



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultat de **M**edicina i **O**dontologia

Departament de Fisiologia

TESIS DOCTORAL

Efecto de las ciclooxigenasas en la biodisponibilidad del óxido nítrico en la respuesta vascular al tromboxano A₂ en un modelo murino de envejecimiento y menopausia.

Cyclooxygenases effect on nitric oxide bioavailability in the vascular response to thromboxane A₂ using a murine model of aging and menopause.

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGÍA

Doctorando

D. Xavier Vidal Gómez

Directores

Dra. Susana Novella del Campo

Dr. Pascual Medina Bessó

Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla

València, 20 de diciembre del 2018



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Fisiologia

Dra. Susana Novella del Campo, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Fisiología de la Universitat de València, Dr. Pascual Medina Bessó, Catedrático del Departamento de Fisiología, y Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que D. Xavier Vidal Gómez, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Efecto de las ciclooxigenasas en la biodisponibilidad del óxido nítrico en la respuesta vascular al tromboxano A₂ en un modelo murino de envejecimiento y menopausia” para alcanzar el Grado de Doctor por la Universitat de València.

València, 16 de noviembre del 2018

Dra. Susana Novella Dr. Pascual Medina Dr. Carlos Hermenegildo

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido, de una forma u otra, a que haya podido realizar la presente tesis.

Primero de todo, quiero agradecer a mis tres directores, la Dra. Susana Novella, el Dr. Pascual Medina y el Dr. Carlos Hermenegildo, el permitirme poder llevar a cabo este trabajo de investigación bajo su supervisión. Carlos, gracias por permitirme haber formado parte de tu grupo de investigación durante estos seis años y darme la oportunidad de poder iniciar mi carrera investigadora. Pascual, gràcies per estar sempre amb la porta oberta per a resoldre dubtes quan he necessitat i per la teua amabilitat. Susana, gracias por todo. A ti, sobretodo, he de agradecerte la grandísima paciencia que has tenido conmigo a lo largo de estos años y por estar siempre disponible cuando he tenido cualquier duda. No sólo has sido mi jefa, también has sido como mi segunda madre, la “investigadora”.

A mis amigos y compañeros de “batalla”, los LInCEs. Al Dr. Pérez Cremades y a la futura Dra. Mompeón. Dani, Ana, gracias por hacer más fácil el día a día en el lab. Siempre dispuestos a escuchar y hacerme pensar con claridad cuando mi juicio se nublabá. Cada día que hemos pasado juntos durante estos seis años ha sido inolvidable. Al Dr. Bueno y a la Dra. de Lazaro. Carlos, Maca, vosotros fuisteis los primeros en acogerme en el grupo y de enseñarme a trabajar en un laboratorio. A la Dra. Natalia Martínez y al resto de LInCEs como María Oltra, Christian Alite y Ana Ballester, entre otros. A todos, gracias por vuestra paciencia y por dejarme aprender cada día cosas nuevas a vuestro lado.

A Jesica Portero, por tu amistad, por saber escuchar y por aconsejarme siempre que lo he necesitado.

A la Dra. Gloria Segarra per la seua amabilitat i disposició a ajudar-me sempre que he necessitat. A la Dra. Isabel Pérez, per fer més entretinguts

els llargs dies d'experiments de reactivitat vascular, sempre disposta a riure. No voldria oblidar a Joan i Javi, avui dos grans doctors que han demostrat un gran interès per la investigació biomèdica.

Al grup dels CiberER, per tots aquests anys de fer comboi fora del laboratori (viatges, torrades, excursions...) José Luis, Lorena, Marta, Santi, Isa, Ester, Daymee, Giselle, Rebeca, Jesús, i Guille: gràcies per fer possible que Ciber-Lince no siga només la fusió del nom dels dos grups, sino la referència d'una gran amistat que conviu dins i fora del lab.

A las chicas y chicos del "FreshAge". Adrian, Fernando, Cristina, Andrea, Lucia, Marta, Jorge, Ester, Coralie, Paloma, Raquel, Aitor, Carla, Mar, Aurora, Tanja, Gloria, Pellín,... Gracias por ser como sois y por hacer tan agradables la hora de la comida.

A la Dra. Ana Díaz, veterinaria del Animalario de la UCIM por su amabilidad, disponibilidad y su gran profesionalidad. También a cada uno del cuerpo técnico que he tenido la suerte de conocer y que sin ellos, esta tesis no podría haberse realizado.

