (49). Su inhibición causa despolarización y vasoconstricción (23,45,50). Se clasifican en alta (BK_{Ca}), intermedia (IK_{Ca}) y baja (SK_{Ca}) conductancia (23) según su respuesta a bloqueantes específicos como apamina (SK_{Ca}), TRAM-34 (IK_{Ca}) o inespecíficos como charibdotoxina (BK_{Ca}, IK_{Ca}, y los K_v). Aunque están distribuidos en la mayoría de lechos vasculares, los canales BK_{Ca} se expresan mayoritariamente en las células del músculo liso vascular mientras que los IK_{Ca} y SK_{Ca} lo hacen en las células endoteliales (23,50).

Los BK_{Ca} regulan la entrada de calcio a la célula y la excitabilidad celular. Su contribución al mantenimiento del potencial de membrana en reposo es modesta por lo que su participación se considera como un mecanismo de retroalimentación negativa al aumento de la concentración intracelular de calcio en respuesta a estímulos humorales como la noradrenalina, o físicos como el aumento de la presión intravascular (23,44).

Los canales IK_{Ca} y SK_{Ca} son esenciales en la mediación de la respuesta al EDHF. La activación de los canales SK_{Ca} hiperpolariza el músculo liso por acoplamiento eléctrico a través de las uniones gap mioendoteliales y de los

canales Kir (45), mientras que en los IK_{Ca} la salida de potasio puede activar los canales Kir2.1 y/o la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (44).

Los K_{Ca} aumentan su expresión en situaciones de disfunción endotelial como la diabetes o la hipertensión, actuando posiblemente como mecanismo compensatorio en la aterosclerosis (44,45,48,51,52).

2.2. Factores contráctiles dependientes del endotelio

El endotelio vascular no solo es capaz de producir la liberación de sustancias relajantes sino que también produce sustancias contráctiles. El balance neto entre ambos será el responsable del tono vascular. El endotelio es capaz de liberar TXA_2 , ET-1 y radicales libres (Figura 1). El mecanismo determinante para la liberación de estos factores contráctiles es el aumento de la concentración de calcio intracelular (39,53).

Los principales factores contráctiles derivados del endotelio actúan a través de la activación de la COX mediante activación de receptores TP. El principal agonista de los receptores TP es el TXA_2 que se sintetiza a partir de la PGH_2 por la tromboxano sintasa expresada en el músculo liso vascular y en las células endoteliales. La activación de receptores TP produce vasoconstricción, agregación plaquetaria y proliferación del músculo liso vascular. Además, favorece la respuesta inflamatoria e inhibe la producción de NO, contribuyendo con ello al desarrollo de la aterosclerosis (23). Otros agonistas son: las altas concentraciones de PGI_2 , los endoperóxidos, la PGE_2 , los HETE, las especies reactivas de oxígeno y los isoprostanos (23,39,40).

La endotelina es un péptido liberado por las células endoteliales en respuesta a diversos estímulos (54). La isoforma más importante es la ET-1 que se sintetiza a partir de preproendotelina que se transforma en proendotelina (big-ET-1) y ésta, a través de la enzima convertidora de endotelina, en ET-1. En el endotelio y músculo liso vascular se expresan dos

receptores para la ET-1: el ET_A y el ET_B. La ET-1 se une preferentemente a los receptores ET_A produciendo vasoconstricción. La activación de ET_B, de localización predominantemente endotelial, puede causar vasodilatación mediante la liberación de NO y la PGI₂ contribuyendo a contrarrestar los efectos contráctiles de los receptores ET_A en el músculo liso vascular (2,4).

Las contracciones dependientes del endotelio están exacerbadas en situaciones de disfunción endotelial como la hipertensión, la diabetes o la obesidad (23,40). Además, con el envejecimiento, el aumento del estrés oxidativo produce un aumento de la expresión de las isoformas de la COX, entre ellas la expresión del gen de la prostaciclina sintasa, motivo por el que en esta población, la PGI₂ no provoca relajación sino contracción (39,40,53).

2.3. Ejercicio físico y función endotelial

El endotelio está constantemente expuesto a fuerzas hemodinámicas de dirección y magnitud variable dependientes de la anatomía vascular y de las fuerzas de fricción del flujo sanguíneo. Los episodios repetidos de *shear stress*, definido como la tensión tangencial ejercida sobre el endotelio como resultado del aumento del flujo sanguíneo (7), constituye la señal fisiológica primaria para las adaptaciones endoteliales inducidas por el ejercicio en cuanto a la liberación de NO (14), la remodelación vascular y la formación de vasos sanguíneos (7,11,55). El hecho de que estos mecanismos no solo se produzcan en los lechos vasculares expuestos al flujo sanguíneo elevado, sino también en los vasos inactivos, indica que probablemente se deba a una regulación al alza de los genes de expresión de la eNOS en las células endoteliales (2,11,55,56).

Durante el ejercicio físico se producen una serie de adaptaciones tanto en la estructura vascular como en los mecanismos de regulación del tono

vascular. El entrenamiento a corto plazo produce un aumento en el *shear stress*, que induce un aumento de la expresión de la eNOS y otras proteínas que contribuyen a la dilatación dependiente de endotelio mediante la producción de NO, principalmente en las arterias que irrigan los territorios activos (57). Sin embargo, a largo plazo, el entrenamiento no parece que modifique la función endotelial (57). En este caso se produce una remodelación vascular, formación de nuevos vasos y aumento del diámetro de los vasos existentes. Estos efectos parece que estén inducidos por la eNOS y el factor de crecimiento endotelial (VEGF) entre otros factores (57). Estas adaptaciones estructurales hacen que el *shear stress*, la expresión de la eNOS y la dilatación dependiente del endotelio vuelva a niveles basales (2,58) y como consecuencia no se aprecian los efectos observados a corto plazo.

En general, el ejercicio físico y el entrenamiento mejoran la función endotelial, dependiendo del lecho vascular, la especie y la duración del entrenamiento, tanto en vasos de conducción como de resistencia (58–62).

En este sentido, ocho semanas de entrenamiento en conejos aumentan la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina en aorta y arteria pulmonar, pero no en carótida (63) mientras que 4 semanas de entrenamiento en ratas mejoran la vasodilatación en arteriolas del musculo esquelético, aorta (60,64) y carótida (65) pero no en arteriolas del lecho mesentérico (66). Esta mejoría con el ejercicio parece que esta mediada por el NO (60,62,64,68,69). En cerdos, el entrenamiento durante 13-20 semanas no modifica la vasodilatación dependiente de endotelio en las arterias femoral, braquial, mesentérica, renal, hepática (61), pulmonar (70) o coronaria (71). Sin embargo, 1 semana de entrenamiento aumenta la vasodilatación dependiente de endotelio en la arteria braquial (69) y coronaria (72).

En vasos de resistencia, el entrenamiento a corto plazo aumenta la relajación dependiente de endotelio en las arterias musculares de la rata

(67,73) por un mecanismo dependiente de NO y PGI₂ (73). A largo plazo los efectos son variables. Por ejemplo, en la rata, 12 semanas de entrenamiento no modifican la vasodilatación dependiente de endotelio en las arterias que irrigan el músculo sóleo (74) mientras que 16 semanas de entrenamiento aumentaron la vasodilatación a la acetilcolina en arteriolas del músculo espino trapecio (75). En las arterias coronarias de resistencia en cerdos, 1 semana de entrenamiento no modifica la vasodilatación dependiente de endotelio (72,76).

Respecto a cómo el ejercicio afecta la función vasoconstrictora dependiente del endotelio, algunos estudios en animales evidencian una disminución de los niveles plasmáticos de ET-1 y la AT-II con el entrenamiento (2,6,77).

En conjunto, esta disparidad en los resultados refuerza la idea de que los efectos del entrenamiento sobre la función vascular, además de ser heterogéneos, dependen en gran medida de la especie utilizada, del lecho estudiado y de la duración del entrenamiento.

Por otra parte, también dependen de la modalidad e intensidad del ejercicio. Mientras que el ejercicio que involucra pequeños grupos musculares produce efectos locales (2,78), el entrenamiento que involucra grandes grupos musculares ejerce efectos sistémicos que afecta a la función endotelial global. Cuando el ejercicio es de intensidad moderada, la producción de radicales libres induce la expresión de enzimas antioxidantes (79,80) y por consiguiente ejerce efectos beneficiosos al aumentar la biodisponibilidad del NO. Sin embargo, cuando la producción es excesiva, como ocurre en el ejercicio intenso, el aumento del estrés oxidativo se puede traducir en daño celular (79,80).

El entrenamiento ha demostrado prevenir o mejorar la disfunción endotelial presente en situaciones como la edad avanzada, la hipertensión, la diabetes, la cardiopatía o la hipercolesterolemia. La mayoría de los estudios sugieren que los beneficios no solo se limitan al endotelio, sino también a la función del músculo liso (2,77).

3. Sistema simpático

El sistema simpático constituye el principal regulador de la función cardíaca y vascular a través de la activación de los receptores β y α adrenérgicos respectivamente. La noradrenalina, neurotransmisor liberado por las terminaciones simpáticas postganglionares y la adrenalina, hormona liberada por las células cromafines de la médula adrenal, producen sus efectos por activación de tres tipos de receptores α_1 , α_2 y β (81–83).

La respuesta vascular difiere de un vaso a otro dependiendo de la población de receptores que presente (81). La noradrenalina contrae el músculo liso en la mayoría de las arterias por activación de receptores α_1 postsinápticos (82) en diversas especies animales (84–86) y en arterias humanas (87). Sin embargo, en las pequeñas arterias y arteriolas, como en las arterias cutáneas, y en el sistema venoso de la mayoría de las especies, como en la vena safena de perro o humana, los receptores α_2 también contribuyen a la vasoconstricción (82,87,88).

También la distribución de los receptores puede ser distinta en un mismo vaso. Así, mientras que en el sistema arterial, los receptores α_2 aumentan distalmente respecto a los α_1 , este patrón no se observa en la circulación cerebral (89) donde la participación de los receptores α se hace menos importante a medida que disminuye el tamaño de las arterias y el control simpático disminuye con el diámetro del vaso (90,91). En la

circulación coronaria, los grandes vasos presentan receptores α y β , mientras que los vasos pequeños poseen solo receptores β_1 (82,92).

Los receptores α_2 se localizan tanto a nivel presináptico como en el endotelio y músculo liso vascular. A nivel presináptico, su activación aumenta la recaptación de noradrenalina disminuyendo la vasoconstricción (82). La estimulación de los receptores endoteliales α_2 causa liberación de NO induciendo una simpaticólisis funcional (82,93) modulando la respuesta vasoconstrictora simpática. A nivel del músculo liso, su activación produce una respuesta vasoconstrictora transitoria, seguida de una activación de los receptores α_2 en el tronco cerebral que produce una disminución del tono simpático resultando en una disminución de la tensión arterial y de la frecuencia cardíaca (82).

Aunque los receptores β regulan principalmente las acciones cardíacas, también tienen acciones sobre el sistema vascular, principalmente a través de los receptores β_2 (94). Su activación produce relajación del músculo liso vascular, controlando la resistencia vascular periférica y en consecuencia la distribución del flujo sanguíneo (82,83).

En resumen, la vasoconstricción adrenérgica resulta del balance entre el efecto vasoconstrictor directo sobre el músculo liso vascular y la acción vasodilatadora indirecta causada por la activación de los receptores endoteliales α_2 y β adrenérgicos mediante la liberación de NO. Estudios experimentales *in vivo* e *in vitro* sugieren una interrelación entre las vías de NO y los receptores adrenérgicos en la función endotelial y en el control simpático del tono vascular (95). La disminución de la biodisponibilidad de NO, mecanismo conocido como disfunción endotelial, cambia este equilibrio hacia un aumento de la respuesta adrenérgica, que se ha implicado en

numerosas situaciones patológicas como la hipertensión, la obesidad, la diabetes, o la insuficiencia cardiaca (53).

3.1. Efectos del ejercicio sobre la respuesta simpática

En general se considera que el ejercicio físico mejora la condición del individuo por sus acciones inotrópicas, cronotrópicas y vasculares (96,97). Sin embargo, hay pocos estudios que analicen los efectos del entrenamiento, considerado como actividad física regular programada, sobre la respuesta simpática a nivel vascular en general y endotelial en particular. En este sentido, diversos estudios demuestran que el entrenamiento disminuye la actividad simpática y/o aumenta el tono parasimpático, tanto en animales como en humanos. Estos efectos se atribuyen a cambios en los receptores adrenérgicos y muscarínicos (55,98). La disminución de la vasoconstricción inducida por el entrenamiento crónico se atribuye a una reducción de la descarga simpática y a una respuesta disminuida a la noradrenalina (13,99). Además, durante el ejercicio físico, la activación de los receptores β contribuye al aumento del flujo sanguíneo al músculo esquelético (82). Otra posibilidad es que el ejercicio físico modifique los niveles de noradrenalina circulantes. En este sentido los resultados no son concluyentes y se ha descrito que el ejercicio físico aumenta o no modifica (2,55,77,100) los niveles de noradrenalina. La discrepancia en los resultados puede atribuirse a diferencias metodológicas.

HIPÓTESIS

El entrenamiento físico ha demostrado revertir la disfunción endotelial presente en pacientes con hipertensión arterial (101), diabetes mellitus (102), y en ancianos (103). Estos efectos beneficiosos parecen estar relacionados con la vasodilatación dependiente de endotelio mediada por óxido nítrico. En sujetos sanos no está claro que la función endotelial mejore con el entrenamiento. Si bien la mayoría de los estudios no encuentran cambios, algunos refieren una mejoría principalmente mediada por NO.

En base a estos antecedentes, la hipótesis del presente trabajo es que el entrenamiento físico podría mejorar la función endotelial en arterias que irrigan diferentes lechos vasculares por aumentar la producción de factores relajantes derivados del endotelio. Además, el ejercicio disminuiría la respuesta simpática, permitiendo el mantenimiento del tono arterial y un adecuado flujo sanguíneo. En conjunto, estos efectos protegerían ante las enfermedades que cursan con disfunción endotelial.

Asimismo, el entrenamiento físico podría disminuir los niveles plasmáticos de ADMA, un inhibidor endógeno de la óxido nítrico sintasa, cuyos niveles se han relacionado con un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, por lo que si el entrenamiento disminuye los niveles de ADMA sin alterar los de L-arginina, el resultado sería un aumento de los niveles plasmáticos de NO, que contribuiría a mantener una función endotelial y tono vascular adecuados.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Estudiar el efecto del entrenamiento físico sobre la respuesta vascular y la función endotelial con especial hincapié en la participación de los factores relajantes derivados del endotelio.

2. Objetivos concretos

1. Caracterizar la respuesta relajante al nitroprusiato sódico en segmentos de arteria carótida, renal y femoral.

2. Caracterizar la respuesta relajante a la acetilcolina en segmentos de arteria carótida, renal y femoral de conejos entrenados y no entrenados, en ausencia y en presencia de inhibidores de los factores endoteliales (NO, prostaciclina y EDHF).

3. Caracterizar la respuesta contráctil al KCl, a la ET-1, a la noradrenalina y al estímulo eléctrico en segmentos de arteria carótida, renal y femoral de conejos entrenados y no entrenados.

4. Determinar los niveles plasmáticos de L-arginina, nitratos y nitritos (NO_x), y ADMA en conejos entrenados y no entrenados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Grupos de estudio y protocolo de entrenamiento

Para la realización de este trabajo se han utilizado muestras de conejos macho, raza White New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) con un peso medio inicial de 2000 ± 110 g y un peso medio final de 3500 ± 350 g estabulados en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. La fase experimental se ha realizado durante el periodo comprendido entre 2009 y 2014 sobre un total de 97 animales. Los animales fueron divididos en dos grupos, uno no entrenado y otro sometido a un protocolo de entrenamiento físico (104). Todos los animales fueron estabulados en jaulas individuales y alimentados ad libitum con pienso y agua.

Antes de iniciar el protocolo de entrenamiento, los animales pasaron una fase de familiarización con la cinta rodante (Tapiz rodante LE8700, Panlab S.L.) adaptada para conejos, durante 4 días (Figura 5). El grupo de conejos entrenados fue sometido a una sesión de entrenamiento diaria, 5 días a la semana durante un total de 6 semanas. Cada sesión de entrenamiento se divide en seis períodos de carrera continua durante 4 minutos con 1 minuto de descanso entre ellos, a una velocidad de 0.33 m/s (20 m/min). Los animales fueron supervisados durante todo el entrenamiento y los conejos que no corrieron adecuadamente durante cinco sesiones consecutivas se excluyeron del estudio.



Figura 5. Sesión de entrenamiento.

Conejo corriendo sobre el tapiz rodante.

El grupo de conejos no entrenados (*no entrenado*) permaneció estabulado en jaulas individuales durante las seis semanas que duró el protocolo. Una vez finalizado el entrenamiento, los animales fueron sacrificados entre las 72 y 96 h siguientes para la obtención de las muestras.

Todos los experimentos se han realizado cumpliendo las normas éticas establecidas por la Comunidad Europea (Directiva 2010/63/EU). Además, el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universitat de València.

2. Extracción de las muestras

Previo al sacrificio, a cada conejo se le extrajo sangre de la vena marginal de la oreja, que se recolectó en tubos con EDTA para la determinación plasmática de NO_x, de L-arginina y de ADMA. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm y el plasma se almacenó a

-20°C hasta su utilización para las determinaciones bioquímicas.

Por laparotomía abdominal se extrajeron las arterias renales y tras sección de los ligamentos inguinales, las arterias femorales (Figuras 7 y 8). El abordaje para la extracción de las carótidas se realizó por sección longitudinal en la zona media del cuello y separación de los músculos paratraqueales (Figura 6). Todas las muestras se procesaron en baño de órganos para el estudio de la reactividad vascular. Además, se procedió a la disección del músculo sóleo para la medición de la actividad de la enzima citrato sintasa (CS) que se conservó en nitrógeno líquido a -70°C hasta su utilización.

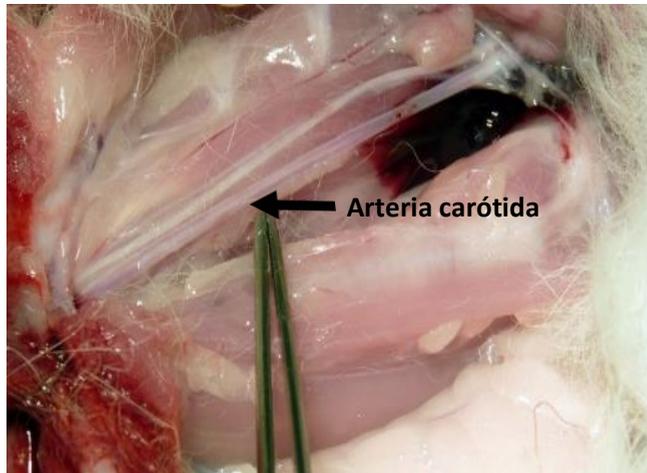


Figura 6. Resección de la arteria carótida común derecha.

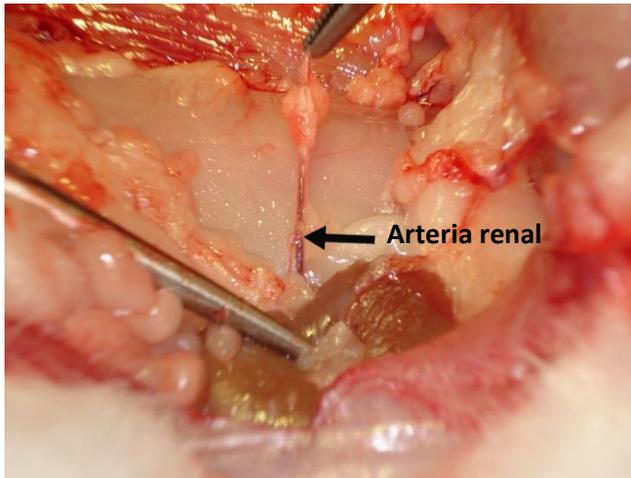


Figura 7. Resección de arteria renal derecha.

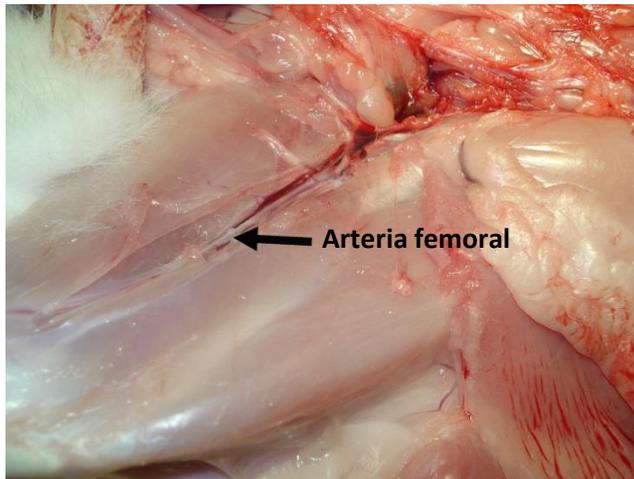


Figura 8. Resección de arteria femoral derecha.

3. Determinación de la actividad de la enzima citrato sintasa

La actividad de la citrato sintasa como marcador de la actividad mitocondrial relacionada con la eficiencia del entrenamiento (105), se ha determinado según el método descrito por Srere (106).

La citrato sintasa forma citrato a partir del oxaloacetato y de AcetilCoA. El CoA reducido (CoA-SH) reacciona con el 5,5'-Ditiobis (2-Ácido nitrobenzoico) (DTNB) para formar el ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (TNB), que absorbe específicamente a 412 nm.

Procedimiento experimental

Se homogeneizó la muestra de sóleo (20 mg) en 1 ml de tampón de extracción. Después se dejó en hielo 40 min, se centrifugó a 1500G, 4°C durante 13 minutos, se recogió el sobrenadante y se guardó una alícuota para medir proteínas (107). Se ajustó la concentración de proteínas de la muestra a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por pocillo y se añadió la solución que contiene el AcetilCoA, esperando 2 min hasta que el valor de absorbancia se estabilizó y se procedió a la medición. Este valor constituyó el blanco. Se añadió ácido oxalacético y se resuspendió. Se apuntó cada 20 s durante 3 minutos el valor de absorbancia. La evolución fue lineal. La actividad de la CS se expresó en μmol de producto formado/min/g proteína.