A les secretaries del Dept. de Fisiologia, les més eficients i simpàtiques de tota la Universitat de València, Mari i Elena. Gràcies per la vostra paciència al llarg de tots aquests anys. Mari, gràcies per tota la teua ajuda sempre que he tingut algun dubte (que no han sigut pocs), aquesta tesis no haguera sigut ser possible sense tú.

A Inma, por su amabilidad y su simpatía, especialmente a las 7 de la mañana.

Un especial agradecimiento a la Dra. Carmen Martínez y al Dr. Andriantsitohaina. Carmen, Naina, gracias por acogerme y hacerme sentir como un miembro más de su grupo de investigación "Stress oxydant et pathologies métaboliques" durante mis dos estancias en la Université d'Angers (Francia). A mi postdoc favorita, la Dra. Perdomo, por todo el tiempo que hemos pasado juntos durante los 6 meses que estuve en

Angers. Lily, gracias por hacerme tan fácil el día a día. I would like to thank to all the other SOPAM members (Soazig, Raphaella, Luisa, Sylvain, Edward, Simon, Catherine B, Marine, Melody, Alexandre, Jeremy, Maeva V, Maeva D, Vanessa, Nadia, Gregory, Patricia, Mireille, Nabil) for their help and counsel during my stay in their lab. Thank you very much everyone.

A todo el equipo que conforma el Biobanco IBSP-CV. A Jacobo por su confianza, amistad y por darme la posibilidad de volver a formar parte de su equipo. A Andrea, Joan, Diego y Fani por acogerme como uno más y ofrecerme su amistad desde el primer día. A Carol, per la seua amistat, per estar sempre disponible per a parlar i riure. A Carmen Aguado i Salva Martí, amics i companys del Biobanc CiberER, gràcies per ser com sou i per fer tan agradables els dies que passem al Biobanc. I como no, al resto de miembros de la Red Valenciana de Biobancos, por hacerme disfrutar cada uno de los días que he pasado con vosotros.

A Laura, Cris, Adri i Lluís, per ser com sou i per tot el temps passat i que encara passarem junts. Gràcies per la vostra amistat.

A Ana, Arturo, Laura y Jose, por estar siempre ahí, especialmente cuando más lo he necesitado. Gracias por vuestra amistad sin condiciones. A Marta, Alba, Marco y Alejandro, por despertar en mí el Peter Pan que llevo dentro.

A Eugenia por todo lo que me has ofrecido desde que nos conocemos, tu amabilidad y tu simpatía. A Clara, por aguantarme y quererme tal y como soy, aunque haya cambiado “poco” desde los 4 años. A Lola, por su cariño desde mi infancia.

A mis tíos y primos, por su cariño y apoyo. Gracias por estar siempre ahí siempre que lo he necesitado.

A mis yayas, Carmen y Maruja, piezas clave en mi educación. Gracias por hacer de mi una mejor persona, por cuidar de mi como un hijo, por su amor incondicional. Si hoy estoy aquí es por vosotras.

A mi hermana Amalia y a mi cuñado Jesús, por ser un gran apoyo, especialmente cuando las cosas se han puesto difíciles. Y sobre todo, a la pequeña gran revolución que tengo la suerte de disfrutar, a mi sobrina Paula. Haces que cada día valga la pena seguir adelante.

A mis padres, Lupe y Armando. Gracias por vuestro amor y vuestro apoyo. Lo que soy y donde he llegado ha sido gracias a vosotros.

Es más que probable que me deje a mucha gente a la que agradecer tanto, por ello, quiero disculparme. Pero podéis estar seguros que de una forma u otra, os estoy eternamente agradecido por ayudarme en la consecución de este objetivo.

Por último, agradecer a nivel institucional al Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA por su apoyo durante mi formación investigadora mediante diferentes ayudas y contratos.

En definitiva, muchas gracias a todos.