4. Estudio de la reactividad vascular

4.1. Preparación de las muestras para el baño de órganos

Las arterias se limpiaron en una placa Petri (Figura 9), y se cortaron en segmentos de 3 mm de longitud. Seguidamente se montaron en un sistema para el registro de tensión isométrica, calibrado a 1 g de tensión basal (Figura 10).

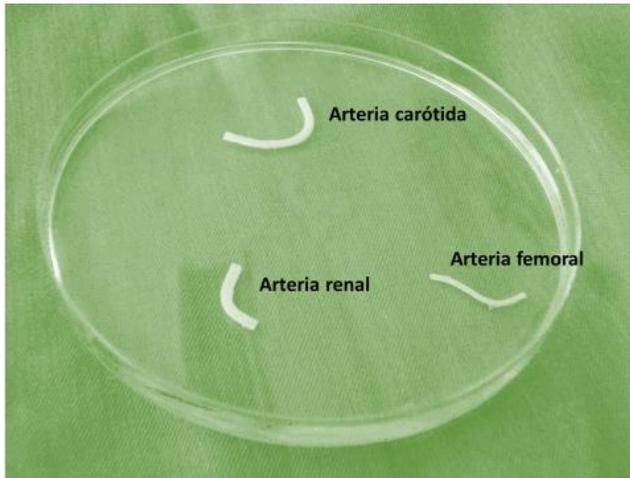


Figura 9. Segmentos de arteria carótida, renal y femoral para el montaje en baño de órganos.

La preparación experimental consiste en introducir dos alambres rígidos (1,5mm de diámetro) de acero inoxidable a través de la luz del anillo vascular. Uno de los alambres está unido a un soporte que a su vez se fija a la pared del baño de órganos; el otro alambre, que es móvil y se desplaza paralelamente al anterior, se conecta a un transductor de fuerza (FT03 Grass Instruments). Cada segmento vascular con los alambres introducidos en su luz, se coloca en un baño de órganos (Figura 10) que contiene 4 ml de solución fisiológica (solución de Krebs) cuya composición es la siguiente (en mM):

NaCl 115; KCl 4,6; MgCl₂·6H₂O 1,2; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25; glucosa 11,1 y EDTA disódico 0,01. Esta solución se equilibra con una mezcla gaseosa (95% O₂ y 5% CO₂) que proporciona un pH entre 7,3 - 7,4. La temperatura de la solución se mantiene a 37 °C durante todo el experimento. Un tornillo micrométrico unido al transductor isométrico (UF1 Pioden Controls Ltd) permite aplicar al anillo vascular la tensión pasiva adecuada separando los alambres. Los cambios de tensión isométrica se registraron en un ordenador Macintosh utilizando un software Chart v7 y un sistema de adquisición de datos MacLab /8e (AD Instruments).

Una vez montadas, las arterias se dejaron estabilizar en el baño de órganos durante 1 hora, renovándose la solución de Krebs con lavados cada 15 minutos.

Como criterio de inclusión, se consideran válidas todas las muestras que poseen una respuesta relajante máxima a la acetilcolina de al menos un 70% y una respuesta contráctil al KCl 60mM de por lo menos 1g.

El estímulo eléctrico fue aplicado mediante dos electrodos de platino, situados a 5 mm uno del otro y entre los cuales se localiza el segmento arterial. Los electrodos se conectaron a un estimulador Grass S88 (Grass Instruments, Quincy, USA). La relación entre la frecuencia aplicada y la respuesta obtenida fue estudiada en un rango de frecuencias comprendido entre 1 y 8 Hz, con estímulos de 15 V (voltaje supramáximo) de 0,2 ms de duración, durante 30 s.

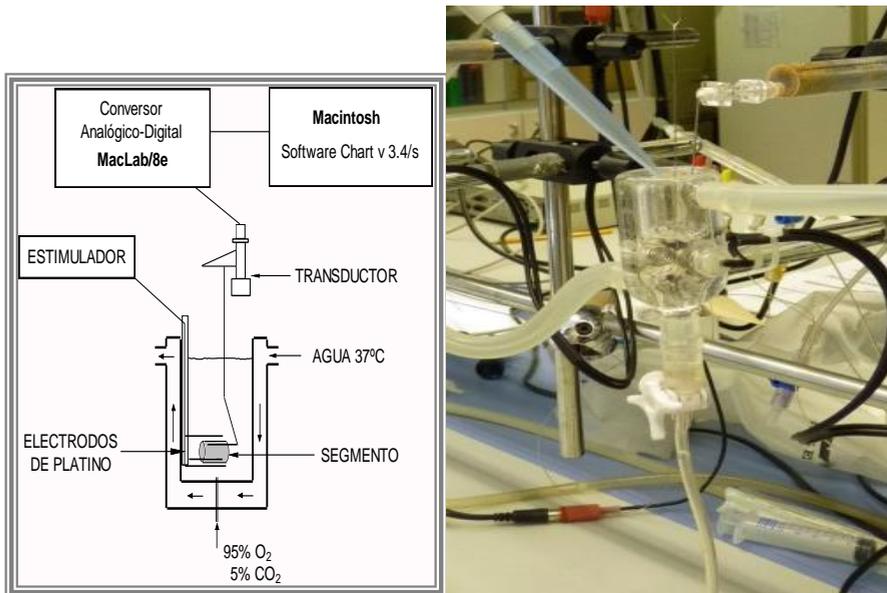


Figura 10. Esquema del baño de órganos y preparación experimental utilizada para el registro de la tensión isométrica.

4.2. Determinación de la tensión pasiva óptima

Antes de analizar la respuesta de los anillos arteriales a los diversos estímulos, se procedió a determinar la tensión basal óptima en un grupo de experimentos preliminares en anillos de longitud y diámetro semejantes a los experimentales. Para ello se registró la contracción inducida por el cloruro potásico (KCl) (60 mM) después de exponer los anillos arteriales a diversas tensiones pasivas (0.5, 1 y 2 g). La tensión pasiva a la que se obtuvo la mayor respuesta contráctil al KCl 60 mM se consideró como la tensión óptima de reposo. La tensión pasiva óptima para los segmentos de las tres arterias fue de 1 g.

4.3. Obtención de las curvas concentración-respuesta

Se construyeron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico (NP), a la acetilcolina (Ach), a la endotelina (ET-1), al KCl y a la

noradrenalina (NE) en los tres lechos vasculares y en los dos grupos de estudio.

4.3.1. Nitroprusiato sódico

El nitroprusiato sódico es un dador directo de NO, que activa la guanilato ciclasa produciendo vasodilatación (30). Se estudió la respuesta relajante al nitroprusiato sódico (10^{-9} - 3×10^{-6} M) en segmentos previamente contraídos con noradrenalina (10^{-7} M) para comprobar si la capacidad relajante del músculo liso vascular independiente de endotelio se modificaba con el entrenamiento físico.

4.3.2. Acetilcolina

Se estudió la respuesta relajante a la acetilcolina (10^{-9} - 3×10^{-6} M) en arterias previamente contraídas con noradrenalina (10^{-7} M) en las siguientes condiciones:

- En ausencia de inhibidores (control)
- En presencia de superóxido dismutasa (SOD, 200 U/ml), responsable de la catalización del anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y O_2 (108). Se pretende valorar la producción de estrés oxidativo inducido por el ejercicio.
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), inhibidor de la COX para estudiar la posible implicación de los prostanoideos en esta respuesta.
- En presencia de indometacina (10^{-5} M) más L-NAME (10^{-4} M), inhibidor de la NOS, con el fin de comprobar la liberación de NO inducida por la Ach.
- En presencia de KCl (20 mM) para bloquear los canales de potasio relacionados con el mecanismo de acción del EDHF.
- En presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NAME (10^{-4} M) más charibdotoxina (10^{-7} M) y apamina (10^{-6} M), bloqueantes de los canales

de K^+ activados por Ca^{2+} de intermedia y alta conductancia, y de baja conductancia respectivamente, relacionados con el mecanismo de acción del EDHF.

- En presencia de indometacina (10^{-5} M) más L-NAME (10^{-4} M) más Ouabaína (10^{-2} M), un inhibidor de la bomba Na^+-K^+ .

4.3.3. Cloruro potásico

Se realizaron curvas concentración-respuesta al KCl (5-100 mM) en ambos grupos de estudio para valorar si la capacidad de contracción del músculo liso vascular se modificaba con el entrenamiento físico.

4.3.4. Endotelina-1

Para valorar si el entrenamiento físico modifica la respuesta contráctil a la endotelina, se realizaron curvas concentración-respuesta a la ET-1 (10^{-11} - 10^{-7} M) en ambos grupos de estudio

4.3.5. Noradrenalina

Se estudió la respuesta a la noradrenalina (10^{-9} - 10^{-4} M) con el fin de valorar si la respuesta vascular adrenérgica se alteraba con el entrenamiento físico.

Todas las curvas de los diferentes agonistas se realizaron en vasos correspondientes a los tres lechos estudiados, utilizando segmentos arteriales diferentes. Las curvas que se realizaron en presencia de los distintos inhibidores se construyeron después de un período de incubación de 20 minutos, a excepción de las curvas incubadas con SOD que se incubaron durante 45 minutos.

4.4. Obtención de las curvas frecuencia-respuesta

Para estudiar la naturaleza de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico, los segmentos arteriales se incubaron durante 20 minutos con tetrodotoxina (10^{-6} M), un bloqueante de la conducción nerviosa, guanetidina (10^{-6} M), un bloqueante de la neurotransmisión adrenérgica, o prazosín (10^{-6} M), un antagonista de los receptores α_1 -adrenérgicos (24,109,110). Como control, en otro grupo de segmentos se realizó una segunda secuencia de estímulos en ausencia de los antagonistas.

Una vez comprobado el carácter neurógeno de la respuesta, se estudió la respuesta contráctil al estímulo eléctrico en segmentos de carótida, renal y femoral procedentes de conejos no entrenados y entrenados. Las frecuencias utilizadas fueron de 1, 2 y 4 Hz para la arteria carótida, 2, 4 y 8 Hz para la renal y 4 y 8 Hz para la arteria femoral.

5. Determinación de los niveles plasmáticos de óxido nítrico

La determinación del NOx en plasma, se realiza por colorimetría (kit de R&D Systems®)(Figura 11) según el método de Griess (111,112). Se basa en la conversión enzimática de nitrato a nitrito por la nitrato reductasa. Esta reacción es seguida por la detección colorimétrica de nitrito como un producto de tinte azo de la reacción de Griess (111). Como producto final se obtiene un compuesto azoderivado que absorbe a 540-570 nm.

Procedimiento experimental

Las muestras de plasma se descongelaron, filtraron y diluyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los estándares de nitratos y nitritos se diluyeron sucesivamente de mayor a menor concentración con el diluyente de reacción para la obtención de la recta patrón. Todas las diluciones se colocaron en los pocillos por duplicado y se calculó la media de la

absorbancia de cada concentración. Los resultados se expresan en M.

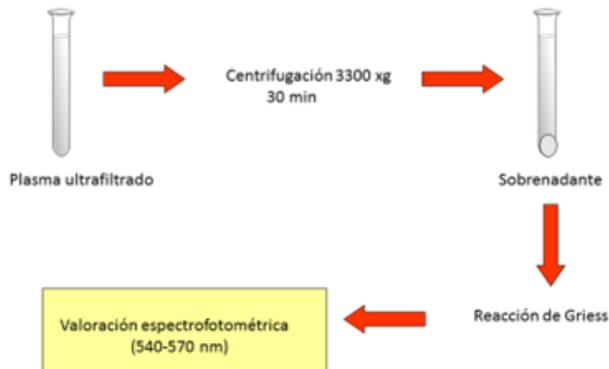


Figura 11. Esquema de la determinación de NOx por colorimetría.

6. Determinación de los niveles plasmáticos de L-arginina y ADMA

Se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando un equipo cromatográfico Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) (Figura 12). La muestra en solución se inyectó en la fase móvil. Los componentes de la solución emigraron de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna (fase estacionaria). Estas interacciones químicas determinan la separación de los contenidos en la muestra.

Las columnas usadas fueron ODS C18 (Scharlab), el flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min y la absorbancia se midió a 200 nm. Los resultados se expresan en μM .

Procedimiento experimental

El procedimiento experimental sigue el método descrito por Bird (113). Se utilizaron columnas de intercambio iónico Varian Bond Elut SCX conectadas a un sistema de vacío para purificar las muestras de plasma. Se pasaron las soluciones en el orden siguiente: metanol puro (2ml), tricloroacético 2% (4ml), muestra (1ml), tricloroacético 2% (2ml), tampón fosfato 0.1M a un pH de 8 (5ml) y metanol puro (2ml).

Se extrajo la columna y se añadieron 4 ml de mezcla recuperadora. Se recogió el líquido en un tubo de vacío. Las muestras se desecaron a 60°C durante 3-4 h. Después se resuspendieron en 120 µl de fase móvil y se inyectaron en el HPLC.

Se preparó la fase móvil a partir de ácido ortofosfórico (0.025 M), ácido hexanosulfónico (0.01 M), acetonitrilo 1%, KOH (cantidad necesaria para alcanzar un pH de 5) y agua bidestilada y se dejó estabilizar durante 1 hora a un flujo de 1 ml/minuto.

Se preparó una solución madre de L-arginina (0.1M) y ADMA (10⁻²M) y se hicieron diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 con el fin de obtener los cromatogramas correspondientes para establecer la recta patrón. Luego se inyectaron las muestras. De cada una se tomaron 50 µl y se dejaron pasar 40 minutos entre cada muestra. Cada 5 muestras se inyectó nuevamente un patrón (MIX). Al terminar el experimento, se lavó la columna con acetonitrilo al 70% durante 1 hora.

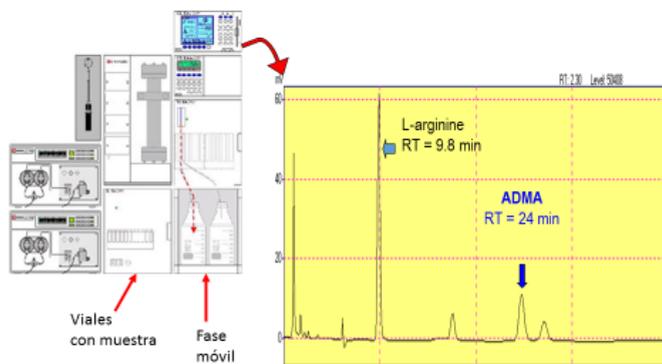


Figura. 12. Determinación de L-Arginina y ADMA por HPLC.

7. Fármacos y soluciones

Nitroprusiato sódico, cloruro de acetilcolina, clorhidrato de noradrenalina, NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), acetato de NG-dimetil-L-arginina asimétrica (ADMA), SOD, clorhidrato de L-arginina, indometacina, charibdotoxina, apamina, tetrodotoxina, guanetidina sulfato, prazosín clorhidrato, endotelina-1, tricloroacético y acetil CoA. Todos ellos distribuidos por Sigma. Cloruro potásico y ácido oxalacético distribuidos por Panreac. Ácido ortofosfórico, ácido hexanosulfónico y acetonitrilo por Sharlab.

Las soluciones concentradas de los fármacos utilizados en baño de órganos se realizaron con agua bidestilada, excepto la indometacina que se disolvió en etanol y bicarbonato sódico (150 mM) ajustado a un pH 7,4 con HCl. La concentración de etanol final en el baño fue inferior al 0,01%. Las diluciones correspondientes se hicieron con solución fisiológica (NaCl 0,9%).

8. Cálculos y análisis estadístico

Los resultados se indican como la media \pm error estándar.

En los resultados de la reactividad vascular, la relajación se expresa como porcentaje de la contracción inducida por la noradrenalina. La contracción se expresa en mg de tensión para las curvas concentración-respuesta al KCl mientras que para las curvas concentración-respuesta a la endotelina, la noradrenalina o para el estímulo eléctrico, el resultado se expresa relativo al valor de la contracción máxima al KCl (60mM).

La concentración de agonista que produce el 50% de la respuesta máxima (CE_{50}) se calculó para cada curva concentración-respuesta por un método de análisis de regresión no lineal. Los resultados se expresan como pD_2 calculado a partir del $-\log(CE_{50})$.

La concentración plasmática de NO_x fue determinada por extrapolación del valor de absorbancia para cada muestra con la recta patrón.

Las concentraciones plasmáticas de L-arginina y ADMA en las muestras fueron determinadas por comparación con los estándares del área bajo la curva obtenida para cada una de ellas. La variabilidad del método fue inferior al 7% y el límite de detección del ensayo fue de 0.1 μM .

La actividad de la citrato sintasa se calculó mediante la ecuación:

$$U = \frac{\Delta 412 \text{ nm/min} \times 2500}{\epsilon}$$

U: actividad enzimática

$\Delta 412\text{nm/min}$: variación de DO durante 1 min cuando se añade el ácido oxalacético

ϵ : coeficiente de extinción molar del TNB= 13,9

2500: coeficiente para convertir 4 μg de proteínas en un gramo

Las diferencias entre grupos o entre distintos tratamientos fueron estimadas por el test de la t de Student y ANOVA respectivamente. Se consideraron las diferencias significativas cuando el valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. Actividad de la enzima citrato sintasa

La actividad de la enzima citrato sintasa fue significativamente mayor en el grupo entrenado, demostrando la efectividad del entrenamiento (7.33 ± 0.17 vs 5.30 ± 0.16 μmol de producto formado/min/g de proteína para el grupo entrenado y no entrenado respectivamente, correspondiente a un incremento del $26 \pm 3\%$, Figura 13).

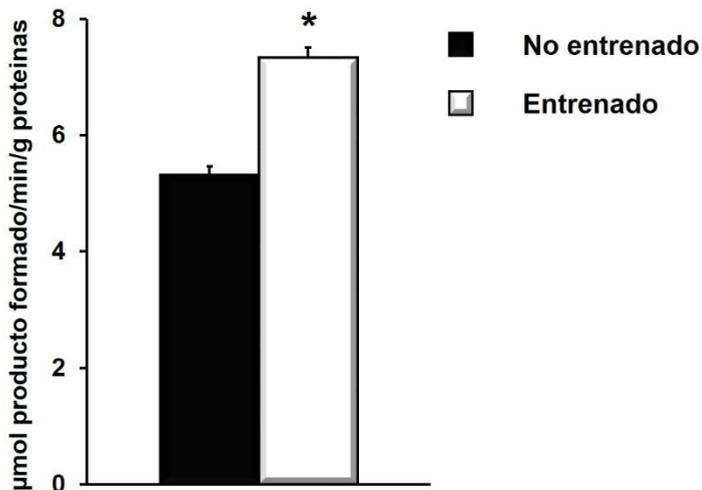


Figura 13. Actividad de la enzima citrato sintasa en el músculo sóleo de ambos grupos (n= 4 en cada grupo).

* $P < 0,05$ comparado con el grupo no entrenado.

n: número de conejos.

2. Curvas concentración-respuesta

2.1. Respuesta al nitroprusiato sódico

Para estudiar la capacidad relajante del músculo liso vascular independiente de endotelio se realizaron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico en los tres lechos arteriales en ambos grupos de estudio.

El nitroprusiato sódico (10^{-9} - 3×10^{-6} M) produjo una relajación dependiente de la concentración en los dos grupos. El entrenamiento físico no modificó la respuesta al nitroprusiato sódico en ninguno de los tres lechos vasculares (Figura 14, Tabla 1). Estos resultados indican que el entrenamiento físico no produce cambios en la capacidad relajante del músculo liso vascular.

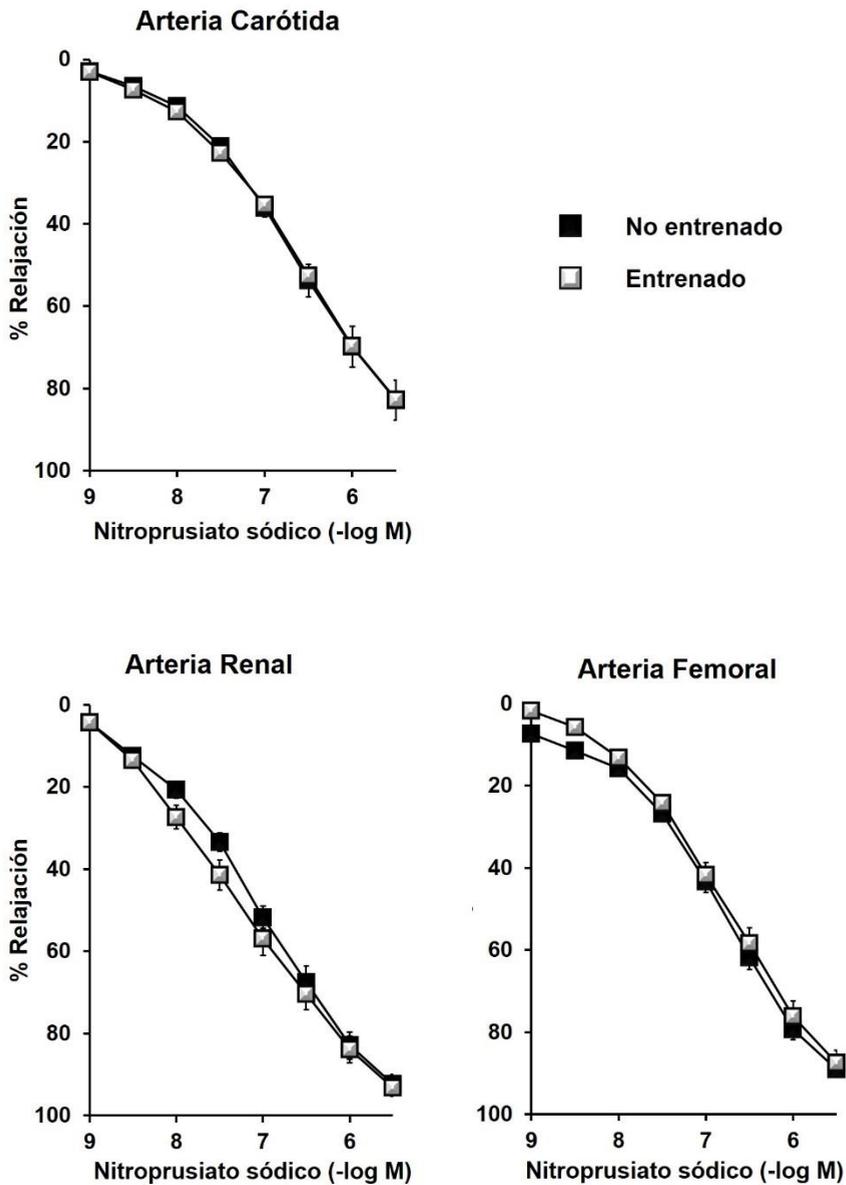


Figura 14. Respuesta al nitroprusiato sódico en segmentos de los tres lechos arteriales en ambos grupos previamente contraídos con noradrenalina.

Tabla 1. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta al nitroprusiato sódico en segmentos de arteria carótida, renal y femoral procedentes de conejos no entrenados y entrenados.

Nitroprusiato sódico	No entrenado			Entrenado		
	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Carótida	6	$6,82 \pm 0,06$	83 ± 3	6	$6,80 \pm 0,05$	83 ± 2
Renal	4	$7,11 \pm 0,08$	92 ± 2	4	$7,29 \pm 0,11$	93 ± 2
Femoral	4	$6,95 \pm 0,06$	89 ± 2	4	$6,90 \pm 0,06$	86 ± 3

n: número de conejos.

El E_{max} es la relajación expresada como porcentaje sobre la contracción inducida por noradrenalina ($10^{-7}M$).

2.2. Respuesta a la acetilcolina

Para estudiar la relajación dependiente de endotelio, se utilizó la acetilcolina, un agonista que estimula la eNOS a través de la unión a los receptores muscarínicos M3 en el endotelio (66). En segmentos de los tres lechos vasculares previamente contraídos con noradrenalina (10^{-7} M), la acetilcolina produjo relajación dependiente de la concentración. En el grupo de no entrenados, el efecto máximo relajante es ligeramente superior en la arteria carótida que en la renal y femoral. El entrenamiento iguala la respuesta relajante entre los tres lechos.

En la arteria carótida el efecto máximo (E_{max}) de la relajación fue significativamente menor en el grupo entrenado ($p < 0,05$). Ni en la arteria renal ni en la femoral hubo diferencias significativas entre los grupos (Figura. 15, Tabla 2).

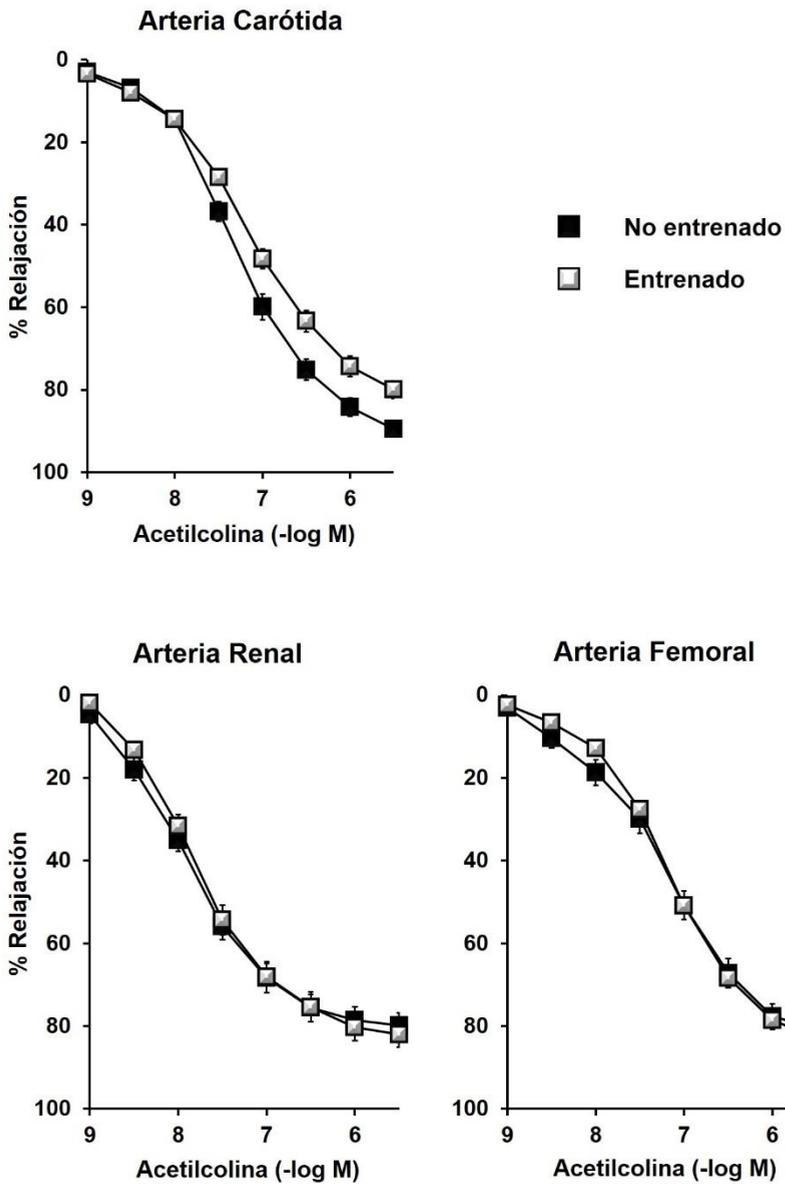


Figura 15. Respuesta a la acetilcolina en segmentos de los tres lechos arteriales de ambos grupos previamente contraídos con noradrenalina.

Tabla 2. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de arteria carótida, renal y femoral procedentes de conejos no entrenados y entrenados.

Acetilcolina	No entrenado			Entrenado		
	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Carótida	16	$7,26 \pm 0,04$	90 ± 2	13	$7,19 \pm 0,05$	$81 \pm 2^*$
Renal	15	$7,82 \pm 0,07$	82 ± 3	11	$7,71 \pm 0,06$	84 ± 3
Femoral	10	$7,37 \pm 0,09$	80 ± 3	10	$7,16 \pm 0,07$	83 ± 3

* $P < 0,05$ comparado con el grupo no entrenado.

n: número de conejos.

El E_{max} es la relajación expresada como porcentaje sobre la contracción inducida por noradrenalina ($10^{-7}M$).

Las diferencias en la relajación inducida por el entrenamiento podrían deberse a la mayor producción de radicales libres. En la arteria carótida, la incubación con SOD no modificó la relajación a la acetilcolina en ninguno de los grupos de estudio, por lo que no se puede atribuir la menor relajación en el grupo entrenado a un incremento del estrés oxidativo en el momento de la evaluación funcional (Figura 16, tabla 3).

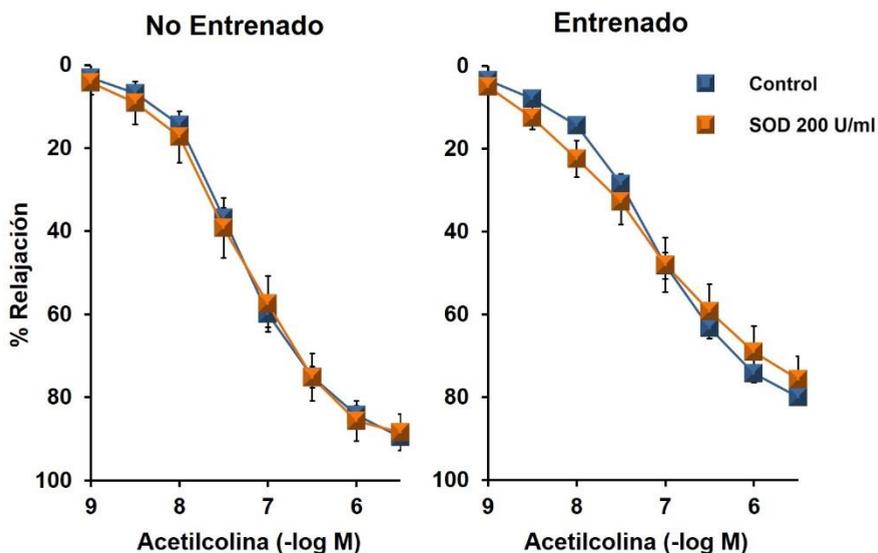


Figura 16. Respuesta a la acetilcolina en presencia de SOD en segmentos de arteria carótida de ambos grupos previamente contraídos con noradrenalina.

2.2.1. Participación de los factores relajantes derivados del endotelio

2.2.1.1. Arteria carótida

No hubo diferencias significativas con respecto al control al incubar con indometacina (10^{-5} M) en ninguno de los dos grupos, indicando que las prostaglandinas no participan en la relajación inducida por acetilcolina en la arteria carótida de conejo (Figura 17, Tabla 3).

La inhibición conjunta de indometacina (10^{-5} M) más L-NAME (10^{-4} M) redujo significativamente el efecto máximo de la relajación inducida por acetilcolina en ambos grupos ($P < 0,05$) (Figura 17, Tabla 3). Estos resultados indican que al menos parte de la relajación inducida por acetilcolina es debida a la liberación de NO. Sin embargo, sólo en el grupo no entrenado, la incubación con el bloqueante de la NOS redujo significativamente el valor de pD_2 (Tabla 3). Estos resultados indican que la pauta de entrenamiento utilizada en este estudio disminuye la liberación de NO inducida por acetilcolina.

Una vez bloqueada la liberación de prostaglandinas y de NO con indometacina y L-NAME, la relajación remanente a la acetilcolina se ha relacionado con la liberación endotelial de factor hiperpolarizante (41,42). El EDHF se ha relacionado con la participación de canales de K^+ activados por Ca^{2+} (49,114). La incubación con KCl (20mM) produjo un bloqueo significativo en ambos grupos, lo cual indica la participación de los canales de K^+ en esta respuesta (Figura 18, Tabla 3). La adición de charibdotoxina (10^{-7} M) y apamina (10^{-6} M) no modificó significativamente la relajación con respecto a la incubación conjunta de indometacina más L-NAME, indicando que los canales de K^+ activados por Ca^{2+} no participan en la respuesta relajante

a la acetilcolina en este lecho (Figura 18, Tabla 3). La relajación remanente se bloquea en presencia de ouabaína (Figura 18, Tabla 3).

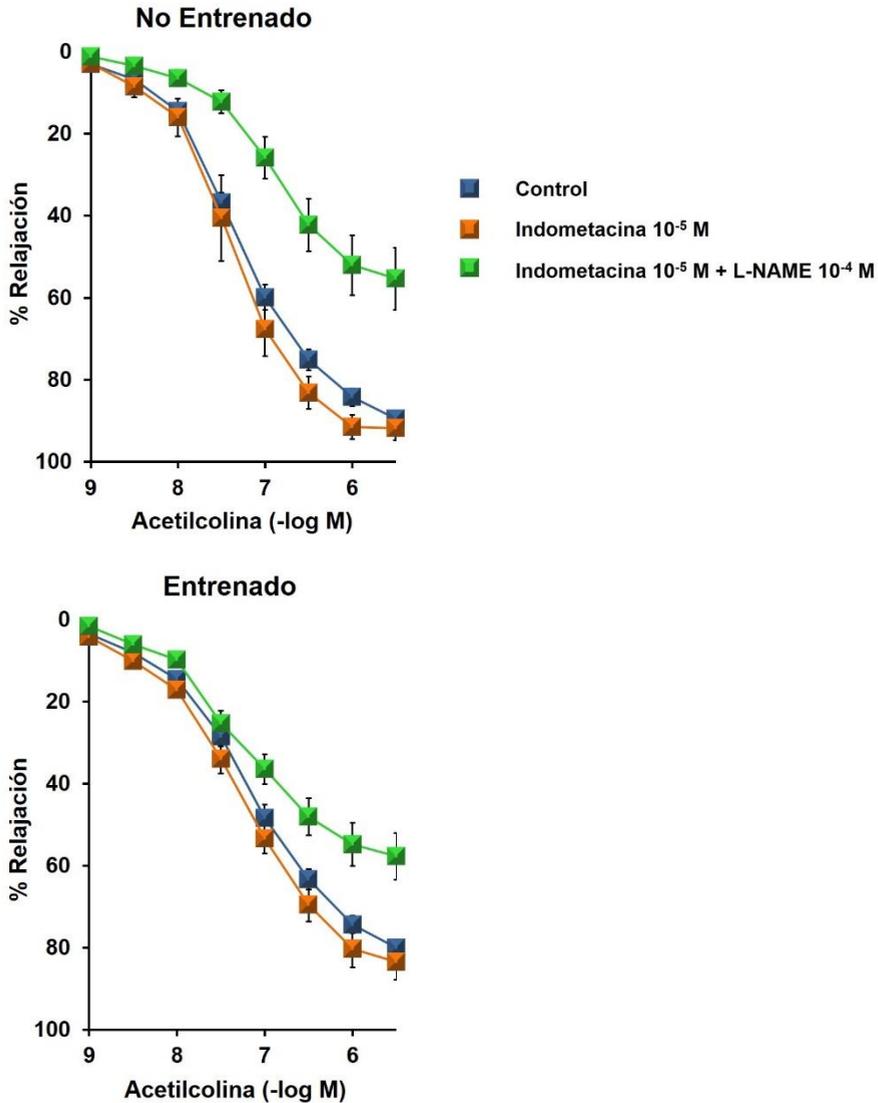


Figura 17. Respuesta a la acetilcolina en la arteria carótida en los dos grupos de estudio en condiciones control, en presencia de indometacina 10⁻⁵ M y de indometacina 10⁻⁵ M más L-NAME 10⁻⁴ M.

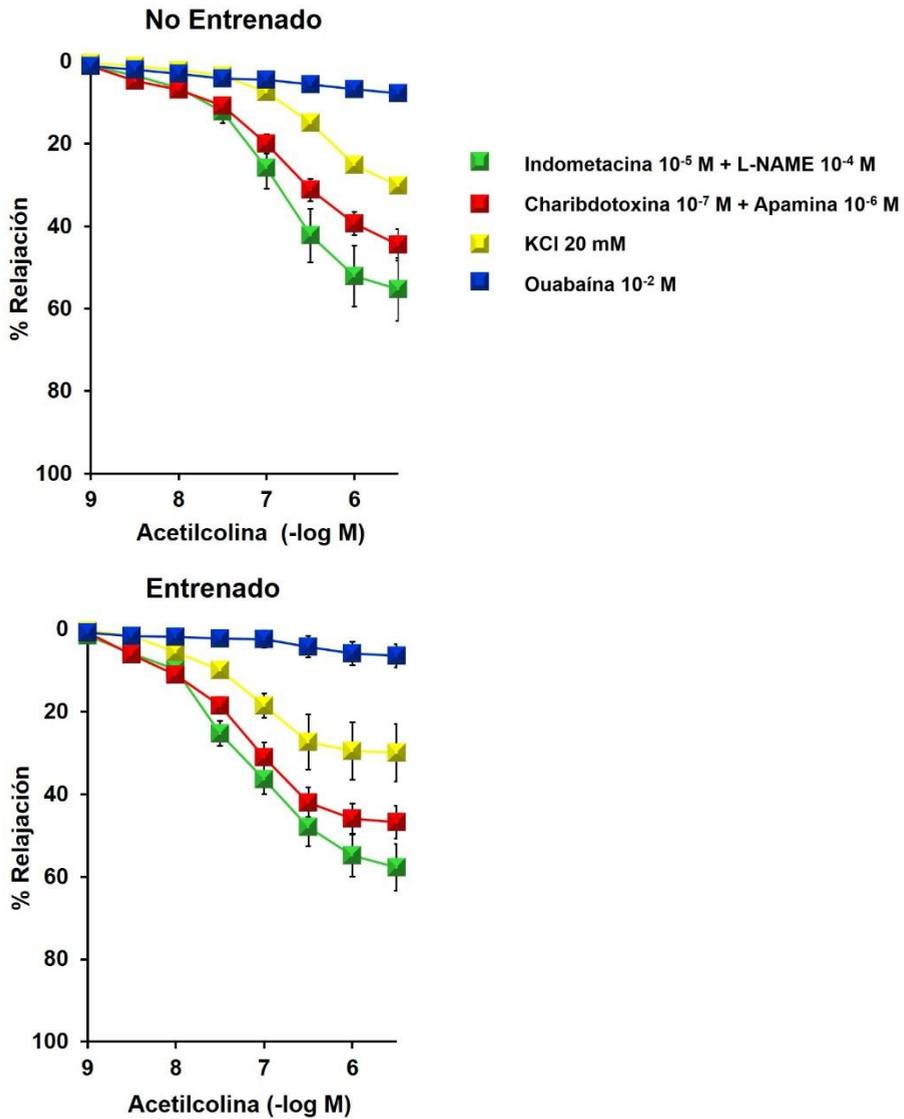


Figura 18. Respuesta a la acetilcolina en la arteria carótida en los dos grupos de estudio en condiciones control (indometacina 10^{-5} M más L-NAME 10^{-4} M), en presencia de charibdotoxina 10^{-7} M más apamina 10^{-6} M, de ouabaína 10^{-2} M y de KCl 20 mM. Todas ellas en presencia de indometacina más L-NAME.

Tabla 3. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de arteria carótida procedentes de conejos no entrenados y entrenados. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la respuesta a la acetilcolina.

Acetilcolina	No entrenado			Entrenado		
	n	$pD_2 \pm$ e.e	$E_{max} \pm$ e.e	n	$pD_2 \pm$ e.e	$E_{max} \pm$ e.e
Control	16	$7,26 \pm 0,04$	90 ± 2	13	$7,19 \pm 0,05$	$81 \pm 2^*$
Indometacina 10^{-5} M	3	$7,45 \pm 0,11$	92 ± 3	8	$7,36 \pm 0,06$	82 ± 5
Indometacina 10^{-5} M + L-NAME 10^{-4} M	5	$6,89 \pm 0,09^*$	$55 \pm 8^*$	8	$7,36 \pm 0,02$	$58 \pm 6^*$
Charibdotoxina 10^{-7} M + Apamina 10^{-6} M	12	$7,04 \pm 0,11^*$	$46 \pm 4^*$	8	$7,29 \pm 0,08$	$47 \pm 4^*$
KCl 20 mM	4	$6,52 \pm 0,06^{*\ddagger}$	$30 \pm 2^{*\ddagger}$	2	$6,75 \pm 0,12^{*\ddagger}$	$30 \pm 7^*$
Ouabaina 10^{-2} M	2	---	$8 \pm 5^{*\ddagger}$	2	---	$6 \pm 3^{*\ddagger}$
SOD	4	$7,19 \pm 0,05$	81 ± 2	4	$7,30 \pm 0,11$	76 ± 6

* $P < 0,05$ comparado con el control de cada grupo.

n: número de conejos.

‡ Diferencias con el grupo tratado con indometacina más L-NAME del mismo grupo.

Las curvas incubadas con KCl, charibdotoxina más apamina y ouabaína se realizaron en presencia de indometacina 10^{-5} M más L-NAME 10^{-4} M.

2.2.1.2. Arteria renal

La incubación con indometacina (10^{-5} M) no modificó la respuesta relajante a la acetilcolina en ninguno de los dos grupos, (Figura 19 y Tabla 4), lo cual implica que no hay participación de prostanoïdes en esta respuesta.

La incubación con indometacina más L-NAME redujo por igual la relajación en ambos grupos, indicando la participación de NO en esta respuesta (Figura 19 y Tabla 4). La incubación con KCl 20mM produjo un bloqueo adicional de la respuesta a la acetilcolina en ambos grupos. La adición de charibdotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M) al baño no modificó significativamente la respuesta relajante respecto a los segmentos incubados con indometacina más L-NAME, indicando que no hay participación de los canales de potasio activados por calcio en la respuesta relajante a la acetilcolina en la arteria renal de conejo. La relajación remanente se bloquea en presencia de ouabaína (Figura 20, Tabla 4).

Estos resultados indican que el entrenamiento no modifica la relajación dependiente de endotelio ni altera la participación de los factores endoteliales.

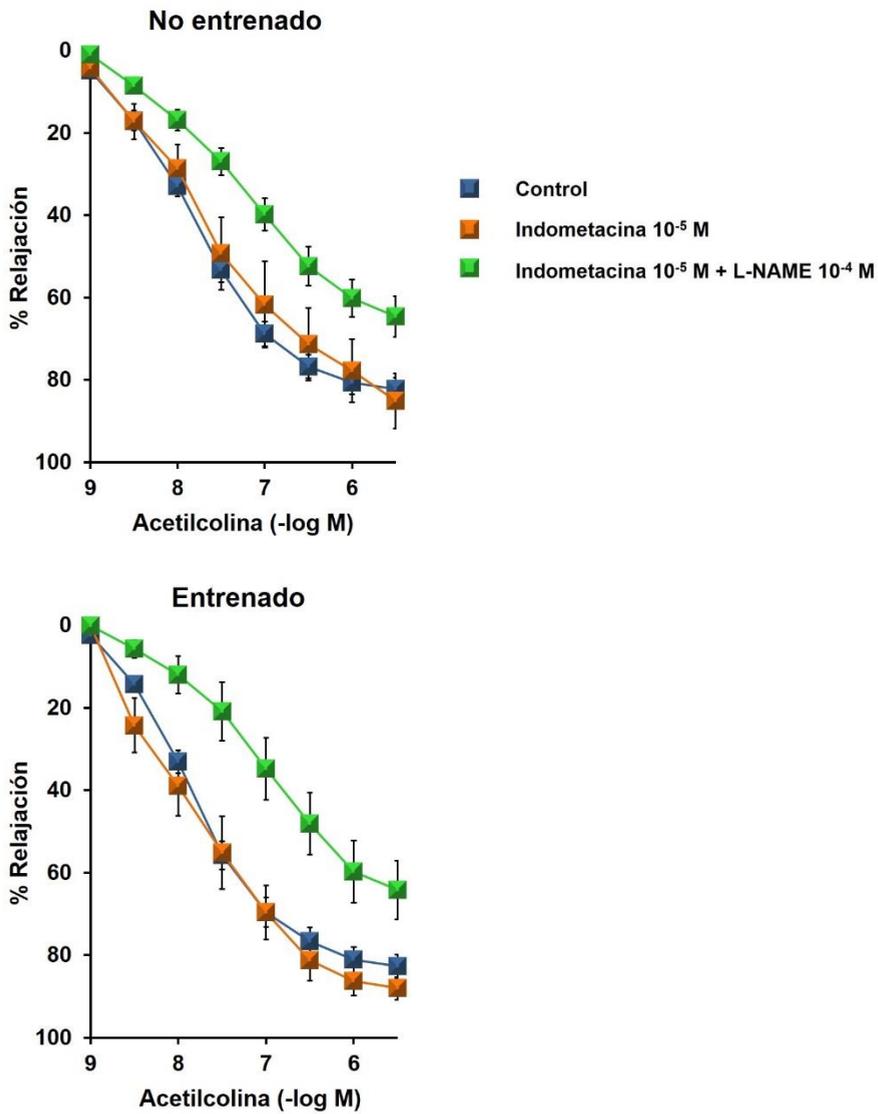


Figura 19. Respuesta a la acetilcolina en la arteria renal en los dos grupos de estudio en condiciones control, en presencia de indometacina 10^{-5} M y de indometacina 10^{-5} M más L-NAME 10^{-4} M.