Este trabajo ha sido financiado por:

Red de Investigación Cardiovascular (RIC) RD12/0042/0052, Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Economía y Competitividad. Proyectos FIS-ISCIII PI13/00617 y FIS-ISCIII PI16/00229, Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto AICO/2018/009 de la Consellería d'Educació, Investigació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENVEJECIMIENTO Y RIESGO CARDIOVASCULAR	3
1.2. ENDOTELIO Y FUNCIÓN VASCULAR	4
1.2.1. ÓXIDO NÍTRICO Y RELAJACIÓN VASCULAR	6
1.2.2. TROMBOXANO A ₂ Y CONTRACCIÓN VASCULAR	12
1.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL: INTERACCIÓN COX-NOS	16
1.3.1. DISMINUCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE NO	18
1.3.2. COX Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	20
1.4. ESTRÓGENOS Y FUNCIÓN VASCULAR	21
1.4.1. ESTRADIOL Y MECANISMO DE ACCIÓN	23
1.4.2. ESTRADIOL Y FUNCIÓN ENDOTELIAL	26
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
2.1 HIPÓTESIS	33
2.2 OBJETIVOS	34
3. MATERIAL Y MÉTODOS	37
3.1. MODELO EXPERIMENTAL DE ENVEJECIMIENTO Y MENOPAUSIA	39
3.1.1. GRUPOS DE ESTUDIO	40
3.1.2. EXTIRPACIÓN QUIRÚRGICA DE LOS OVARIOS	41
3.2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	42
3.2.1. DETERMINACIÓN DE LA ESPERANZA DE VIDA MEDIA Y MÁXIMA	42
3.2.2. REGISTRO DE LA PRESIÓN ARTERIAL	43
3.3. ESTUDIOS <i>EX VIVO</i>	44
3.3.1. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS, OBTENCIÓN DE PLASMA Y ANÁLISIS BIOQUÍMICO	44
3.3.2. REACTIVIDAD VASCULAR EN BAÑOS DE ÓRGANOS	44
3.4. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	48

3.4.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA	48
3.4.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES ARTERIALES	48
3.4.3. PRODUCCIÓN DE SUPERÓXIDO EN SECCIONES ARTERIALES	49
3.4.4. EXPRESIÓN DE mRNA EN AORTA	51
3.5 FÁRMACOS UTILIZADOS	53
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	54
4. RESULTADOS	57
4.1. RATONAS SAM COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO VASCULAR	59
4.1.1. CURVAS DE SUPERVIVENCIA	59
4.1.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	59
4.1.3. EVOLUCIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL CON LA EDAD	62
4.1.4. ESTUDIO DE REACTIVIDAD VASCULAR	64
4.2. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO MURINO DE MENOPAUSIA EXPERIMENTAL Y ENVEJECIMIENTO VASCULAR	72
4.2.1. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS	72
4.2.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA PARED ARTERIAL	75
4.2.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA OVARIECTOMIA Y EL TRATAMIENTO CON E2 SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR	75
4.2.3.1. Respuesta al KCl y al U46619	77
4.2.3.2. Respuesta a la acetilcolina	80
4.3. PAPEL DE LA NOS Y LA COX EN LA CONTRACCIÓN AL U46619	82
4.3.1. INHIBICIÓN DE LA NOS EN LA CONTRACCIÓN AL U46619	82
4.3.2. INHIBICIÓN DE LA COX EN LA CONTRACCIÓN AL U46619	85

4.3.3. INHIBICIÓN CONJUNTA DE LA NOS Y LA COX EN LA CONTRACCIÓN AL U46619	87
4.3.4. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO Y LA MENOPAUSIA EXPERIMENTAL EN LA PRODUCCIÓN DE ANIONES SUPERÓXIDO	89
4.4. CONTRIBUCIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA COX A LA RESPUESTA VASCULAR AL U46619	102
4.4.1. PAPEL DE LA COX-1 EN LA CONTRACCIÓN AL U46619 Y LA BIODISPONIBILIDAD DE NO	102
4.4.2. PAPEL DE LA COX-2 EN LA CONTRACCIÓN AL U46619 Y LA BIODISPONIBILIDAD DE NO	106
4.4.3. PARTICIPACIÓN DE LA COX-1 Y LA COX-2 EN LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO	110
4.5. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO Y LA FALTA DE ESTRÓGENOS EN LA EXPRESIÓN DE eNOS, COX-1 Y COX-2	118
5. DISCUSIÓN	123
5.1. SAMR1/SAMP8 COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO VASCULAR	125
5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL E2 EN LA FUNCIÓN VASCULAR DEL MODELO SAMR1/SAMP8	132
5.2.1. PARTICIPACIÓN DEL NO Y PROSTANOIDES EN LA CONTRACCIÓN AL TXA ₂	138
5.2.2. GENERACIÓN DEL O ₂ ⁻ VASCULAR	141
5.2.3. CONTRIBUCIÓN DE COX-1 Y COX-2 EN LA RESPUESTA AL TXA ₂	147
5.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	152
5.4. IMPLICACIONES CLÍNICAS	153
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	157
7. BIBLIOGRAFÍA	163
8. PUBLICACIONES	209

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Homodímero de la óxido nítrico sintasa (NOS).	8
Figura 2. Regulación del tono vascular por el óxido nítrico (NO).	11
Figura 3. Mecanismo de contracción del músculo liso vascular por unión de un agonista del receptor TP.	15
Figura 4. Fotografía representativa del fenotipo mostrado por las ratonas SAMR1 (arriba) y SAMP8 (abajo) a los 10 meses de edad.	40
Figura 5. Diagrama representativo de los diferentes componentes requeridos para llevar a cabo los estudios de reactividad vascular en baño de órganos con aorta de ratón.	46
Figura 6. Curvas de supervivencia de ratonas SAMR1 y SAMP8.	60
Figura 7. Evolución de los valores de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) con la edad en ratonas SAMR1 y SAMP8.	63
Figura 8. Curvas concentración respuesta (A) al KCl (5 - 120 mM) y (B) al U46619 (10^{-9} - 3×10^{-7} M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad.	66
Figura 9. Relajación a la acetilcolina (10^{-6} M) en anillos arteriales de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad.	68
Figura 10. Curvas concentración respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses precontraídos con serotonina (10^{-5} M).	69
Figura 11. (A) Relajación en respuesta al nitroprusiato sódico (3×10^{-9} M) y (B) Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico (10^{-11} - 3×10^{-7} M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad precontraídos con serotonina (10^{-5} M).	70

- Figura 12.** (A) Fotografía representativa del útero de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham), a la extirpación de los ovarios (Ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas tratadas con 17 β -estradiol (OvE) y (B) peso uterino (g), niveles plasmáticos de E2 (pg/mL) y peso corporal (g) de las ratonas de cada grupo de estudio. 74
- Figura 13.** (A) Microfotografías representativas (40X) de la organización estructural de la pared aórtica y (B) Cuantificación del grosor de la aorta abdominal de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham) a la extirpación de los ovarios (Ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas tratadas con 17 β -estradiol (OvE). 76
- Figura 14.** Curvas concentración respuesta (A) al KCl (5 - 120 mM) y (B) al U46619 (10^{-9} - 3×10^{-7} M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham), a la extirpación de los ovarios (ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas y tratadas con 17 β -estradiol (OvE). 79
- Figura 15.** Curvas concentración respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) de anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham), a la extirpación de los ovarios (Ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas y tratadas con 17 β -estradiol (OvE). 81
- Figura 16.** (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (Δ ABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de L-NAME (10^{-4} M). 84
- Figura 17.** (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (Δ ABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de indometacina (10^{-5} M). 86

- Figura 18.** (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de L-NAME (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M). 88
- Figura 19A.** Imágenes representativas de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) en ausencia (Control) y presencia de U46619 (10^{-8} M). 90
- Figura 19B.** Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) en ausencia (Control) y presencia de U46619 (10^{-8} M). 91
- Figura 20A.** Imágenes representativas (400X) de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de tempol (10^{-3} M). 94
- Figura 20B.** Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de tempol (10^{-3} M). 95
- Figura 21A.** Imágenes representativas (400X) de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de GR32191B (10^{-7} M). 96

- Figura 21B.** Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de GR32191B (10^{-7} M). 97
- Figura 22A.** Imágenes representativas (400X) de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de apocinina (3×10^{-3} M). 98
- Figura 22B.** Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de apocinina (3×10^{-3} M). 99
- Figura 23A.** Imágenes representativas (400X) de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de indometacina (10^{-5} M). 100
- Figura 23B.** Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de indometacina (10^{-5} M). 101
- Figura 24.** (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de SC560 (10^{-7} M). 104

- Figura 25.** (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de SC560 (10^{-7} M) y L-NAME (10^{-4} M). 105
- Figura 26.** (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de celecoxib (10^{-5} M). 108
- Figura 27.** (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de L-NAME (10^{-4} M) más celecoxib (10^{-5} M). 109
- Figura 28A.** Imágenes representativas (400X) de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia del inhibidor específico de la COX-1, SC560 (10^{-7} M). 112
- Figura 28B.** Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia del inhibidor específico de la COX-1, SC560 (10^{-7} M). 113
- Figura 29A.** Imágenes representativas (400X) de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia del inhibidor específico de la COX-2, celecoxib (10^{-5} M). 114