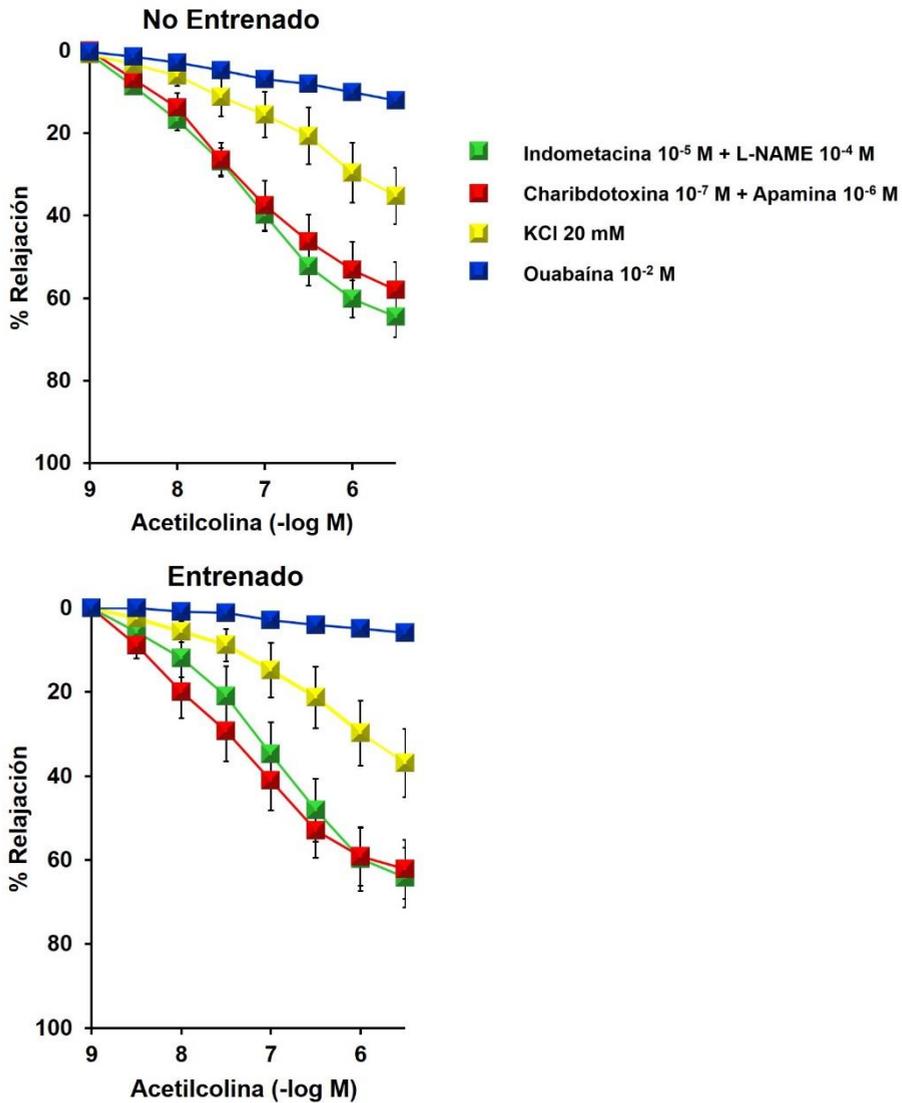


Figura 20. Respuesta a la acetilcolina en la arteria renal en los dos grupos de estudio en condiciones control (indometacina 10^{-5} M más L-NAME 10^{-4} M), en presencia de charibdotoxina 10^{-7} M más apamina 10^{-6} M, de ouabaína 10^{-2} M y de KCl 20 mM. Todas ellas en presencia de indometacina más L-NAME.

Tabla 4. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de arteria renal procedentes de conejos no entrenados y entrenados. Efecto de los diferentes tratamientos.

Acetilcolina	No entrenado			Entrenado		
	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Control	19	$7,82 \pm 0,07$	82 ± 3	13	$7,71 \pm 0,06$	84 ± 3
Indometacina 10^{-5} M	5	$7,52 \pm 0,24$	85 ± 7	9	$7,81 \pm 0,20$	88 ± 3
Indometacina 10^{-5} M + L-NAME 10^{-4} M	13	$7,44 \pm 0,12^*$	$65 \pm 5^*$	10	$7,05 \pm 0,15^*$	$65 \pm 7^*$
Charibdotoxina 10^{-7} M + Apamina 10^{-6} M	4	$7,38 \pm 0,11^*$	$58 \pm 7^*$	6	$7,42 \pm 0,18$	$62 \pm 7^*$
KCl 20 mM	5	$6,76 \pm 0,21^{*\ddagger}$	$35 \pm 7^{*\ddagger}$	3	$6,70 \pm 0,16^{*\ddagger}$	$37 \pm 8^{*\ddagger}$
Ouabaína 10^{-2} M	3	----	$12 \pm 1^{*\ddagger}$	2	----	$7 \pm 1^{*\ddagger}$

* $P < 0,05$ comparado con el control.

n: número de conejos.

‡ Diferencias con el grupo tratado con indometacina más L-NAME del mismo grupo.

Las curvas incubadas con KCl, charibdotoxina más apamina y ouabaína se realizaron en presencia de indometacina 10^{-5} M más L-NAME 10^{-4} M.

2.2.1.3. Arteria femoral

La incubación con indometacina (10^{-5} M) no modificó la respuesta relajante a la acetilcolina en ninguno de los dos grupos (Figura 21 y Tabla 5), lo cual implica que no hay participación de prostanoïdes en esta respuesta.

La incubación con indometacina (10^{-5} M) más L-NAME (10^{-4} M) redujo la relajación en ambos grupos, indicando la participación de NO en la relajación a la acetilcolina de la arteria femoral. El Emax de la curva de acetilcolina incubada con indometacina más L-NAME fue de $47 \pm 6\%$ en el grupo no entrenado y de $69 \pm 8\%$ en el entrenado ($P < 0.05$) (Tabla 5). Estos resultados indican que la relajación debida al NO es mayor en el grupo de no entrenados que en el de entrenados.

La incubación con KCl 20 mM bloqueó significativamente la relajación a la acetilcolina en ambos grupos. En presencia de indometacina (10^{-5} M) más L-NAME (10^{-4} M), la adición de charibdotoxina (10^{-7} M) más apamina (10^{-6} M) al baño no produjo mayor bloqueo que la inhibición conjunta de COX y de NOS en el grupo no entrenado. Sin embargo, en el grupo entrenado sí que es efectivo el bloqueo con charibdotoxina más apamina, disminuyendo el Emax de $69 \pm 8\%$ hasta $38 \pm 6\%$ ($P < 0.05$) (Figura 22, Tabla 5). Estos resultados indican que el entrenamiento incrementa la participación de los canales de K^+ activados por calcio en la respuesta relajante inducida por la acetilcolina.

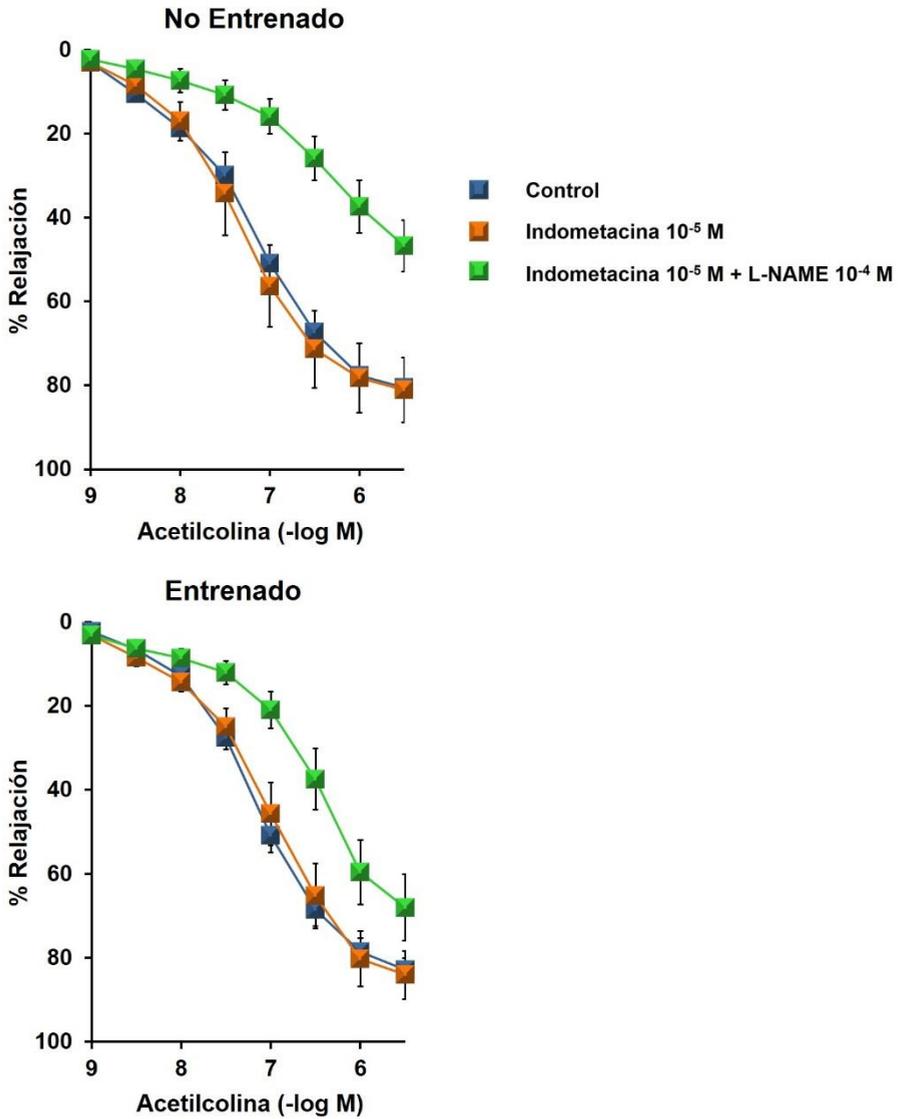


Figura 21. Respuesta a la acetilcolina en la arteria femoral en los dos grupos de estudio en condiciones control, en presencia de indometacina 10⁻⁵ M y de indometacina 10⁻⁵ M más L-NAME 10⁻⁴ M.

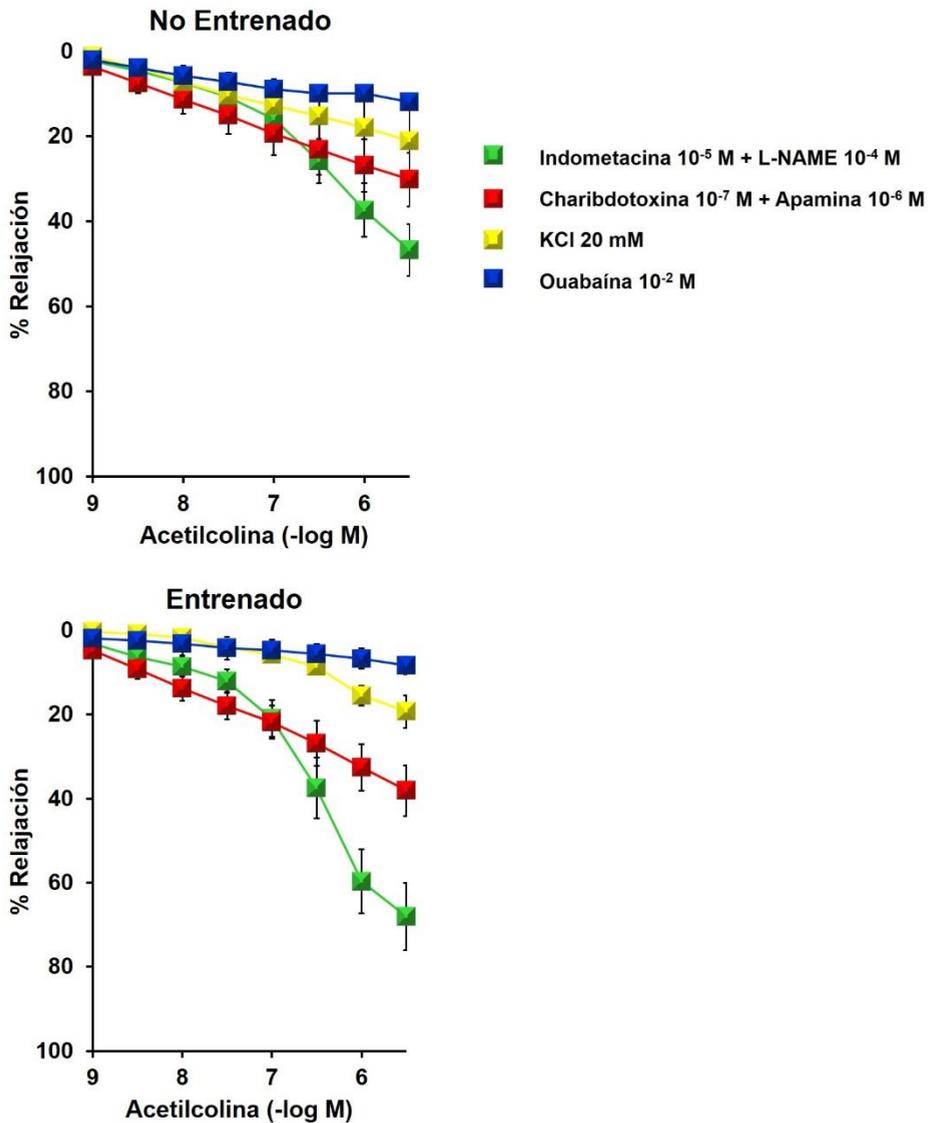


Figura 22. Respuesta a la acetilcolina en la arteria femoral en los dos grupos de estudio en condiciones control (indometacina 10^{-5} M más L-NAME 10^{-4} M), en presencia de charibdotoxina 10^{-7} M más apamina 10^{-6} M, de ouabaína 10^{-2} M y de KCl 20 M. Todas ellas en presencia de indometacina más L-NAME.

Tabla 5. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de arteria femoral procedentes de conejos no entrenados y entrenados. Efecto de los diferentes tratamientos.

Acetilcolina	No entrenado			Entrenado		
	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Control	10	$7,37 \pm 0,09$	80 ± 3	10	$7,16 \pm 0,07$	83 ± 3
Indometacina 10^{-5} M	7	$7,31 \pm 0,13$	81 ± 8	6	$7,03 \pm 0,09$	84 ± 6
Indometacina 10^{-5} M + L-NAME 10^{-4} M	9	$6,58 \pm 0,12^*$	$47 \pm 6^*$	8	$6,80 \pm 0,20^*$	$69 \pm 8^{*§}$
Charibdotoxina 10^{-7} M + Apamina 10^{-6} M	4	$7,28 \pm 0,13^\ddagger$	$30 \pm 6^*$	5	$7,35 \pm 0,30$	$38 \pm 6^{*\ddagger}$
KCl 20 mM	3	$7,15 \pm 0,22^\ddagger$	$21 \pm 8^{**}$	3	$6,55 \pm 0,21$	$19 \pm 4^{*\ddagger}$
Ouabaína 10^{-2} M	2	----	$12 \pm 1^{**}$	2	----	$8 \pm 2^{*\ddagger}$

* $P < 0,05$ comparado con el control.

‡ Diferencias con el grupo tratado con indometacina más L-NAME en el entrenado.

§ $P < 0,05$ comparado con el grupo no entrenado.

n: número de conejos.

2.3. Respuesta al KCl

La capacidad de contracción del músculo liso vascular se comprobó por su respuesta al KCl, cuyo mecanismo de contracción es independiente de receptor e involucra la entrada de calcio a la célula a través de canales de calcio voltaje-dependientes (115). En los tres lechos vasculares, la curva concentración-respuesta al KCl (5-100 mM) produjo una contracción dependiente de la concentración en ambos grupos de estudio (Figura 23, Tabla 6).

La respuesta contráctil es mayor en la arteria renal, seguida de la femoral y por último la carótida. En la arteria carótida, el entrenamiento disminuyó la sensibilidad al KCl, medida en términos de pD_2 ($1,33 \pm 0,01$ vs $1,47 \pm 0,03$ para el grupo entrenado y no entrenado respectivamente, $P < 0,05$) sin diferencias en el efecto máximo. Tanto en la arteria renal como en la femoral la respuesta al KCl no se modifica con el entrenamiento (Figura 23, Tabla 6).

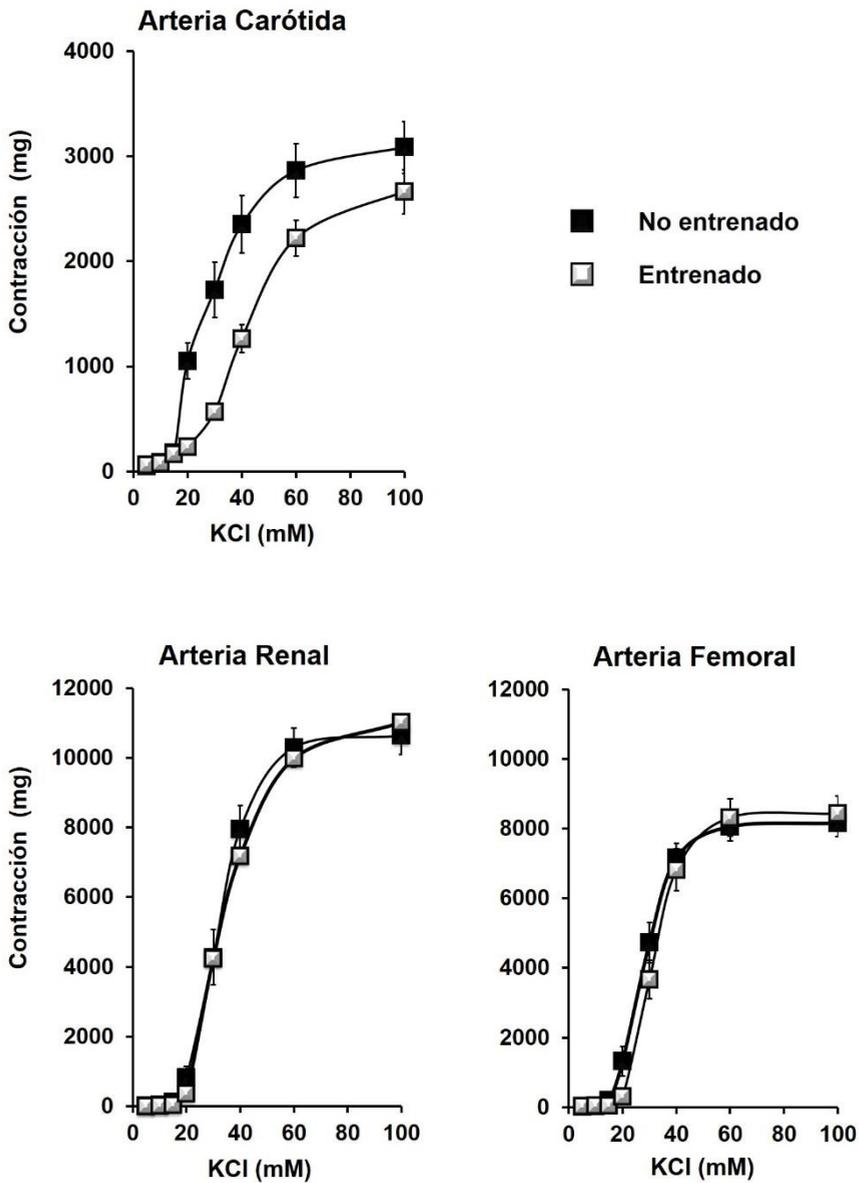


Figura 23. Curvas concentración-respuesta al KCl en el grupo no entrenado y en el entrenado en las arterias carótida, renal y femoral.

Tabla 6. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta al KCl en segmentos de arteria carótida, renal y femoral procedentes de conejos no entrenados y entrenados.

KCl	No entrenado			Entrenado		
	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$ (mg)	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$ (mg)
Carótida	4	$1,47 \pm 0,03$	3149 ± 241	5	$1,33 \pm 0,01^*$	2798 ± 225
Renal	3	$1,40 \pm 0,02$	10639 ± 541	3	$1,37 \pm 0,03$	11024 ± 936
Femoral	4	$1,46 \pm 0,03$	8160 ± 399	4	$1,41 \pm 0,02$	8426 ± 510

* $P < 0,05$ comparado con el no entrenado.

n: número de conejos.

2.4. Respuesta a la endotelina

Se realizaron curvas concentración-respuesta a la ET-1 (10^{-11} - 10^{-7} M). El entrenamiento no varía la respuesta a la ET-1 en ninguna de las tres arterias estudiadas (Figura 24, Tabla 7).

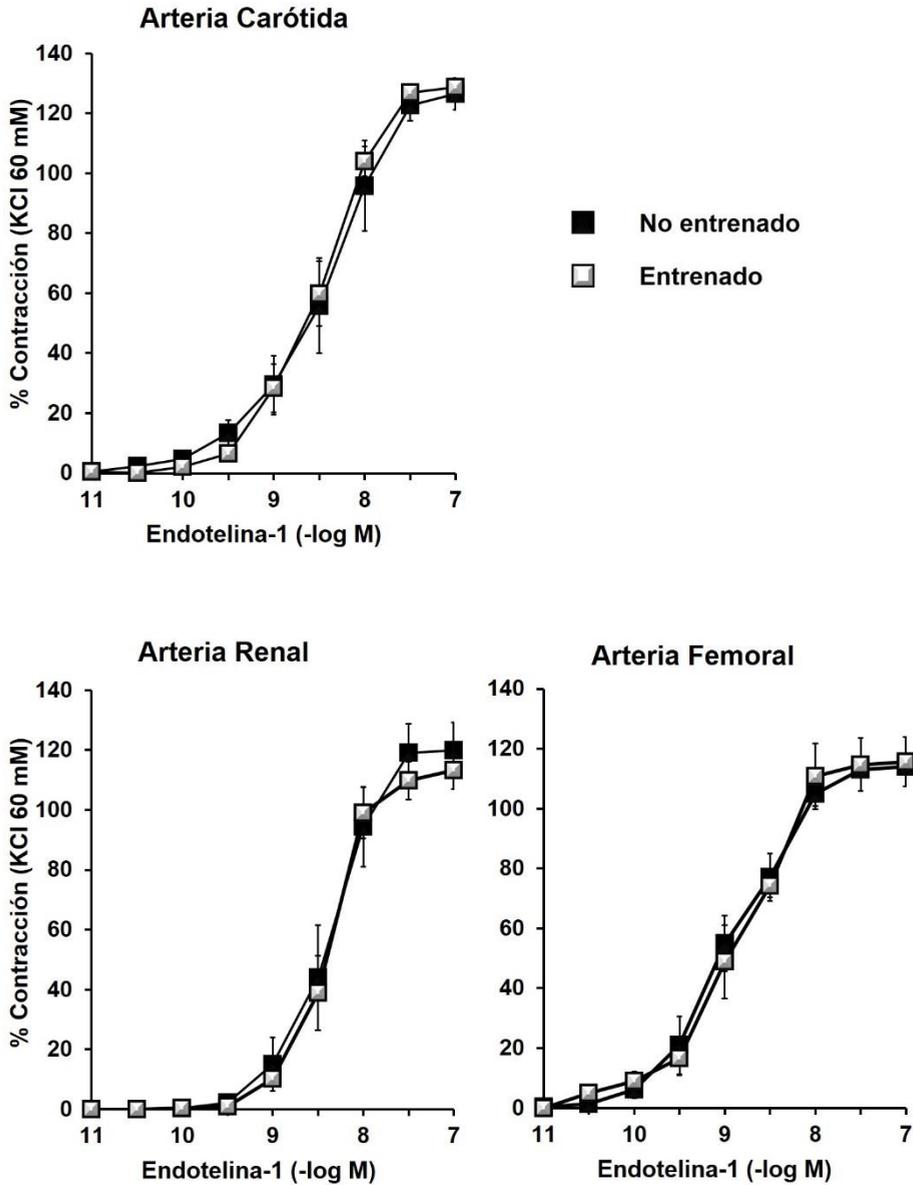


Figura 24. Curvas concentración-respuesta a la endotelina-1 en el grupo no entrenado y en el entrenado en las arterias carótida, renal y femoral.

Tabla 7. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la ET-1 en segmentos de arteria carótida, renal y femoral procedentes de conejos no entrenados y entrenados.

Endotelina-1	No entrenado			Entrenado		
	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Carótida	4	$8,54 \pm 0,20$	126 ± 2	4	$8,49 \pm 0,20$	127 ± 3
Renal	3	$8,60 \pm 0,08$	111 ± 6	3	$8,44 \pm 0,08$	100 ± 7
Femoral	4	$9,06 \pm 0,12$	114 ± 1	4	$8,87 \pm 0,10$	113 ± 4

n: número de conejos.

2.5. Respuesta a la noradrenalina exógena

Se realizaron curvas concentración-respuesta a la NE (10^{-9} - 10^{-4} M) en la arteria carótida, y NE (10^{-9} - 3×10^{-5} M) en las arterias renal y femoral en ambos grupos de estudio. El entrenamiento no varía la respuesta a la NE en ninguna de las tres arterias estudiadas (Figura 25, Tabla 8).

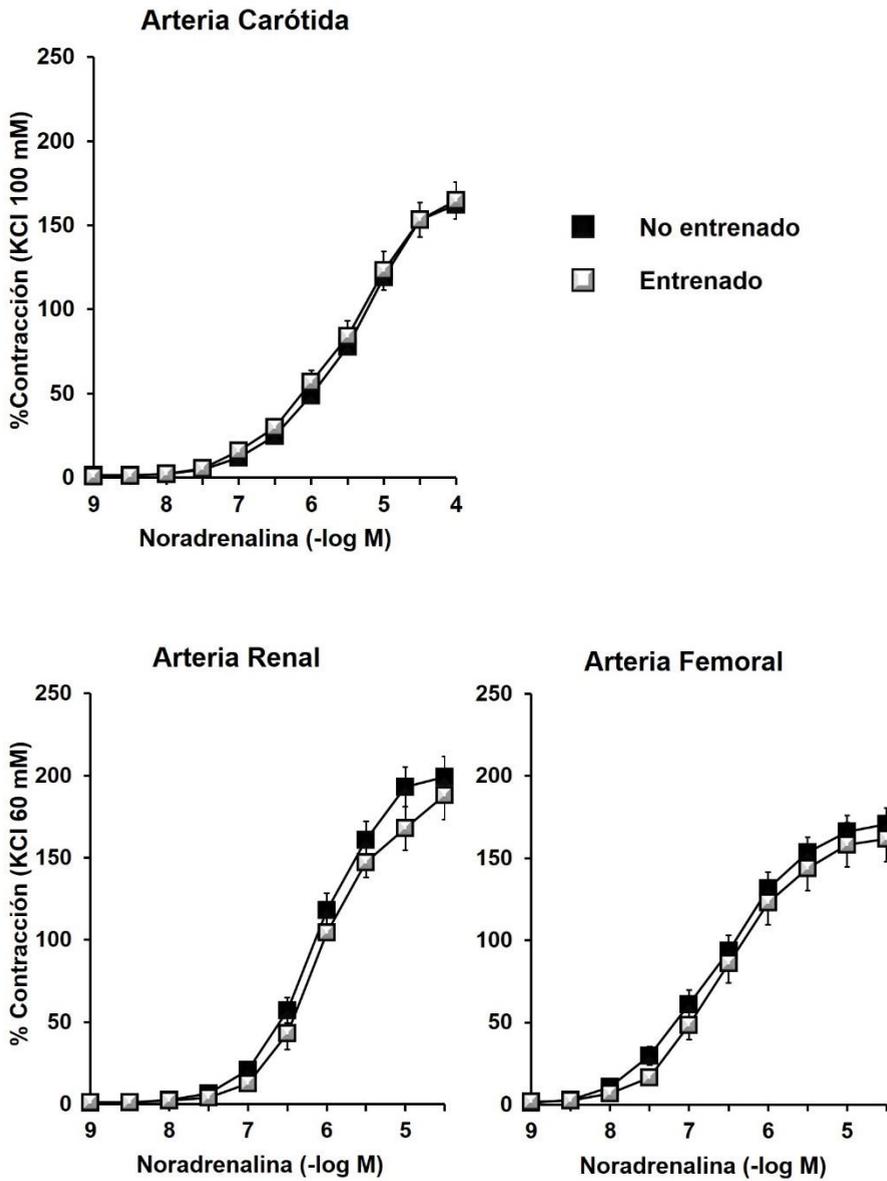


Figura 25. Curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en el grupo no entrenado y en el entrenado en las arterias carótida, renal y femoral.

Tabla 8. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la noradrenalina en segmentos de arteria carótida, renal y femoral procedentes de conejos no entrenados y entrenados.

Noradrenalina	No entrenado			Entrenado		
	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Carótida	9	$5,49 \pm 0,04$	162 ± 5	9	$5,53 \pm 0,07$	165 ± 11
Renal	14	$6,14 \pm 0,06$	199 ± 12	6	$6,14 \pm 0,09$	188 ± 15
Femoral	10	$6,68 \pm 0,08$	171 ± 10	8	$6,56 \pm 0,09$	162 ± 14

* $P < 0,05$ comparado con el no entrenado.

n: número de conejos.

3. Respuesta a la noradrenalina endógena (estímulo eléctrico)

3.1. Naturaleza del estímulo eléctrico

El estímulo eléctrico (15 V, 0,2 ms de duración, durante 30 s para la arteria carótida, 2, 4 y 8 Hz para la renal y 4 y 8 Hz para la arteria femoral), indujo una contracción dependiente de la frecuencia en segmentos de los dos grupos de estudio. Esta contracción fue abolida al incubarse con tetrodotoxina, guanetidina o prazosín (todos a la concentración de 10^{-6} M), en todo el rango de frecuencias estudiado, lo cual indica que la contracción inducida por el estímulo eléctrico es debida a la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas perivasculares y a la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos y no a un estímulo directo sobre el músculo liso vascular (Figura 26).

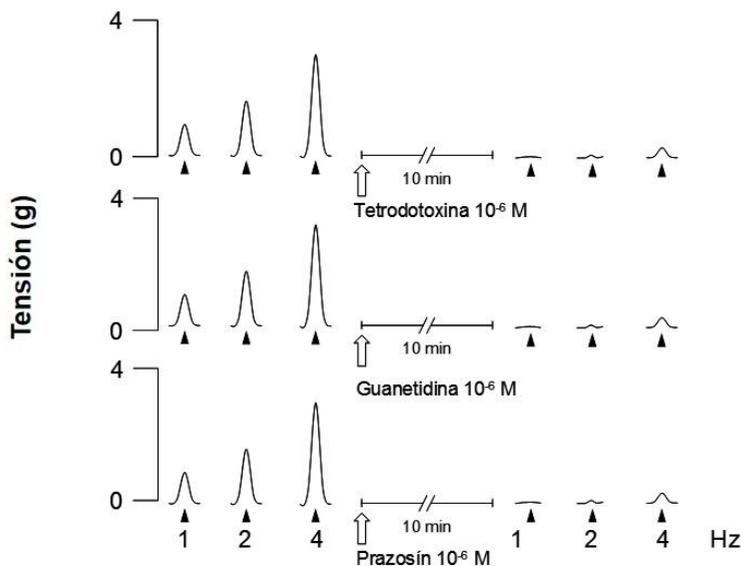


Figura 26. Ejemplo de registro de la respuesta al estímulo eléctrico perivascolar en segmentos de arteria carótida.

3.2. Curvas frecuencia-respuesta

En concordancia con los resultados obtenidos para la NE, el entrenamiento no cambió la respuesta al estímulo eléctrico en ninguno de los tres lechos vasculares estudiados (Figura 27, Tabla 9).

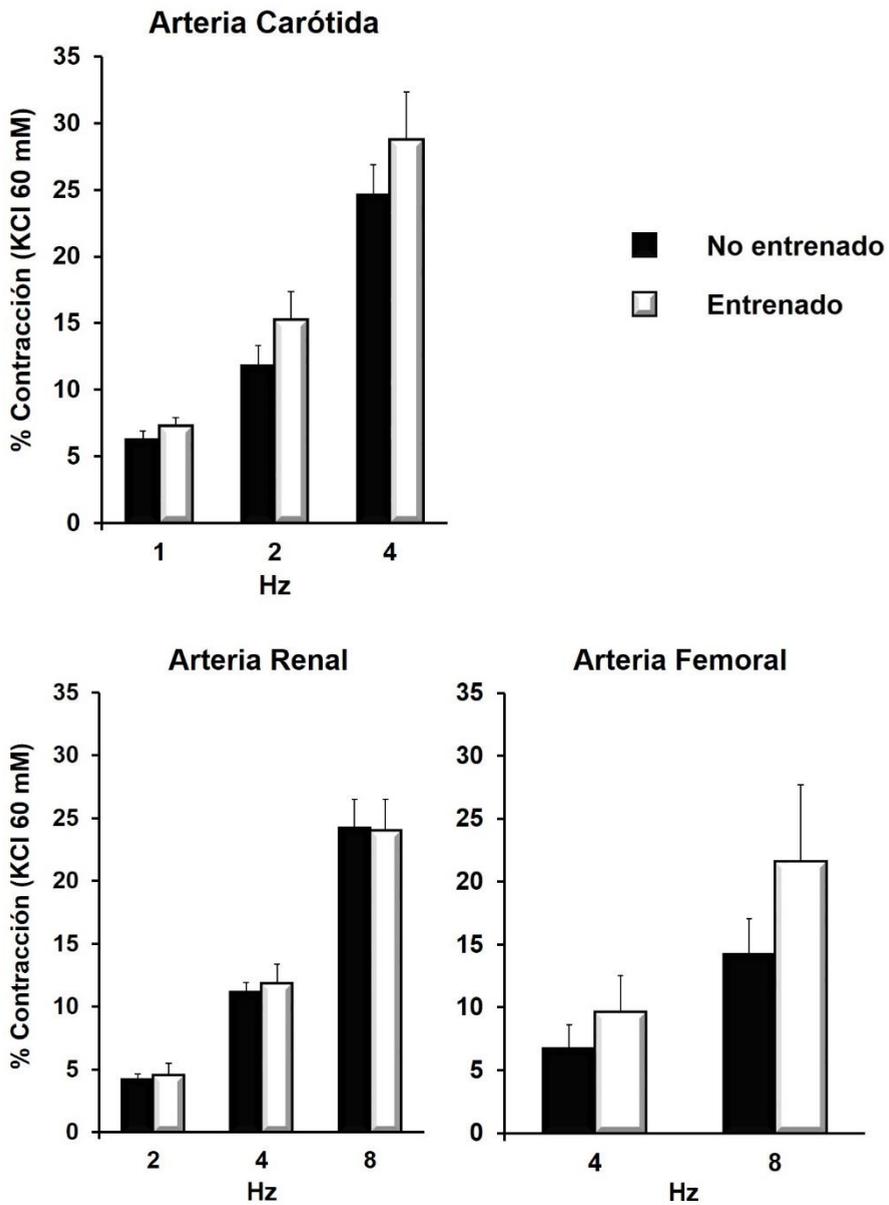


Figura 27. Curvas frecuencia-respuesta al estímulo eléctrico (EE) en el grupo no entrenado y en el entrenado en las arterias carótida, renal y femoral.

Tabla 9. Valores de % de contracción \pm error estándar (e.e.) en respuesta al estímulo eléctrico en segmentos de arteria carótida, renal y femoral procedentes de conejos no entrenados y entrenados.

Estímulo Eléctrico				
	n	1 Hz	2 Hz	4 Hz
Arteria Carótida				
No entrenado	24	6 \pm 1	12 \pm 2	25 \pm 2
Entrenado	18	7 \pm 1	15 \pm 2	29 \pm 4
Estímulo Eléctrico				
	n	2 Hz	4 Hz	8 Hz
Arteria Renal				
No entrenado	16	4 \pm 1	11 \pm 1	24 \pm 2
Entrenado	12	5 \pm 1	12 \pm 2	24 \pm 3
Estímulo Eléctrico				
	n	4 Hz	8 Hz	
Arteria Femoral				
No entrenado	14	7 \pm 2	14 \pm 3	
Entrenado	9	10 \pm 3	22 \pm 6	

n: número de conejos.

4. Niveles plasmáticos de NOx, L-Arginina y ADMA

Se midieron los niveles plasmáticos NOx, L-Arginina y ADMA en plasma en ambos grupos de estudio (Figura 28). Puesto que la L-Arginina es el sustrato de la NOS y el ADMA un inhibidor fisiológico de la misma, el cociente entre L-Arginina y ADMA indica la producción de NO (ratio de producción de NO). Como se puede observar en la figura 28, el entrenamiento físico no modificó los niveles plasmáticos de ninguna de las tres sustancias, por lo cual se puede concluir que la producción de NO en ambos grupos es similar.

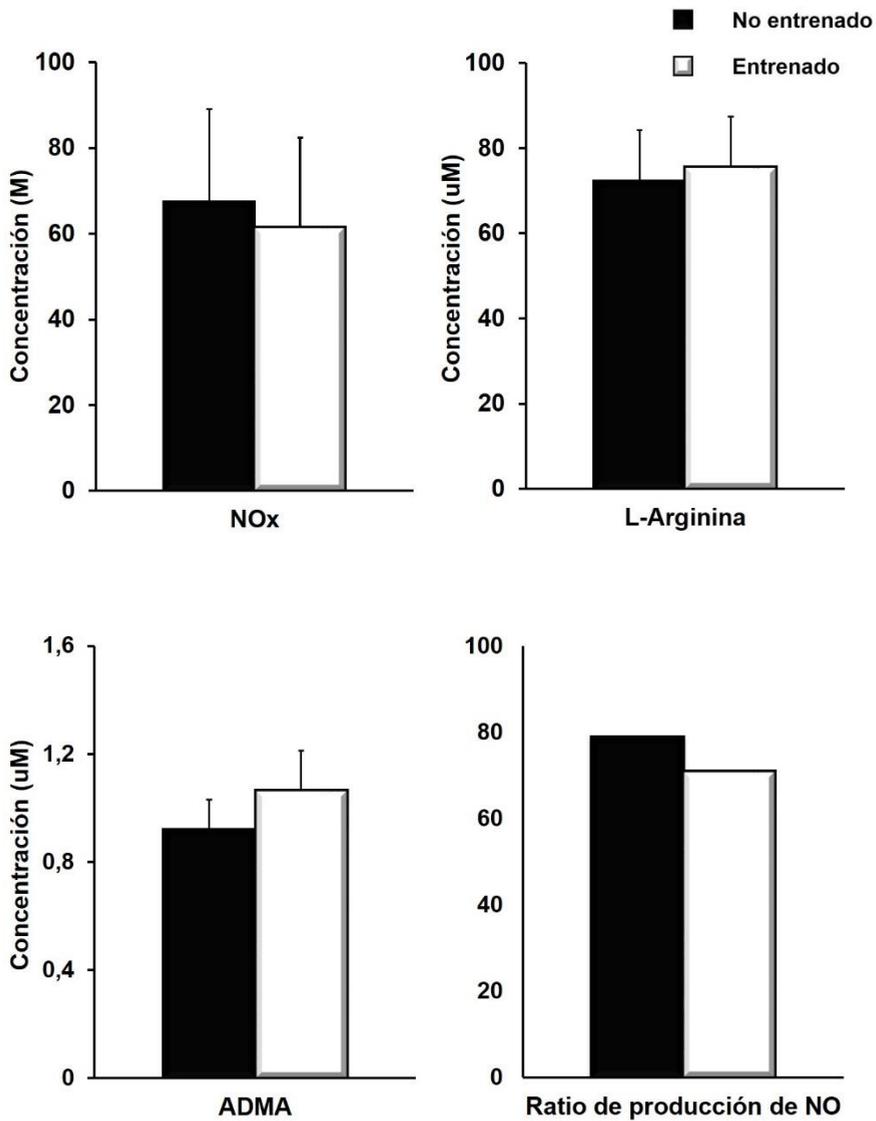


Figura 28. Niveles plasmáticos de nitratos y nitritos, L-Arginina, ADMA y ratio de producción de NO.

n= 10 en cada grupo.

n: número de conejos.

DISCUSIÓN

1. Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental

Cualquier experimento *in vitro* relacionado con la respuesta vascular debe ser valorado con cautela cuando se intenta extrapolar a la situación *in vivo*. La función endotelial está modulada por el estrés del flujo (116), un factor que no puede considerarse en nuestros estudios *in vitro* y en el vaso aislado ya que falta la regulación neurohormonal presente *in vivo* (16). Además, los mecanismos de adaptación que pueden aparecer en el organismo sólo pueden vislumbrarse en el vaso aislado como manifestaciones de la pared vascular como órgano efector. Pese a estas limitaciones, el estudio de la respuesta del órgano efector es uno de los objetivos primordiales para conocer los fundamentos de las alteraciones cardiovasculares en la disfunción endotelial. Este objetivo ha sido sistemáticamente inalcanzable en los estudios *in vivo* por las limitaciones derivadas del procedimiento experimental. Precisamente la presencia de reflejos y otras adaptaciones cardiovasculares en los estudios clínicos constituye una limitación cuando se quiere valorar la respuesta del órgano efector. En segundo lugar, los segmentos arteriales utilizados en este trabajo se limitan a las arterias carótida, renal y femoral, que no reflejan necesariamente lo que pueda ocurrir en otras arterias o en los vasos profundos de resistencia como arterias de pequeño calibre y arteriolas. Además, el hecho de ser arterias de conejo, no necesariamente se corresponde a la respuesta que podría ser obtenida en otras especies animales, ni en el ser humano.

A pesar de estas limitaciones, la ventaja de utilizar una preparación *in vitro* para evaluar los cambios en la reactividad vascular se basa en que las potenciales influencias neurales, humorales y metabólicas que están presentes en el organismo vivo pueden ser eliminadas, por lo que la respuesta que se evalúa es estrictamente vascular (16).

2. Justificación de la elección de la especie y los vasos de estudio

El modelo experimental utilizado obedece a la existencia de un modelo de entrenamiento desarrollado por el equipo del Dr. Such en el Departamento de Fisiología que ha resultado eficaz para valorar los cambios adaptativos que el entrenamiento físico produce a nivel cardiaco (104) y que está validado para el estudio de enfermedades cardiovasculares (117,118).

Las adaptaciones vasculares al entrenamiento no están limitadas a los vasos expuestos al *shear stress*, sino que también afecta a lechos poco activos o inactivos durante el ejercicio (2,11,55,56), por lo cual, el estudio simultáneo de estos vasos con diferente exposición al *shear stress* durante el ejercicio (arterias carótida, renal y femoral) puede permitirnos evidenciar cambios no uniformes inducidos por el entrenamiento. La arteria carótida es un vaso representativo de la circulación cerebral (63,119,120) de relevancia en la circulación sistémica y predictor de enfermedades vasculares (65,121). La arteria renal, relevante para la homeostasis (122), es un ejemplo de vaso que irriga un órgano en el cual el flujo sanguíneo no aumenta o disminuye durante el ejercicio (123,124), mientras que la arteria femoral representa un vaso de conducción que irriga áreas musculares activas durante el ejercicio (125).

3. Efectividad del entrenamiento

Entre los parámetros utilizados para considerar que un protocolo de entrenamiento físico es efectivo, se pueden mencionar el aumento del peso del corazón (126,127), el aumento del ratio peso del corazón-peso corporal (61,126–129), la disminución de la frecuencia cardiaca en reposo

(61,63,126,127,130,131) y en ejercicio (61,126), o el aumento de la actividad de la enzima citrato sintasa (CS) (61,64,126–128,132–134).