- Figura 29B.** Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia del inhibidor específico de la COX-2, celecoxib (10^{-5} M). 115
- Figura 30A.** Imágenes representativas (400X) de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de SC560 (10^{-7} M) más celecoxib (10^{-5} M). 116
- Figura 30B.** Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de SC560 (10^{-7} M) más celecoxib (10^{-5} M). 117
- Figura 31.** Expresión de eNOS en aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE). 119
- Figura 32.** Expresión de COX-1 en aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE). 120
- Figura 33.** Expresión de COX-2 en aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE). 121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros morfológicos y bioquímicos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad.	61
Tabla 2. Valores de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) en ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3 a 10 meses de edad.	63
Tabla 3. Valores de pD_2 y efecto máximo (E_{max}) en respuesta al KCl (5 - 120 mM) y U46619 (10^{-9} - 3×10^{-7} M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad.	65
Tabla 4. Valores de pD_2 y contracción máxima (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad.	69
Tabla 5. Parámetros bioquímicos analizados en plasma de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham, control) a la extirpación de los ovarios (Ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas tratadas con 17β -estradiol (OvE).	73
Tabla 6. Valores de pD_2 y contracción máxima (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta al KCl (5 - 120 mM) y al U46619 (10^{-9} - 3×10^{-7} M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham, control), a la extirpación de los ovarios (ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas y tratadas con 17β -estradiol (OvE).	78

- Tabla 7.** Valores de pD_2 y relajación máxima (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham), a la extirpación de los ovarios (ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas y tratadas con 17β -estradiol (OvE). 81
- Tabla 8.** Valores de pD_2 y contracción máxima (E_{max}) al U46619 en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx, y OvE), en ausencia (Control) y en presencia de L-NAME (10^{-4} M), indometacina (10^{-5} M) o L-NAME más indometacina. 83
- Tabla 9.** Valores de pD_2 y contracción máxima (E_{max}) al U46619 en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx, y OvE), en ausencia (Control) y en presencia de L-NAME (10^{-4} M), SC560 (10^{-7} M) o L-NAME más SC560. 103
- Tabla 10.** Valores de pD_2 y contracción máxima (E_{max}) al U46619 en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx, y OvE), en ausencia (Control) y en presencia de L-NAME (10^{-4} M), celecoxib (10^{-5} M) o L-NAME más celecoxib. 107

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ABC	Área bajo la curva
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ADP	Adenina dinucleótido
ANOVA	Análisis de la varianza
ATP	Adenina trinucleótido
ATPasa	Adenina trifosfatasa
BH₃	Trihidrobiopterina
BH₄	Tetrahidrobiopterina
Ca²⁺	Ion calcio
Cav1.2	Canal de Ca ²⁺ voltaje dependiente-1,2
cGMP	Guanina monofosfato cíclica
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DAG	Diacilglicerol
DDAH	Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa
DHE	Dihidroetidio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
E2	17β-estradiol

EC₅₀	Concentración efectiva 50
ELITE	Early versus Late Intervention Trial with Estradiol
E_{max}	Contracción máxima
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EDCF	Factor contráctil dependiente de endotelio
EDHF	Factor hiperpolarizante dependiente de endotelio
EDRF	Factor relajante derivado de endotelio
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
ER	Receptor de estrógenos
ERα	Receptor de estrógenos alfa
ERβ	Receptor de estrógenos beta
ERE	Elemento de unión a receptor de estrógenos
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FMN	Flavina mononucleótido
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GP_{ER}	Receptor de estrógenos acoplado a proteína G
GTP	Guanina trifosfato
HE	Hidroetidina
HERS	Heart and Estrogen/progestin Replacement Study
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP₃	Inositol trifosfato
KCl	Cloruro potásico
KEEPS	Kronos Early Estrogen Prevention Study

MLC	Cadena ligera de miosina
MLCK	Quinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NAPDH oxidasa
O₂⁻	Anión superóxido
OvE	Ovariectomía y tratamiento con E2
Ovx	Ovariectomía
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaciclina
PKG	Proteína quinasa G
PLA₂	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
qPCR	PCR cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno

SAM	Ratonas con senescencia acelerada
SAMP	Cepa de ratonas propensas a la senescencia acelerada
SAMR	Cepa de ratonas resistentes a la senescencia acelerada
SERCA	Bomba de Ca ²⁺ del retículo endoplasmático/sarcoplásmico
sGC	Guanilato ciclasa soluble
THR	Terapia hormonal de reemplazo
TP	Receptor de tromboxano
TXA₂	Tromboxano A ₂
TXB₂	Tromboxano B ₂
U46619	Análogo estable del TXA ₂
U.A.	Unidades arbitrarias
WHI	Women Health Initiative

RESUMEN

El aumento de la esperanza de vida de la población ha favorecido el desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento, entre ellas aquellas que afectan al sistema cardiovascular. Uno de los principales procesos que conducen al desarrollo de patologías cardiovasculares como la hipertensión o la aterosclerosis es la alteración de la función normal del endotelio.

El endotelio juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Entre sus múltiples funciones se encuentra regular el tono vascular a través de la liberación de sustancias vasoactivas. Entre ellas, destaca el óxido nítrico (NO) como la principal molécula vasodilatadora que favorece la relajación del músculo liso vascular. Otras moléculas vasoactivas derivan del metabolismo del ácido araquidónico a través de la ruta de la ciclooxigenasa (COX) 1 y 2, como la prostaciclina (PGI₂) y el tromboxano A₂ (TXA₂) que generan vasodilatación y vasoconstricción, respectivamente.

La disfunción endotelial asociada al envejecimiento se caracteriza por una mayor presencia de sustancias vasoconstrictoras, especialmente aquellas derivadas de las COX. Además, el aumento de la contracción vascular está favorecido por una menor biodisponibilidad de NO, debido a alteraciones en su síntesis y/o a su inactivación por un aumento de moléculas oxidativas, como el anión superóxido (O₂⁻). A nivel vascular, existen diferentes fuentes de O₂⁻, entre las que destaca la NADPH oxidasa. Las COX también han sido descritas como una fuente importante de O₂⁻ vascular, especialmente en hipertensión.

El hecho de que las mujeres muestren un incremento del riesgo cardiovascular después de la menopausia, se ha relacionado con un posible papel protector de los estrógenos sobre la función vascular mediante una mayor liberación de sustancias vasodilatadoras de origen endotelial como la PGI₂ y el NO. Esta hipótesis se puso en entredicho con la aparición de resultados contradictorios de estudios observacionales en mujeres postmenopáusicas, entre ellos el estudio WHI (*Women Health Initiative*) y el

HERS (*Heart and Estrogen/progestin Replacement Study*), en los que el tratamiento con estrógenos no disminuía la incidencia de patologías cardiovasculares. Recientemente, un nuevo análisis de los resultados de estos estudios junto al desarrollo de otros como el estudio KEEPS (*Kronos Early Estrogen Prevention Study*) y ELITE (*Early versus Late Intervention Trial with Estradiol*) han proporcionado una perspectiva más positiva en cuanto al uso de estrógenos como terapia sustitutiva y su beneficio cardiovascular. Estos resultados han confirmado la importancia del momento en el que se inicia la terapia hormonal sustitutiva después de la menopausia para mantener sus efectos beneficiosos a nivel cardiovascular, dando lugar a la hipótesis temporal.

Tanto el envejecimiento como la pérdida de los estrógenos que ocurre en la menopausia están asociados a una menor biodisponibilidad del NO, a un aumento de los niveles de O_2^- vascular y a un incremento de sustancias contráctiles, entre ellas el TXA_2 . Pero queda por determinar si los efectos deletéreos vasculares inducidos por el TXA_2 durante el envejecimiento están mediados por un aumento en la producción de O_2^- y una disminución en la biodisponibilidad de NO y si están modulados por estrógenos.

Para ello, en este estudio se ha validado un modelo de envejecimiento vascular en ratonas con senescencia acelerada (SAM), con ratonas de la cepa SAMP8 que presentan predisposición a la senescencia acelerada y ratonas SAMR1, que presentan resistencia al desarrollo de una senescencia acelerada y que muestran un envejecimiento biológico normal y serán utilizadas como controles. Se ha realizado el estudio de longevidad, así como el seguimiento de la presión arterial y la determinación de características morfológicas y bioquímicas. Además, se ha estudiado la respuesta vascular en aorta al KCl (5-120 mM), al U46619 (10^{-9} - 3×10^{-5} M) y a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) a los 3, 6 y 10 meses de edad en ambas cepas, observándose una disfunción endotelial que aparece antes en las ratonas SAMP8 que en las ratonas SAMR1. Los resultados confirmaron que las ratonas SAM son un buen modelo para el estudio del envejecimiento vascular.