La CS es un marcador de la actividad mitocondrial y por tanto de la capacidad oxidativa celular inducida por el protocolo de entrenamiento. En este sentido, se utiliza como indicador de la adaptación del músculo esquelético al entrenamiento físico (135). De hecho, se ha demostrado una correlación positiva entre los cambios en el consumo máximo de oxígeno ($V.O_{2max}$) y la actividad de la CS (136). En conejos y roedores, la actividad de la CS se estudia en el sóleo (62,127,132,134,137,138), músculo compuesto principalmente por fibras tipo I caracterizadas por presentar adaptaciones al entrenamiento debido a su elevada capacidad oxidativa (62,64,127,133,134,139). Por ejemplo, en ratones se ha observado un aumento de las enzimas mitocondriales y de fibras tipo I en diferentes músculos esqueléticos inducidos por el ejercicio aeróbico (140). La mayoría de los estudios han demostrado un aumento de la actividad de la CS después del entrenamiento (62,127,132,141). La magnitud de este aumento puede variar en función del tiempo (64) y de la frecuencia de entrenamiento (142) así como de la especie estudiada (126). En sóleo de rata se han descrito aumentos de actividad de CS de un 15% (2 semanas de entrenamiento), un 30% (10 semanas de entrenamiento) o más del 50% (12 semanas de entrenamiento) (64). En cerdos, el incremento de la actividad de la CS medida en deltoides y tríceps, oscila entre el 15 y el 40% (16-20 semanas de entrenamiento) (126,139).

El aumento de la actividad de CS puede observarse a partir de la primera (69) o segunda (64,133,141) semana de entrenamiento y suele preceder a las adaptaciones en el tono vascular, que pueden no manifestarse antes de las cuatro semanas (64).

En el presente estudio hemos constatado un aumento del $26 \pm 3\%$ de la actividad de la enzima citrato sintasa en el músculo sóleo en el grupo de conejos entrenados confirmando la efectividad del protocolo de entrenamiento. Estos resultados, junto con los de estudios previos referentes a frecuencia cardiaca en reposo (104) y a la normalización de los niveles de lactato plasmático en las etapas finales del periodo de entrenamiento (143), indican que el protocolo utilizado se puede considerar como ejercicio físico crónico con adaptaciones de tipo aeróbico (144):

4. Respuesta relajante

Los factores relajantes endoteliales más conocidos, óxido nítrico y prostaciclina, se producen en respuesta a factores físicos como el estrés de flujo, y neurohumorales como el sistema simpático o diversas hormonas circulantes (7,16,17,55). En este sentido la vasodilatación endotelio-dependiente inducida por la acetilcolina representa una herramienta eficaz para caracterizar la función endotelial en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas tanto en modelos animales como en el ser humano (24,48,53). El tono vascular también está modulado por el factor hiperpolarizante derivado del endotelio el cual, aunque de naturaleza desconocida, probablemente actúe a través de canales de K^+ activados por Ca^{2+} (49,114). El factor hiperpolarizante sobre todo interviene en la regulación local del flujo sanguíneo en vasos de resistencia, a excepción de los lechos coronario y renal donde también contribuye a la regulación del tono vascular de las arterias de conducción (145).

4.1. Arteria carótida

Nuestros resultados indican que en la arteria carótida, el entrenamiento produce una menor relajación a la acetilcolina. El efecto máximo es menor en los conejos entrenados. Puesto que la relajación no se modifica en presencia de inhibidores de la COX, no parece que sea debida a la participación de prostanoideos relajantes. En presencia de L-NAME, inhibidor de la NOS, la respuesta relajante a la acetilcolina disminuye tanto en conejos entrenados como en no entrenados, indicando que parte de la respuesta es debida a la liberación de NO. Sin embargo la inhibición es mayor en el grupo control que en los entrenados. Las diferencias observadas pueden ser debidas a que nuestra pauta de entrenamiento disminuye la liberación de NO inducida por acetilcolina.

Estudios en animales y humanos demuestran que el entrenamiento mejora o no afecta la función endotelial (58–62). En este sentido, el presente trabajo es pionero en demostrar una disminución de la relajación a la acetilcolina en la arteria carótida en animales entrenados sanos con una pauta de intensidad moderada. Sun et al (146) encuentran resultados similares en aorta torácica de rata en un modelo de entrenamiento crónico de alta intensidad.

Diferentes estudios en animales de experimentación han evaluado los efectos del entrenamiento en la respuesta vascular en la arteria carótida. La mayoría de los estudios realizados en conejos y en ratas sanas no encontraron modificaciones en la respuesta relajante dependiente de endotelio en la arteria carótida, mientras que se produjo una mayor relajación en aorta y arteria pulmonar (63,132,147). En conjunto, los resultados indican que el flujo sanguíneo en la arteria carótida se mantiene relativamente constante durante el ejercicio. Los estudios que evidencian una mejoría de la relajación dependiente de endotelio en este lecho vascular corresponden a situaciones de

disfunción endotelial, como se demuestra en ratas viejas (148) o en ratas hipertensas obesas modificadas genéticamente (123).

Dado que la arteria carótida no está directamente expuesta al impacto del flujo sanguíneo durante el ejercicio, las adaptaciones inducidas por el entrenamiento podrían hacerse evidentes a largo plazo (149) y estarían relacionadas con cambios en la estructura de la pared vascular. En este sentido, los resultados en humanos son contradictorios. Mientras que la mayoría de estudios que analizan cambios estructurales no encuentran alteraciones en el diámetro interno de la carótida con el ejercicio (150–152), los resultados sobre el grosor de la pared difieren, ya que en algunos disminuye (150,151,153) mientras que en otros no se modifica (152). Estas diferencias pueden atribuirse a las distintas modalidades y duración de las pautas de entrenamiento.

En nuestro caso, un estudio histológico previo revela que el entrenamiento produjo una disminución del grosor de la pared de músculo liso sin disminución en el número de capas de células y sin que se modifique el diámetro de la luz vascular (154). Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que el entrenamiento puede producir una adaptación sistémica de la pared vascular para garantizar un flujo sanguíneo cerebral adecuado.

Al igual que otros autores (123), nosotros no encontramos participación de las prostaglandinas en la relajación dependiente de endotelio inducida por la acetilcolina en la arteria carótida, respuesta que no se modifica con el entrenamiento. En cuanto a la participación del NO, la inhibición de la NOS con L-NAME redujo la relajación a la acetilcolina lo cual implica que la respuesta está mediada por el NO. La respuesta relajante remanente insensible a la indometacina y al L-NAME se ha relacionado con el factor hiperpolarizante dependiente del endotelio (41,47). El bloqueo de la relajación en presencia de KCl 20 mM, indica que parte de la respuesta relajante es debida a la participación de estos canales. El EDHF produce sus acciones

principalmente a través de canales de potasio activados por calcio (114) que son sensibles a la inhibición por charibdotoxina y a la apamina (44,45). En nuestro caso, el bloqueo adicional de estos canales no modifica la relajación a la acetilcolina, poniendo en evidencia que en la arteria carótida común la vasodilatación dependiente de endotelio está mediada principalmente por el NO a través de la activación de la NOS y la participación de canales de K^+ distintos a los activados por calcio.

La mayoría de estudios coinciden en que la relajación dependiente de endotelio que provoca el entrenamiento está principalmente mediada por un aumento en la biodisponibilidad del NO. El aumento del gasto cardíaco y presión arterial media durante el ejercicio puede producir un aumento del estrés de flujo, asociado con una regulación al alza de la eNOS y una regulación a la baja de la ET-1 (2,6,77), mecanismos que junto a la disminución de radicales libres favorecerían el aumento de la biodisponibilidad del NO (58,60,62,63).

Paradójicamente, en nuestro estudio, la relajación a la acetilcolina en conejos entrenados es menor que en controles y el bloqueo del NO con L-NAME también es menor en entrenados que en controles.

Diferentes hipótesis podrían explicar este resultado. Una posibilidad es que la modalidad de entrenamiento empleada induzca un aumento del estrés oxidativo que repercutiría en una menor biodisponibilidad de óxido nítrico (155–157). En este contexto, Goto et al (158) demostraron que después de 12 semanas de entrenamiento aeróbico en sujetos sanos a alta intensidad había un aumento de los marcadores séricos de estrés oxidativo. En el mismo sentido, Sun et al (146) evaluaron los efectos de diferentes modalidades de ejercicio en aorta torácica de rata y encontraron que el entrenamiento crónico de alta intensidad disminuía la relajación a la acetilcolina y se asociaba a un estado proinflamatorio con aumento de la iNOS, de NO_x y de radicales libres. Sin

embargo, el hecho de que en presencia de SOD no se modifica la respuesta relajante a la acetilcolina, parece descartar que las diferencias observadas en el baño de órganos sean debidas a un aumento de radicales libres en el momento de evaluar la reactividad vascular. En el mismo sentido, se ha demostrado que 6 semanas de entrenamiento con la pauta utilizada, no indujo estrés oxidativo, medido en diferentes órganos, incluyendo el riñón y el cuádriceps femoral (159).

Otra posibilidad es que no se haya alcanzado el tiempo mínimo de entrenamiento como para verse alterada la función endotelial. En este sentido pautas de 4 semanas de entrenamiento no modifican la respuesta en aorta de conejo mientras que a las ocho semanas aumenta la relajación inducida por acetilcolina (141).

Las diferencias en la respuesta relajante a la acetilcolina también podrían ser debidas a que el entrenamiento produzca una menor sensibilidad del músculo liso a la relajación. El entrenamiento mejora la relajación independiente de endotelio en segmentos de arteria carótida y mesentérica de ratas en un modelo de obesidad e hipertensión arterial (123). Este es un mecanismo adaptativo importante que permitiría el mantenimiento del tono vascular en situaciones de disfunción endotelial. En nuestros resultados el entrenamiento no modifica la relajación inducida por el nitroprusiato sódico, un dador de óxido nítrico independiente de la función endotelial, por lo que no parece que nuestras condiciones experimentales modifiquen la sensibilidad del músculo liso a la relajación. Estos resultados coinciden con la mayoría de estudios previos en sujetos y animales sanos en diferentes lechos y especies (63,65,121,147,148,160).

4.2. Arteria renal

La redistribución del gasto cardiaco durante el ejercicio físico, aumentando el flujo sanguíneo hacia los músculos activos y disminuyendo la perfusión esplácnica y renal, representa un mecanismo de control del sistema cardiovascular (12–14). Se ha sugerido que el aumento del *shear stress* de la pared vascular es el principal estímulo para las adaptaciones vasculares inducidas por el ejercicio. En el entrenamiento crónico, la continua repetición de las modificaciones del flujo induce cambios estructurales y funcionales en los vasos sanguíneos (145). Estas modificaciones han sido bien caracterizadas en la circulación coronaria (161), pulmonar (63) y del músculo esquelético (67,73).

Aunque se sabe que el ejercicio físico agudo disminuye el flujo sanguíneo renal (13), hay pocos trabajos que estudien los efectos del entrenamiento crónico sobre la circulación renal a pesar de que el riñón sufre cambios bruscos en el flujo sanguíneo durante el ejercicio (13,61,99,162). En riñón perfundido de conejo entrenado, tanto la vasodilatación dependiente del endotelio como la independiente son mayores que en los controles. Este efecto parece que está relacionado no solo con el aumento de la biodisponibilidad de NO sino también con el aumento de la respuesta del músculo liso vascular renal al NO (162). Sin embargo, el entrenamiento disminuye la respuesta adrenérgica de la arteria renal en cerdos sin modificar la respuesta vasodilatadora a la bradiquinina (61), y tampoco se encuentran diferencias en la relajación dependiente del endotelio en arterias de resistencia de ratas (163).

En nuestro estudio, la acetilcolina produce relajación dependiente del endotelio en arteria renal de conejo. La máxima relajación a la acetilcolina y la pD₂ presentan valores semejantes en conejos control y entrenados por lo que no parece que el entrenamiento modifique la relajación a la acetilcolina. Estos resultados se pueden explicar por la importancia relativa de los factores

relajantes endoteliales en la modulación del tono vascular en diferentes partes de la circulación. El tono vascular de vasos de conducción como aorta o arteria renal no se regula por los mismos mecanismos que los vasos de resistencia que están implicados directamente en el control del flujo sanguíneo local (62,164,165). Por ejemplo, el papel del NO y del EDHF como mecanismos vasodilatadores endoteliales depende del calibre de los vasos (17,41,47). En nuestro estudio, el bloqueo de las sustancias prostanoideas con indometacina no modifica la respuesta relajante. Sin embargo, la inhibición de la producción de NO con L-NAME disminuye la respuesta relajante a la acetilcolina. Puesto que esta reducción es similar en controles y entrenados, no parece que el entrenamiento afecte la biodisponibilidad de NO. El hecho de que la respuesta al nitroprusiato sódico también sea semejante en ambos grupos de estudio, indica que nuestra pauta de entrenamiento no afecta la respuesta relajante del músculo liso en la arteria renal.

La relajación remanente, una vez bloqueada la producción de PG y de NO, es sustancialmente elevada y mucho mayor que la debida al NO, indicando la participación de otro mecanismo relajante endotelial que contribuye en gran parte a la respuesta relajante inducida por la acetilcolina. Esta relajación remanente se bloquea con bloqueantes inespecíficos de los canales de K^+ pero no en presencia de charibdotoxina y apamina, inhibidores de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} . En conjunto, estos resultados indican que la relajación inducida por acetilcolina en la arteria renal está mediada principalmente por canales de K^+ distintos de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} y refuerzan la importancia que posee el factor hiperpolarizante en la relajación inducida por acetilcolina en un vaso de conducción como puede ser la arteria renal. Estudios previos también asignan un papel destacado al EDHF en la regulación de la arteria renal, a pesar de ser un vaso de conducción y no de resistencia (145).

4.3. Arteria femoral

La respuesta al aumento de la carga de trabajo durante el ejercicio físico provoca incrementos de cuatro o cinco veces en el flujo sanguíneo sistémico. La marcada vasodilatación que se produce en el músculo esquelético activo junto con los efectos mecánicos de la bomba muscular se combinan para disminuir la resistencia vascular y por tanto redistribuir el flujo sanguíneo, absorbiendo el 80% del incremento del gasto cardíaco (166). No se sabe si estas adaptaciones están mediadas por cambios en la función endotelial o por otros mecanismos todavía no definidos.

La arteria femoral penetra profundamente en la masa muscular donde se ramifica en todas las direcciones distribuyendo el flujo sanguíneo por todo el músculo y controlando la perfusión tisular regional. Suministra flujo sanguíneo a los cuádriceps activos y grupos de músculos isquiotibiales, así como músculos inactivos del tren posterior. Las anastomosis y las colaterales también proporcionan vías alternativas para la distribución del flujo. En última instancia, los capilares transcurren longitudinalmente con las fibras musculares (167) y tienen una densidad mayor de fibras rojas (de contracción lenta, o tipo I) que de blancas (de contracción rápida, o tipo II). En general, la densidad capilar parece coincidir con el flujo de sangre tanto en reposo como durante el ejercicio (78,168).

Estudios en animales y humanos sanos han demostrado que el entrenamiento mejora la función endotelial en las arterias de las extremidades (6,149,169). En la arteria femoral, el entrenamiento mejora la dilatación dependiente del endotelio tanto en animales sanos como en aquellos que presentan factores de riesgo cardiovasculares (125,126,137,169–171). Estos resultados no son homogéneos; Padilla y colaboradores (126) no encontraron diferencias tras 16-20 semanas de entrenamiento en cerdos, mientras que Harris y colaboradores (125) demostraron que 6 semanas de entrenamiento

mejoraba la función endotelial en ratas ancianas pero no en jóvenes. Por otro lado, en arteria femoral de conejo, 6 semanas de entrenamiento mejoran la vasodilatación dependiente de endotelio (171).

Estas mejoras podrían estar relacionadas con el aumento de la expresión de la NOS endotelial (172), el incremento de prostanoïdes vasodilatadores (73), el aumento de la expresión de SOD Cu/Zn, un captador de radicales libres (173), o el aumento de la captación de Ca^{2+} por las células endoteliales, el cual es necesario para la síntesis de NO y de PGI_2 (174). En nuestros resultados, el hecho de que la respuesta a la acetilcolina no se modifique en presencia de indometacina, un bloqueante de la ciclooxigenasa, indica que no participan las prostaglandinas relajantes en esta respuesta. El L-NAME reduce la relajación a la acetilcolina en ambos grupos, control y entrenado, demostrando que la vasodilatación dependiente de endotelio en la arteria femoral esta mediada por NO. En conejos control, la participación del NO en la respuesta relajante a la acetilcolina es del 69% mientras que en los conejos entrenados es tan solo 38%. Esto supone que el entrenamiento no solo no incrementa los niveles locales de NO sino que incluso los disminuye. Sin embargo, en términos absolutos la relajación a la acetilcolina es similar en ambos grupos. Aunque la mayoría de los estudios demuestran que la vasodilatación dependiente de endotelio está principalmente mediada por NO (169,170), la vasodilatación remanente podría deberse a un mecanismo independiente de la NOS y de la COX, probablemente EDHF (170,175). Hay poca evidencia directa de la participación del EDHF en el ejercicio (14). Estudios en aorta torácica (114,142) y mesentérica de rata (114) así como arteria coronaria de cerdo (128) demuestran la participación de los canales de K^+ en la dilatación dependiente de endotelio en el entrenamiento crónico, los cuales están relacionados con el mecanismo de acción del EDHF. En nuestro caso la participación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} supone una

relajación adicional a la del NO, del 31% en la respuesta a la acetilcolina en el grupo control y del 62% en el grupo entrenado. Probablemente el entrenamiento lo que hace es invertir la participación de los factores relajantes dependientes del endotelio, incrementando la liberación de EDHF y disminuyendo la de NO. En este sentido se ha descrito que el NO tiene un tono inhibitorio sobre las vías de EDHF, y, en consecuencia, las relajaciones tipo EDHF se manifiestan solo en presencia de inhibición de la NOS. El aumento compensatorio de la liberación de EDHF cuando la biodisponibilidad de NO esta reducida, contribuye al mantenimiento de la vasodilatación dependiente de endotelio (41,47).

En nuestro trabajo la vasodilatación en la arteria femoral no se vio modificada por el entrenamiento. Diversos mecanismos pueden estar implicados en esta respuesta. Es posible que los efectos beneficiosos del entrenamiento se aprecien en mayor medida cuando exista una disfunción endotelial. Debido a que nuestros animales no poseen factores de riesgo que hagan pensar en una disfunción endotelial, los efectos beneficiosos del ejercicio físico no se hacen tan patentes. Otra posibilidad es que los animales hayan desarrollado cambios estructurales debidos a la continua demanda de flujo sanguíneo con el entrenamiento. En una primera fase, el aumento de la demanda de flujo se realiza reforzando los mecanismos locales que implican mayor vasodilatación, entre los cuales se encontrarían los mecanismos endoteliales, mientras que a largo plazo se puede producir una remodelación arterial capaz de suplir las modificaciones en la función endotelial. En este caso, la sensibilidad de los receptores de flujo y/o las vías de transducción de las señales celulares que habían iniciado la síntesis de NO y prostanoïdes tras la remodelación vascular por el entrenamiento, pueden haber sufrido una regulación a la baja. Estudios en humanos que evalúan la respuesta de la arteria femoral demuestran que el entrenamiento aumenta el diámetro interno

de la pared vascular (151,153) o disminuye el grosor de la misma (149–151). Ambos factores conducen a la mejora del flujo sanguíneo en las extremidades.

En resumen, en la arteria femoral de conejo, el entrenamiento disminuye la biodisponibilidad de NO que es compensada con un aumento de la liberación de EDHF.

5. Respuesta contráctil

Durante el ejercicio físico, las necesidades de redistribución del flujo no solo pueden alterar la respuesta relajante sino también la contráctil. En este sentido, hemos estudiado la respuesta contráctil inespecífica que viene determinada por la respuesta al KCl. La valoración de la respuesta específica, dependiente de receptor, la hemos estudiado sobre la respuesta adrenérgica por ser uno de los factores que mayor influencia tienen en el mantenimiento del tono vascular (82). También se ha analizado la respuesta a la endotelina por ser un factor de origen endotelial que puede estar modificado durante el ejercicio (2,6,77,176).

5.1. Respuesta contráctil inespecífica

El KCl a grandes concentraciones produce despolarización de la membrana seguida de contracción del músculo liso vascular por un mecanismo que involucra la entrada de calcio extracelular a través de la activación de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (177). Se trata de una respuesta inespecífica ya que no actúa sobre ningún receptor y que se utiliza como indicador de la integridad del aparato contráctil vascular.

La respuesta de la arteria carótida al KCl es menor que la de las arterias femoral y renal indicando diferencias estructurales y funcionales dependientes del lecho vascular. Algunos estudios evidencian una

disminución de la respuesta contráctil (61,129,178) con el ejercicio, mientras que otros no han descrito diferencias (61,130,133). En algunos casos, como en las arterias de resistencia, la respuesta puede estar aumentada (163), aunque estos vasos responden a los estímulos de una manera diferente a la de los vasos de conducción.

En nuestros resultados, el entrenamiento no modifica la respuesta contráctil al KCl en los lechos renal y femoral indicando que se mantiene la capacidad contráctil de estos vasos. Sin embargo, disminuye la respuesta contráctil al KCl en la arteria carótida. Aunque no encontramos precedentes en este lecho vascular, si los hay en otros lechos. Por ejemplo, una sola sesión de ejercicio moderado-intenso atenuó la respuesta contráctil al KCl en aorta torácica de rata (178), mientras que un mes de entrenamiento disminuyó la reactividad vascular al KCl en la arteria mesentérica de rata (129). Estas diferencias se atribuyen a un aumento de la biodisponibilidad de NO inducida por el ejercicio, tanto a nivel endotelial como del músculo liso vascular. En nuestro estudio, puesto que la respuesta a la acetilcolina indica una menor biodisponibilidad de NO con el entrenamiento, no parece probable que este sea el mecanismo responsable de estas diferencias. Es posible que la menor contracción sea debida a los cambios estructurales que producen una disminución del grosor de la capa de músculo liso vascular en los conejos entrenados (154). En cualquier caso, la menor respuesta se puede interpretar como un mecanismo de adaptación en el entrenamiento para preservar el flujo sanguíneo cerebral durante el ejercicio, cosa que no es necesaria en otros lechos vasculares como el renal o el femoral. En este sentido, las adaptaciones del músculo liso vascular al entrenamiento son dependientes del tamaño y la localización del vaso y de su participación durante el ejercicio (61,129,179).

5.2. Respuesta contráctil dependiente de receptor

Uno de los factores más importantes que intervienen en la regulación del tono vascular es la respuesta adrenérgica. En los vasos sanguíneos, la noradrenalina liberada de las terminaciones vasculares simpáticas o procedentes de la médula suprarrenal produce vasoconstricción por unión a los receptores α_1 postsinápticos localizados en el músculo liso. La unión con el receptor activa la fosfolipasa C con el consiguiente aumento de IP_3 responsable del aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular en el músculo liso vascular, que se traduce en una contracción (180). La inervación perivascular simpática se caracteriza por descargas aleatorias seguidas de períodos de inactividad. En reposo, hay una descarga basal de baja frecuencia de manera continua de alrededor de 1-2Hz que en situaciones de estrés fisiológico, como el ejercicio puede llegar hasta 50Hz (127,181). La naturaleza neurógena y adrenérgica de la respuesta al estímulo eléctrico se confirma por la reducción significativa inducida por tetrodotoxina, un bloqueante neural de los canales de sodio y por guanetidina, bloqueante de la neurotransmisión adrenérgica. Además, el bloqueo selectivo de los receptores α_1 con prazosín indica que la respuesta esta mediada en gran parte por la activación de receptores α_1 adrenérgicos.

La noradrenalina produce una contracción dependiente de la concentración al igual que el estímulo eléctrico produce una contracción dependiente de la frecuencia. En ninguno de los territorios estudiados, la pauta de entrenamiento ha inducido modificaciones de la respuesta adrenérgica. En general, el entrenamiento, considerado como ejercicio crónico, reduce el tono simpático, atenúa el barorreflejo (182), disminuye la respuesta contráctil simpática y la sensibilidad vascular a la noradrenalina (183). Estos efectos se han relacionado con una regulación al alza de los receptores α_2 endoteliales y el aumento de la expresión de eNOS (60), además de depender de la pauta de

entrenamiento (2,55,77,100). El entrenamiento también puede reducir la actividad simpática en pacientes con insuficiencia cardíaca (184), y el aumento de la actividad simpática asociada a la edad (138).

Nuestros experimentos se han efectuado en animales sanos donde los efectos del ejercicio físico no son tan patentes. De hecho, estudios similares indican que el entrenamiento moderado no modifica o tiende a disminuir la respuesta a la noradrenalina en arterias de conducción (61,142) mientras que en ejercicios de corta duración o de alta intensidad la puede aumentar (69). Es probable que las diferencias en la respuesta a la noradrenalina se pongan de manifiesto con periodos más prolongados de entrenamiento. En este sentido, 8 semanas de entrenamiento disminuye la sensibilidad a la noradrenalina sin cambios en el efecto máximo en aorta torácica de conejos, efecto que se ha relacionado con un aumento de la liberación de NO inducida por la noradrenalina (131). En aorta abdominal de rata, 4 semanas de entrenamiento no modifican la respuesta a la noradrenalina, mientras que a las 10 semanas la sensibilidad disminuyó por un mecanismo dependiente de endotelio (60,133).

La literatura disponible sobre los efectos del ejercicio físico sobre la respuesta simpática es contradictoria. Estudios previos demostraron que el entrenamiento aumenta (69,127,185), disminuye (133,134,183,186) o no modifica (67) la respuesta neurógena simpática mediada por los receptores α -adrenérgicos.

Mientras que la disminución de la respuesta adrenérgica durante el ejercicio se ha asociado con una disminución de la liberación de noradrenalina de las terminaciones simpáticas y con el aumento de la liberación y biodisponibilidad de NO (134), el aumento de la respuesta adrenérgica estaría relacionada con el incremento de la producción de ROS que neutralizaría los efectos vasodilatadores del NO (79,80,155–158,187).

Este efecto podría ser debido a la participación de receptores adrenérgicos y no ocurrir cuando la respuesta depende de otro tipo de receptor. Sin embargo, el estudio de los efectos de la ET-1, un potente vasoconstrictor derivado del endotelio, que se producen por activación de receptores ETa y b (2,4) tampoco produce modificaciones con el ejercicio. El entrenamiento disminuye la sensibilidad a la ET-1 en coronarias de cerdo (188) y descende los niveles plasmáticos de ET-1 en adultos sanos (176). Diferencias metodológicas en la pauta de entrenamiento, especie y lecho vascular utilizados pueden ser responsables de estas discrepancias.

Atendiendo a estos resultados, es posible que el entrenamiento no induzca cambios en el número y distribución de receptores tanto adrenérgicos como de la endotelina. Se necesitan más estudios para dilucidar el papel del entrenamiento sobre la respuesta contráctil mediada por receptores.

6. Niveles plasmáticos de nitratos y nitritos, L-Arginina y ADMA

Hay muchas evidencias experimentales que demuestran que los episodios reiterados de ejercicio agudo pueden inducir una regulación al alza de la eNOS, aumentando la síntesis y liberación de NO, con la consiguiente elevación de los niveles plasmáticos de NOx (2,7,11,14,55,56). Sin embargo, en otros estudios no se ha demostrado de manera consistente el aumento de los niveles de NOx en plasma ya que estas adaptaciones suelen ser transitorias y desaparecen con el tiempo (189). Mención aparte merecen los estudios realizados con ejercicio crónico o con pautas de entrenamiento. En este caso son pocos los estudios que han determinado un aumento de los niveles de NOx plasmáticos después del entrenamiento.

Tanto en modelos animales (190,191) como en humanos (176,192), diversas pautas de entrenamiento producen aumento de los niveles plasmáticos de NOx que se han relacionado con una regulación al alza de la expresión y actividad de la NOS. Ahora bien, cuando aumenta la intensidad del entrenamiento, el aumento de los niveles plasmáticos de NOx se han relacionado con el aumento de la iNOS (146).

Contrariamente, otros estudios no encuentran cambios en los niveles plasmáticos de NOx, como por ejemplo 12 semanas de entrenamiento aeróbico en ratas (193), o 24 semanas de entrenamiento de intensidad moderada a alta en adultos y ancianos (194). En este caso, es probable que el aumento del estrés oxidativo inducido por el ejercicio contrarreste las variaciones de NO. En este sentido, nosotros tampoco encontramos diferencias en los niveles plasmáticos de NOx con el entrenamiento. Una de las posibles explicaciones es que la pauta de entrenamiento se corresponda con una situación crónica en la que se ha normalizado la sobreexpresión de la eNOS y el *shear stress* y se haya producido remodelación vascular, situación en la que los valores de NO vuelven a la normalidad (7,57,189).

Hay muchos factores que pueden modificar la biodisponibilidad de NO, como la disminución de la expresión de la eNOS, la deficiencia del sustrato L-arginina, o los niveles elevados de ADMA (195,196), los cuales han sido considerados como un factor de riesgo cardiovascular. El ejercicio aeróbico regular es una estrategia efectiva para reducir los factores de riesgo cardiovascular y se ha asociado con la reducción de los niveles de ADMA en las personas obesas o con sobrepeso (197), con enfermedad arterial periférica (198) o diabetes (199) y en mujeres postmenopáusicas (200). El factor común entre estos estudios es la disfunción endotelial. Sin embargo no hay estudios que relacionen el ejercicio físico con los niveles de NO y ADMA en individuos sanos. En este sentido, de nuestros resultados se deduce que el

entrenamiento no modifica los niveles de ADMA plasmáticos ni la producción de NO por lo que no parece que altere la vía ADMA-NO.

7. Consideraciones finales

El aumento del gasto energético y del catabolismo que se produce durante el ejercicio físico induce cambios funcionales adaptativos en el organismo encaminados a procurar un aumento del aporte energético a los músculos activos, además de facilitar la eliminación de los productos del metabolismo. El aumento del flujo a músculos activos se produce en detrimento de órganos inactivos como el riñón o el territorio esplácnico. El sistema cardiovascular es el encargado de ejercer estas funciones a través de mecanismos nerviosos que implican la activación del sistema simpático-adrenal y de sustancias liberadas localmente, que estimulan la vasoconstricción o la vasodilatación. Estos mecanismos pueden diferir según el territorio vascular considerado. El resultado final es el control del gasto cardíaco y la redistribución del flujo sanguíneo.

La práctica regular de ejercicio moderado ha demostrado prevenir, mejorar o revertir la disfunción endotelial en animales y sujetos con factores de riesgo o enfermedad cardiovascular. La mejoría de la función endotelial es inducida por el *shear stress* producido por ejercicio, que estimula la liberación de sustancias vasoactivas endoteliales, principalmente el NO, al cual se le atribuyen la mayoría de los efectos beneficiosos del ejercicio tanto a nivel vascular como sistémico. Asimismo, la intensidad del ejercicio influye en el equilibrio entre el estrés oxidativo generado y la biodisponibilidad de NO. Las especies reactivas de oxígeno degradan el NO antes de que produzca su efecto vasodilatador sobre el músculo liso vascular. Sin embargo, la estimulación reiterada de la producción de NO como resultado del entrenamiento disminuye

la producción de radicales libres y la degradación del NO. En este sentido, un entrenamiento de baja intensidad puede no ser suficiente para producir adaptaciones vasculares y es necesario incrementarlo a intensidad moderada para mejorar la función vascular. Sin embargo, el ejercicio de alta intensidad puede asociarse con niveles elevados de *shear stress* y respuesta inflamatoria después del ejercicio lo que disminuiría los efectos beneficiosos hemodinámicos.

Mención aparte merecen los estudios en individuos sanos. En este caso los resultados no son tan concluyentes, entre otras causas porque la respuesta depende del lecho vascular, de la especie, así como del tipo y duración del ejercicio físico.

Nuestro estudio ofrece una base experimental de los mecanismos adaptativos inducidos por una pauta de entrenamiento en vasos arteriales de distintos territorios.

El entrenamiento induce una respuesta vascular dependiente del territorio aunque no produce mejoría de la función endotelial en ninguno de los lechos estudiados. Mientras que en la arteria renal el entrenamiento no modifica la respuesta vascular a estímulos relajantes y contráctiles, si lo hace en las arterias carótida y femoral. En la arteria renal, que el entrenamiento no modifique la respuesta vascular indica que la función renal esta preservada para mantener la homeostasis. Este efecto es contrario a los cambios hemodinámicos renales que disminuyen el flujo sanguíneo renal durante el ejercicio y por tanto, los mecanismos implicados en el ejercicio físico agudo y crónico seguramente serán distintos.

En las arterias carótida y femoral, el entrenamiento disminuye la vasodilatación mediada por el óxido nítrico, si bien en la arteria femoral este efecto está compensado probablemente por el aumento de la participación de otro factor relajante de origen endotelial como es el EDHF, mientras que en la

carótida la falta de compensación hace que la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina sea menor en los entrenados. Se podría pensar que estos cambios son consecuencia de modificaciones en la sensibilidad del músculo liso vascular al NO. Sin embargo la respuesta al nitroprusiato sódico, un dador externo de NO, no se modifica con el entrenamiento.

En la arteria carótida, la menor vasodilatación inducida por la acetilcolina probablemente sea debida a una menor biodisponibilidad de NO. Una menor respuesta dilatadora reduciría el flujo sanguíneo en un territorio que no es activo durante el ejercicio en favor del incremento de flujo a los territorios activos. Sin embargo, la arteria carótida, junto a la basilar, aportan el flujo sanguíneo al cerebro por lo que una menor respuesta vasodilatadora podría poner en riesgo el aporte de sangre a dicho órgano. En nuestro caso, donde la alteración de la producción de NO es manifiesta, la disminución de la respuesta contráctil del músculo liso compensaría la menor biodisponibilidad de NO actuando como un mecanismo protector no farmacológico para mantener el flujo sanguíneo cerebral.

En la arteria femoral, que corresponde a un territorio activo, también se produce una menor biodisponibilidad de NO, pero en este caso se ve compensada por el aumento de EDHF a través de canales de K^+ activados por Ca^{2+} . Este mecanismo compensatorio, que mantiene la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina, ha sido observado en diferentes lechos vasculares.

Está demostrado que las características de la pauta de ejercicio, (agudo o crónico; bajo, moderado o intenso) modifican la función vascular. En modelos de entrenamiento similares al nuestro, las pautas de entrenamiento de hasta seis semanas de duración se consideran como un entrenamiento agudo, donde las adaptaciones al entrenamiento, si las hay, son debidas fundamentalmente a cambios en la función endotelial, mientras que ocho

semanas o más corresponde a un entrenamiento crónico en cuyo caso las adaptaciones se atribuyen a cambios estructurales acompañados de la normalización de la función endotelial. Tanto los cambios en la función como en la estructura se pueden producir de forma progresiva y no uniforme dependiendo del lecho vascular.

CONCLUSIONES

- 1) En la arteria carótida, el ejercicio físico crónico disminuye la relajación a la acetilcolina por disminuir la biodisponibilidad de NO. Este efecto se compensa probablemente con cambios estructurales en el músculo liso que disminuyen su capacidad contráctil.
- 2) En la arteria renal, el ejercicio físico crónico no modifica la respuesta relajante a la acetilcolina ni al nitroprusiato sódico; tampoco afecta a la respuesta contráctil adrenérgica, al KCl ni a la endotelina. Por lo tanto, el entrenamiento no parece que afecte al tono vascular ni la biodisponibilidad del NO en este lecho vascular preservando así la hemodinámica renal y la homeostasia.
- 3) En la arteria femoral el ejercicio físico crónico disminuye la biodisponibilidad de NO inducida por acetilcolina que se compensa con un aumento de relajación mediada por canales de K^+ activados por Ca^{2+} , compatible con una compensación por aumento de EDHF.
- 4) El ejercicio físico crónico no modifica los niveles plasmáticos de L-arginina, ADMA ni de NOx.

BIBLIOGRAFÍA

1. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J*. 2007 Oct;28(19):2375–414.
2. Thijssen DHJ, Maiorana AJ, O’Driscoll G, Cable NT, Hopman MTE, Green DJ. Impact of inactivity and exercise on the vasculature in humans. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Mar;108(5):845–75.
3. Vina J, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello V, Gomez-Cabrera MC. Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. *Br J Pharmacol*. 2012 Sep;167(1):1–12.
4. Blair SN, Morris JN. Healthy hearts--and the universal benefits of being physically active: physical activity and health. *Ann Epidemiol*. 2009 Apr;19(4):253–6.
5. Thosar SS, Johnson BD, Johnston JD, Wallace JP. Sitting and endothelial dysfunction: the role of shear stress. *Med Sci Monit*. 2012 Dec;18(12):RA173–80.
6. Thijssen DHJ, Rongen GA, Smits P, Hopman MTE. Physical (in)activity and endothelium-derived constricting factors: overlooked adaptations. *J Physiol*. 2008 Jan;586(2):319–24.
7. Di Francescomarino S, Sciartilli A, Di Valerio V, Di Baldassarre A, Gallina S. The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Med*. 2009;39(10):797–812.
8. Nocon M, Hiemann T, Muller-Riemenschneider F, Thalau F, Roll S, Willich SN. Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2008 Jun;15(3):239–46.
9. Recomendaciones Mundiales sobre Actividad Física para la Salud, OMS, ISBN: 9789241599979
http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789243599977_spa.pdf
10. Gielen S, Schuler G, Adams V. Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms. *Circulation*. 2010 Sep;122(12):1221–38.
11. Padilla J, Simmons GH, Bender SB, Arce-Esquivel AA, Whyte JJ, Laughlin MH. Vascular effects of exercise: endothelial adaptations beyond active muscle beds. *Physiology (Bethesda)*. 2011 Jun;26(3):132–45.
12. Whyte JJ, Laughlin MH. The effects of acute and chronic exercise on the vasculature. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010 Aug;199(4):441–50.
13. McAllister RM. Adaptations in control of blood flow with training: splanchnic and renal blood flows. *Med Sci Sports Exerc*. 1998 Mar;30(3):375–81.
14. Clifford PS, Hellsten Y. Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2004 Jul;97(1):393–403.
15. Negrín y López J. El tono vascular y el mecanismo de la acción vasotónica del esplácnico. *J Gen Ser [Internet]*. 2006;100(Issue extraordinario). Available from: <http://www.rac.es>
16. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004 Jul;93(1):105–13.

17. Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int.* 2006 Sep;70(5):840–53.
18. Badimon L, Martinez-Gonzalez J. [Endothelium and vascular protection: an update]. *Rev Esp Cardiol.* 2002;55 Suppl 1:17–26.
19. Aird WC. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med.* 2004 May;32(5 Suppl):S271–9.
20. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007 Feb;100(2):158–73.
21. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res.* 2007 Feb;100(2):174–90.
22. Feletou M, Tang EHC, Vanhoutte PM. Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control. *Front Biosci.* 2008;13:4198–217.
23. Feletou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
24. Furchgott RF, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980 Nov;288(5789):373–6.
25. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol.* 2008 Jan;93(1):141–7.
26. Andresen J, Shafi NI, Bryan RMJ. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol.* 2006 Jan;100(1):318–27.
27. Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res.* 2005 Aug;39(8):797–815.
28. Sureda A, Tauler P, Aguilo A, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, et al. Blood cell NO synthesis in response to exercise. *Nitric Oxide.* 2006 Aug;15(1):5–12.
29. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med.* 2003 Oct;35(7):790–6.
30. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev.* 2005 Jun;57(2):217–52.
31. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol Rev.* 2009 Mar;61(1):62–97.
32. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev.* 1998 Jan;78(1):53–97.
33. Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL 2nd, et al. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation.* 2000 Jun;101(23):2742–8.
34. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet (London, England).* 1989 Oct;2(8670):997–1000.
35. Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS. Dimethylarginine

dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Dec;293(6):H3227–45.

36. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 1999 Jun;99(24):3092–5.

37. Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol*. 2011 Oct;164(3):894–912.

38. Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives -. *Circ J*. 2010 May;74(5):836–43.

39. Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Vasoconstrictor prostanoids. *Pflugers Arch*. 2010 May;459(6):941–50.

40. Tang EHC, Vanhoutte PM. Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol Ther*. 2009 May;122(2):140–9.

41. Bellien J, Thuillez C, Joannides R. Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008 Aug;22(4):363–77.

42. de Wit C, Boettcher M, Schmidt VJ. Signaling across myoendothelial gap junctions--fact or fiction? *Cell Commun Adhes*. 2008 Sep;15(3):231–45.

43. Dora KA. Coordination of vasomotor responses by the endothelium. *Circ J*. 2010 Feb;74(2):226–32.

44. Feletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Aug;117(4):139–55.

45. Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol*. 2011 Oct;164(3):839–52.

46. Edwards G, Feletou M, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch*. 2010 May;459(6):863–79.

47. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009 Feb;202(2):330–44.

48. Triggie CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012 Jun;90(6):713–38.

49. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998 Nov;396(6708):269–72.

50. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995 Apr;268(4 Pt 1):C799–822.

51. Feletou M. The Endothelium: Part 2: EDHF-Mediated Responses “The Classical Pathway.” San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences Publisher; 2011.

52. Feletou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol*. 2009 Feb;156(4):545–62.

53. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009 Jun;196(2):193–222.
54. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988 Mar;332(6163):411–5.
55. Zanesco A, Antunes E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. *Pharmacol Ther*. 2007 Jun;114(3):307–17.
56. Laughlin MH, Newcomer SC, Bender SB. Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. *J Appl Physiol*. 2008 Mar;104(3):588–600.
57. Brown MD. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Exp Physiol*. 2003 Sep;88(5):645–58.
58. Jasperse JL, Laughlin MH. Endothelial function and exercise training: evidence from studies using animal models. *Med Sci Sports Exerc*. 2006 Mar;38(3):445–54.
59. McAllister RM, Newcomer SC, Laughlin MH. Vascular nitric oxide: effects of exercise training in animals. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab*. 2008 Feb;33(1):173–8.
60. Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol*. 1993 Sep;75(3):1354–63.
61. McAllister RM, Kimani JK, Webster JL, Parker JL, Laughlin MH. Effects of exercise training on responses of peripheral and visceral arteries in swine. *J Appl Physiol*. 1996 Jan;80(1):216–25.
62. McAllister RM, Jasperse JL, Laughlin MH. Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2005 Feb;98(2):753–61.
63. Chen HI, Li HT. Physical conditioning can modulate endothelium-dependent vasorelaxation in rabbits. *Arterioscler Thromb a J Vasc Biol / Am Hear Assoc*. 1993 Jun;13(6):852–6.
64. Delp MD, Laughlin MH. Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats. *Med Sci Sports Exerc*. 1997 Nov;29(11):1454–61.
65. Kemi OJ, Haram PM, Wisloff U, Ellingsen O. Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. *Circulation*. 2004 Jun;109(23):2897–904.
66. Sun D, Huang A, Koller A, Kaley G. Adaptation of flow-induced dilation of arterioles to daily exercise. *Microvasc Res*. 1998 Jul;56(1):54–61.
67. Sun D, Huang A, Koller A, Kaley G. Short-term daily exercise activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats. *J Appl Physiol*. 1994 May;76(5):2241–7.
68. Yang A-L, Tsai S-J, Jiang MJ, Jen CJ, Chen H. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. *J Biomed Sci*. 2002 Apr;9(2):149–55.
69. McAllister RM, Laughlin MH. Short-term exercise training alters responses of porcine femoral and brachial arteries. *J Appl Physiol*. 1997 May;82(5):1438–44.
70. Johnson LR, Laughlin MH. Chronic exercise training does not alter

- pulmonary vasorelaxation in normal pigs. *J Appl Physiol.* 2000 Jun;88(6):2008–14.
71. Oltman CL, Parker JL, Laughlin MH. Endothelium-dependent vasodilation of proximal coronary arteries from exercise-trained pigs. *J Appl Physiol.* 1995 Jul;79(1):33–40.
72. Laughlin MH, Rubin LJ, Rush JWE, Price EM, Schrage WG, Woodman CR. Short-term training enhances endothelium-dependent dilation of coronary arteries, not arterioles. *J Appl Physiol.* 2003 Jan;94(1):234–44.
73. Koller A, Huang A, Sun D, Kaley G. Exercise training augments flow-dependent dilation in rat skeletal muscle arterioles. Role of endothelial nitric oxide and prostaglandins. *Circ Res.* 1995 Apr;76(4):544–50.
74. Jasperse JL, Laughlin MH. Vasomotor responses of soleus feed arteries from sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol.* 1999 Feb;86(2):441–9.
75. Lash JM, Bohlen HG. Time- and order-dependent changes in functional and NO-mediated dilation during exercise training. *J Appl Physiol.* 1997 Feb;82(2):460–8.
76. Muller JM, Myers PR, Laughlin MH. Vasodilator responses of coronary resistance arteries of exercise-trained pigs. *Circulation.* 1994 May;89(5):2308–14.
77. Green DJ, Spence A, Halliwill JR, Cable NT, Thijssen DHJ. Exercise and vascular adaptation in asymptomatic humans. *Exp Physiol.* 2011 Feb;96(2):57–70.
78. Green DJ, Bilsborough W, Naylor LH, Reed C, Wright J, O'Driscoll G, et al. Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide. *J Physiol.* 2005 Jan;562(Pt 2):617–28.
79. Gomez-Cabrera M-C, Domenech E, Vina J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jan;44(2):126–31.
80. Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med.* 2011 Sep;51(5):942–50.
81. Tsuru H, Tanimitsu N, Hirai T. Role of perivascular sympathetic nerves and regional differences in the features of sympathetic innervation of the vascular system. *Jpn J Pharmacol.* 2002 Jan;88(1):9–13.
82. Guimaraes S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.* 2001 Jun;53(2):319–56.
83. Sorriento D, Trimarco B, Iaccarino G. Adrenergic mechanism in the control of endothelial function. *Transl Med @ UniSa.* 2011 Sep;1:213–28.
84. Daniel EE, Brown RD, Wang YF, Low AM, Lu-Chao H, Kwan CY. Alpha-adrenoceptors in canine mesenteric artery are predominantly 1A subtype: pharmacological and immunochemical evidence. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Nov;291(2):671–9.
85. Villalobos-Molina R, Ibarra M. Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur J Pharmacol.* 1996 Mar;298(3):257–63.
86. Satoh M, Enomoto K, Takayanagi I, Koike K. Analysis of alpha1-adrenoceptor subtypes in rabbit aorta and arteries: regional difference and co-existence. *Eur J Pharmacol.* 1999 Jun;374(2):229–40.
87. Flavahan NA, Cooke JP, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Human postjunctional

- alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors: differential distribution in arteries of the limbs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987 May;241(2):361–5.
88. Guimaraes S, Paiva MQ, Moura D. Alpha 2-adrenoceptor-mediated responses to so-called selective alpha. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1987 Apr;335(4):397–402.
89. Bevan JA, Duckworth J, Laher I, Oriowo MA, McPherson GA, Bevan RD. Sympathetic control of cerebral arteries: specialization in receptor type, reserve, affinity, and distribution. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1987 Sep;1(3):193–8.
90. Van Riper DA, Bevan JA. Selective variation of agonist and neurally mediated vasoconstriction with rabbit middle cerebral artery branch order. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991 May;257(2):879–86.
91. Bevan RD, Dodge J, Nichols P, Penar PL, Walters CL, Wellman T, et al. Weakness of sympathetic neural control of human pial compared with superficial temporal arteries reflects low innervation density and poor sympathetic responsiveness. *Stroke.* 1998 Jan;29(1):212–21.
92. Bohr DF. Adrenergic receptors in coronary arteries. *Ann N Y Acad Sci.* 1967 Feb;139(3):799–807.
93. Kingwell BA. Nitric oxide as a metabolic regulator during exercise: effects of training in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000 Apr;27(4):239–50.
94. Osswald W, Guimaraes S. Adrenergic mechanisms in blood vessels: morphological and pharmacological aspects. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1983;96:53–122.
95. Conti V, Russomanno G, Corbi G, Izzo V, Vecchione C, Filippelli A. Adrenoreceptors and nitric oxide in the cardiovascular system. *Front Physiol.* 2013;4:321.
96. Wilson MG, Ellison GM, Cable NT. Basic science behind the cardiovascular benefits of exercise. *Heart.* 2015 May;101(10):758–65.
97. Wei X, Liu X, Rosenzweig A. What do we know about the cardiac benefits of exercise? *Trends Cardiovasc Med.* 2015 Aug;25(6):529–36.
98. Fisher JP, Young CN, Fadel PJ. Autonomic adjustments to exercise in humans. *Compr Physiol.* 2015 Apr;5(2):475–512.
99. Armstrong RB, Laughlin MH. Exercise blood flow patterns within and among rat muscles after training. *Am J Physiol.* 1984 Jan;246(1 Pt 2):H59–68.
100. Joyner MJ, Green DJ. Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. *J Physiol.* 2009 Dec;587(Pt 23):5551–8.
101. Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol.* 2009 Jun;157(4):527–36.
102. Ding H, Triggle CR. Endothelial dysfunction in diabetes: multiple targets for treatment. *Pflugers Arch.* 2010 May;459(6):977–94.
103. Herrera MD, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev.* 2010 Apr;9(2):142–52.
104. Such L, Alberola AM, Such-Miquel L, Lopez L, Trapero I, Pelechano F, et

- al. Effects of chronic exercise on myocardial refractoriness: a study on isolated rabbit heart. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008 Aug;193(4):331–9.
105. Spina RJ, Chi MM, Hopkins MG, Nemeth PM, Lowry OH, Holloszy JO. Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. *J Appl Physiol*. 1996 Jun;80(6):2250–4.
106. Srere PA. [1] Citrate synthase. [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods Enzymol*. 1969;13:3–11.
107. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76–85.
108. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem*. 1969 Nov;244(22):6049–55.
109. Martinez C, Vila JM, Aldasoro M, Medina P, Chuan P, Lluich S. The human deferential artery: endothelium-mediated contraction in response to adrenergic stimulation. *Eur J Pharmacol*. 1994 Aug;261(1-2):73–8.
110. Martinez C, Cases E, Vila JM, Aldasoro M, Medina P, Marco V, et al. Influence of endothelial nitric oxide on neurogenic contraction of human pulmonary arteries. *Eur Respir J*. 1995 Aug;8(8):1328–32.
111. Miles AM, Wink DA, Cook JC, Grisham MB. Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol*. 1996;268:105–20.
112. Heines SV. Peter Griess---Discoverer of diazo compounds. *J Chem Educ*. 1958;35:187–91.
113. Bird IM. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ*. 1989 Sep;299(6702):783–7.
114. Chen SJ, Wu CC, Yen MH. Exercise training activates large-conductance calcium-activated K(+) channels and enhances nitric oxide production in rat mesenteric artery and thoracic aorta. *J Biomed Sci*. 2001 Jun;8(3):248–55.
115. Hall J, Jones TH, Channer KS, Jones RD. Mechanisms of agonist-induced constriction in isolated human mesenteric arteries. *Vascul Pharmacol*. 2006 Jun;44(6):427–33.
116. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986 Jun;250(6 Pt 2):H1145–9.
117. Gil Hernandez A, Ramirez Tortosa MC, Aguilera Garcia MC, Mesa Garcia MD. [Experimental models of cardiovascular disease]. *Nutr Hosp*. 2007 Apr;22(2):169–77.
118. Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim*. 2004 Jul;38(3):246–56.
119. Kapoor K, Kak VK, Singh B. Morphology and comparative anatomy of circulus arteriosus cerebri in mammals. *Anat Histol Embryol*. 2003 Dec;32(6):347–55.
120. Scremin OU, Sonnenschein RR, Rubinstein EH. Cerebrovascular anatomy and blood flow measurements in the rabbit. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1982;2(1):55–66.
121. Masseur I, Davis MJ, Bowles DK. Carotid inflammation is unaltered by exercise in hypercholesterolemic Swine. *Med Sci Sports Exerc*. 2012 Dec;44(12):2277–89.

122. Hoenig MP, Zeidel ML. Homeostasis, the milieu interieur, and the wisdom of the nephron. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 Jul;9(7):1272–81.
123. Arvola P, Wu X, Kahonen M, Makynen H, Riutta A, Mucha I, et al. Exercise enhances vasorelaxation in experimental obesity associated hypertension. *Cardiovasc Res*. 1999 Sep;43(4):992–1002.
124. Shepherd JT. Circulatory response to exercise in health. *Circulation*. 1987;76(6 Pt 2):VI3–10.
125. Harris MB, Slack KN, Prestosa DT, Hryvniak DJ. Resistance training improves femoral artery endothelial dysfunction in aged rats. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Feb;108(3):533–40.
126. Padilla J, Newcomer SC, Simmons GH, Kreutzer K V., Laughlin MH. Long-term exercise training does not alter brachial and femoral artery vasomotor function and endothelial phenotype in healthy pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Aug;299(2):H379–85.
127. Jendzjowsky NG, DeLorey DS. Short-term exercise training augments sympathetic vasoconstrictor responsiveness and endothelium-dependent vasodilation in resting skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Aug;303(3):R332–9.
128. Xie W, Parker JL, Heaps CL. Exercise training-enhanced, endothelium-dependent dilation mediated by altered regulation of BK(Ca) channels in collateral-dependent porcine coronary arterioles. *Microcirculation*. 2013 Feb;20(2):170–82.
129. Jansakul C, Hirunpan P. Effects of exercise training on responsiveness of the mesenteric arterial bed to phenylephrine and KCl in male rats. *Br J Pharmacol*. 1999 Aug;127(7):1559–66.
130. Jansakul C. Effect of swimming on vascular reactivity to phenylephrine and KCl in male rats. *Br J Pharmacol*. 1995 Jun;115(4):587–94.
131. Chen HI, Li HT, Chen CC. Physical conditioning decreases norepinephrine-induced vasoconstriction in rabbits. Possible roles of norepinephrine-evoked endothelium-derived relaxing factor. *Circulation*. 1994 Aug;90(2):970–5.
132. Yang A-L, Chen H-I. Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis*. 2003 Jul;169(1):11–7.
133. Spier SA, Laughlin MH, Delp MD. Effects of acute and chronic exercise on vasoconstrictor responsiveness of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol*. 1999 Nov;87(5):1752–7.
134. Blanco-Rivero J, Roque FR, Sastre E, Caracuel L, Couto GK, Avendano MS, et al. Aerobic exercise training increases neuronal nitric oxide release and bioavailability and decreases noradrenaline release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2013 May;31(5):916–26.
135. Hansen AK, Fischer CP, Plomgaard P, Andersen JL, Saltin B, Pedersen BK. Skeletal muscle adaptation: training twice every second day vs. training once daily. *J Appl Physiol*. 2005 Jan;98(1):93–9.
136. Vigelso A, Andersen NB, Dela F. The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2014;6(2):84–101.

137. Jen CJ, Chan H-P, Chen H. Chronic exercise improves endothelial calcium signaling and vasodilatation in hypercholesterolemic rabbit femoral artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Jul;22(7):1219–24.
138. Donato AJ, Lesniewski LA, Delp MD. Ageing and exercise training alter adrenergic vasomotor responses of rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol.* 2007 Feb;579(Pt 1):115–25.
139. McAllister RM, Reiter BL, Amann JF, Laughlin MH. Skeletal muscle biochemical adaptations to exercise training in miniature swine. *J Appl Physiol.* 1997 Jun;82(6):1862–8.
140. Toti L, Bartalucci A, Ferrucci M, Fulceri F, Lazzeri G, Lenzi P, et al. High-intensity exercise training induces morphological and biochemical changes in skeletal muscles. *Biol Sport.* 2013 Dec;30(4):301–9.
141. Yang A-L, Jen CJ, Chen H. Effects of high-cholesterol diet and parallel exercise training on the vascular function of rabbit aortas: a time course study. *J Appl Physiol.* 2003 Sep;95(3):1194–200.
142. Heylen E, Guerrero F, Mansourati J, Theron M, Thioub S, Saiag B. Effect of training frequency on endothelium-dependent vasorelaxation in rats. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008 Feb;15(1):52–8.
143. Germán PG. Estudio de los efectos del entrenamiento físico sobre algunas propiedades electrofisiológicas miocárdicas ventriculares mediante el análisis de la fibrilación ventricular inducida. Una investigación en corazón aislado de conejo. Universidad de Valencia; 2012.
144. Laia BF. Estudio de la participación de las neuronas colinérgicas miocárdicas sobre las modificaciones que el ejercicio físico crónico produce en la activación eléctrica y parámetros asociados, durante la fibrilación ventricular. Universidad de Valencia; 2014.
145. Busse R, Fleming I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res.* 1998 Apr;35(2):73–84.
146. Sun M-W, Zhong M-F, Gu J, Qian F-L, Gu J-Z, Chen H. Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens Res.* 2008 Apr;31(4):805–16.
147. Chen Hi H–., Chiang I-P, Jen CJ. Exercise Training Increases Acetylcholine-Stimulated Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Biomed Sci.* 1996 Dec;3(6):454–60.
148. Leosco D, Iaccarino G, Cipolletta E, De Santis D, Pisani E, Trimarco V, et al. Exercise restores beta-adrenergic vasorelaxation in aged rat carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Jul;285(1):H369–74.
149. Thijssen DHJ, Cable NT, Green DJ. Impact of exercise training on arterial wall thickness in humans. *Clin Sci (Lond).* 2012 Apr;122(7):311–22.
150. Thijssen DHJ, Dawson EA, van den Munckhof ICL, Birk GK, Timothy Cable N, Green DJ. Local and systemic effects of leg cycling training on arterial wall thickness in healthy humans. *Atherosclerosis.* 2013 Aug;229(2):282–6.
151. Rowley NJ, Dawson EA, Hopman MTE, George KP, Whyte GP, Thijssen DHJ, et al. Conduit diameter and wall remodeling in elite athletes and spinal cord injury. *Med Sci Sports Exerc.* 2012 May;44(5):844–9.

152. Moreau KL, Donato AJ, Seals DR, Dinunno FA, Blackett SD, Hoetzer GL, et al. Arterial intima-media thickness: site-specific associations with HRT and habitual exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Oct;283(4):H1409–17.
153. Spence AL, Carter HH, Naylor LH, Green DJ. A prospective randomized longitudinal study involving 6 months of endurance or resistance exercise. Conduit artery adaptation in humans. *J Physiol.* 2013 Mar;591(Pt 5):1265–75.
154. Benavent N, Machado I, Mauricio MD, Aldasoro M, Vila JM NR. Structural and functional changes in rabbit carotid arteries after exercise training. In: Annual Congress of the European Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), Granada, Spain. 2011.
155. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Feb;23(2):168–75.
156. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2000 Jul;32(5):293–304.
157. Salisbury D, Bronas U. Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction. *Nurs Res.* 2015 Feb;64(1):53–66.
158. Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, et al. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation.* 2003 Aug;108(5):530–5.
159. Such L, Rodriguez A, Alberola A, Lopez L, Ruiz R, Artal L, et al. Intrinsic changes on automatism, conduction, and refractoriness by exercise in isolated rabbit heart. *J Appl Physiol.* 2002 Jan;92(1):225–9.
160. Haram PM, Adams V, Kemi OJ, Brubakk AO, Hambrecht R, Ellingsen O, et al. Time-course of endothelial adaptation following acute and regular exercise. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2006 Aug;13(4):585–91.
161. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev.* 2008 Jul;88(3):1009–86.
162. De Moraes R, Gioseffi G, Nobrega ACL, Tibirica E. Effects of exercise training on the vascular reactivity of the whole kidney circulation in rabbits. *J Appl Physiol.* 2004 Aug;97(2):683–8.
163. Kocer G, Kuru O, Gunduz F, Bayram Z, Ozdem S, Aksoy D, et al. The effect of exercise training on the responsiveness of renal resistance arteries in rats. *Ren Fail.* 2011;33(6):587–92.
164. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000 Oct;44(2):333–40.
165. Durand MJ, Gutterman DD. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation.* 2013 Apr;20(3):239–47.
166. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation.* UNITED STATES; 1998 Dec;98(24):2709–15.
167. Bearden SE, Segal SS. Neurovascular alignment in adult mouse skeletal muscles. *Microcirculation* 2005;12(2):161–7.
168. Laughlin MH, Armstrong RB. Muscle blood flow during locomotory

- exercise. *Exerc Sport Sci Rev.* 1985;13:95–136.
169. Guerrero F, Thioub S, Goanvec C, Theunissen S, Feray A, Balestra C, et al. Effect of tetrahydrobiopterin and exercise training on endothelium-dependent vasorelaxation in SHR. *J Physiol Biochem.* 2013 Jun;69(2):277–87.
170. Woodman CR, Ingram D, Bonagura J, Laughlin MH. Exercise training improves femoral artery blood flow responses to endothelium-dependent dilators in hypercholesterolemic pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Jun;290(6):H2362–8.
171. Jen CJ, Liu Y-F, Chen H-I. Short-term exercise training improves vascular function in hypercholesterolemic rabbit femoral artery. *Chin J Physiol.* 2005 Jun;48(2):79–85.
172. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res.* 1994 Feb;74(2):349–53.
173. Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, Harrison DG. Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res.* 1996 Jul;79(1):32–7.
174. Falcone JC, Kuo L, Meininger GA. Endothelial cell calcium increases during flow-induced dilation in isolated arterioles. *Am J Physiol.* 1993 Feb;264(2 Pt 2):H653–9.
175. Delaney LE, Arce-Esquivel AA, Kuroki K, Laughlin MH. Exercise training improves vasoreactivity in the knee artery. *Int J Sports Med.* 2012 Feb;33(2):114–22.
176. Maeda S, Miyauchi T, Kakiyama T, Sugawara J, Iemitsu M, Irukayama-Tomobe Y, et al. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. *Life Sci.* 2001 Jul;69(9):1005–16.
177. Thorneloe KS, Nelson MT. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005 Mar;83(3):215–42.
178. Bechara LRG, Tanaka LY, Santos AM dos, Jordao CP, Sousa LGO de, Bartholomeu T, et al. A single bout of moderate-intensity exercise increases vascular NO bioavailability and attenuates adrenergic receptor-dependent and -independent vasoconstrictor response in rat aorta. *J Smooth Muscle Res.* 2008;44(3-4):101–11.
179. Lash JM. Training-induced alterations in contractile function and excitation-contraction coupling in vascular smooth muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 1998 Jan;30(1):60–6.
180. Exton JH. Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena. *Am J Physiol.* 1985 Jun;248(6 Pt 1):E633–47.
181. Macefield VG, Wallin BG, Vallbo AB. The discharge behaviour of single vasoconstrictor motoneurons in human muscle nerves. *J Physiol.* 1994 Dec;481 (Pt 3):799–809.
182. DiCarlo SE, Bishop VS. Exercise training attenuates baroreflex regulation of nerve activity in rabbits. *Am J Physiol.* 1988 Oct;255(4 Pt 2):H974–9.
183. Wiegman DL, Harris PD, Joshua IG, Miller FN. Decreased vascular sensitivity to norepinephrine following exercise training. *J Appl Physiol.* 1981 Aug;51(2):282–7.

184. Fraga R, Franco FG, Roveda F, de Matos LNJ, Braga AMFW, Rondon MUPB, et al. Exercise training reduces sympathetic nerve activity in heart failure patients treated with carvedilol. *Eur J Heart Fail.* 2007 Jul;9(6-7):630–6.
185. Jendzjowsky NG, Delorey DS. Short-term exercise training enhances functional sympatholysis through a nitric oxide-dependent mechanism. *J Physiol.* 2013 Mar;591(Pt 6):1535–49.
186. Mortensen SP, Nyberg M, Gliemann L, Thaning P, Saltin B, Hellsten Y. Exercise training modulates functional sympatholysis and alpha-adrenergic vasoconstrictor responsiveness in hypertensive and normotensive individuals. *J Physiol.* 2014 Jul;592(Pt 14):3063–73.
187. Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci.* 1997 Jun;15(3):353–63.
188. Jones AW, Rubin LJ, Magliola L. Endothelin-1 sensitivity of porcine coronary arteries is reduced by exercise training and is gender dependent. *J Appl Physiol.* 1999 Sep;87(3):1172–7.
189. Green DJ, Maiorana A, O’Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol.* 2004 Nov;561(Pt 1):1–25.
190. Ito D, Ito O, Cao P, Mori N, Suda C, Muroya Y, et al. Effects of exercise training on nitric oxide synthase in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2013 Feb;40(2):74–82.
191. Napoli C, Williams-Ignarro S, De Nigris F, Lerman LO, Rossi L, Guarino C, et al. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun;101(23):8797–802.
192. Maeda S, Tanabe T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, Miyauchi T, et al. Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. *Hypertens Res.* 2004;27(12):947–53.
193. Perez AC, de Oliveira CC, Prieto JG, Ferrando A, Vila L, Alvarez AI. Quantitative assessment of nitric oxide in rat skeletal muscle and plasma after exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2002 Nov;88(1-2):189–91.
194. Brinkley TE, Fenty-Stewart NM, Park J-Y, Brown MD, Hagberg JM. Plasma nitrate/nitrite levels are unchanged after long-term aerobic exercise training in older adults. *Nitric Oxide.* 2009 Dec;21(3-4):234–8.
195. Lu T-M, Ding Y-A, Chang M-J, Lin S-J. Asymmetrical dimethylarginine: a novel risk factor for coronary artery disease. *Clin Cardiol.* 2003 Oct;26(10):458–64.
196. Wilson AM, Shin DS, Weatherby C, Harada RK, Ng MK, Nair N, et al. Asymmetric dimethylarginine correlates with measures of disease severity, major adverse cardiovascular events and all-cause mortality in patients with peripheral arterial disease. *Vasc Med.* 2010 Aug;15(4):267–74.
197. Maeda S, Miyaki A, Kumagai H, Eto M, So R, Tanaka K, et al. Lifestyle modification decreases arterial stiffness and plasma asymmetric dimethylarginine level in overweight and obese men. *Coron Artery Dis.* 2013 Nov;24(7):583–8.
198. Schlager O, Giurgea A, Schuhfried O, Seidinger D, Hammer A, Groger M, et al. Exercise training increases endothelial progenitor cells and decreases asymmetric dimethylarginine in peripheral arterial disease: a randomized controlled

trial. *Atherosclerosis*. 2011 Jul;217(1):240–8.

199. Mittermayer F, Pleiner J, Krzyzanowska K, Wiesinger GF, Francesconi M, Wolzt M. Regular physical exercise normalizes elevated asymmetrical dimethylarginine concentrations in patients with type 1 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr*. 2005 Dec;117(23-24):816–20.

200. Tanahashi K, Akazawa N, Miyaki A, Choi Y, Ra S-G, Matsubara T, et al. Plasma ADMA concentrations associate with aerobic fitness in postmenopausal women. *Life Sci*. 2014 Jul;108(1):30–3.