Para el estudio del envejecimiento vascular y la falta de estrógenos, ambas características de la menopausia, se llevó a cabo la ovariectomía (Ovx) en ratonas SAMR1 y SAMP8 de 5 meses de edad, y se analizó el papel de los estrógenos mediante el tratamiento durante 28 días con 17β -estradiol de ratonas SAM ovariectomizadas (OvE). Ratonas Sham control fueron también utilizadas en el estudio. Se realizaron estudios bioquímicos y morfológicos que validaron la eficacia de la cirugía. También se realizaron curvas concentración-respuesta al KCl, al U46619 y a la acetilcolina en anillos aórticos de ratonas Sham, Ovx y OvE de ambas cepas de ratonas. En ratonas senescentes SAMP8, se observó que la ovariectomía disminuyó la biodisponibilidad de NO en ambas cepas de ratonas, efecto que se restablecía con el tratamiento con 17β -estradiol. El tratamiento con indometacina reveló el mecanismo por el cual el envejecimiento y la falta de estrógenos modificaban la respuesta contráctil en respuesta al U46619 a través de la modulación de prostanoideos contráctiles y la generación de O_2^- dependientes de la COX.

La participación de las isoformas de la COX se determinó mediante el uso de un inhibidor específico de la COX-1 (SC560, 10^{-7} M) y de un inhibidor específico de la COX-2 (celecoxib, 10^{-5} M). Los resultados indican la implicación de la COX-1 en la disminución de la biodisponibilidad del NO y el incremento de O_2^- en ausencia de estrógenos en ambas cepas. La COX-2 participa en la contracción al TXA_2 a través de la producción de sustancias vasoconstrictoras, que se encuentran aumentadas en SAMP8 y potenciadas con la falta de estrógenos. Además, la ovariectomía induce la producción de O_2^- derivado de COX-2 en ratonas SAMR1 y SAMP8.

En conjunto, los resultados muestran una mayor participación del TXA_2 en la disminución de la biodisponibilidad de NO endotelial con el envejecimiento que se potencia por la falta de estrógenos y señalan a los receptores del TXA_2 como una posible diana terapéutica para la mejora de la función vascular en mujeres postmenopáusicas.

ABSTRACT

The increased life expectancy of the population has favored the development of diseases associated with ageing, including those that affect the cardiovascular system. One of the main processes that lead to the development of cardiovascular pathologies such as hypertension or atherosclerosis is the alteration of the correct endothelial function.

The endothelium plays a crucial role in the maintenance of vascular homeostasis, including the regulation of vascular tone through the release of vasoactive substances. Among them, the nitric oxide (NO) is the main vasodilator molecule that favors the relaxation of the vascular smooth muscle. Other vasoactive molecules such as prostacyclin (PGI₂) and thromboxane A₂ (TXA₂) are derived from the arachidonic metabolism through cyclooxygenase (COX) pathway, and trigger vasodilation and vasoconstriction, respectively.

Ageing-associated endothelial dysfunction is characterized by a more significant presence of vasoconstrictor substances, especially those derived from COX. Besides, the increase in vascular contraction is favored by a lower NO bioavailability due to alterations in its synthesis and its inactivation by an increase in oxidative molecules, such as superoxide anion (O₂⁻). At the vascular level, NADPH oxidase is one of the main sources of O₂⁻ production. In addition, COX has also been described as an important source of vascular O₂⁻, especially in hypertension.

The increased cardiovascular risk after menopause in women has been related to a protective role of estrogen on vascular function by the release of vasodilator substances of endothelial origin, such as PGI₂ and NO. This hypothesis was questioned when contradictory results from observational studies in postmenopausal women appeared. Among them, the WHI (Women Health Initiative) and the HERS (Heart and Estrogen / Progestin Replacement Study) studies suggested that estrogen treatment does not decrease the incidence of cardiovascular pathologies. Recently, a new analysis of the results

of these studies along with the development of others such as the KEEPS (Kronos Early Estrogen Prevention Study) and ELITE (Early versus Late Intervention Trial with Estradiol) studies have provided a more positive perspective regarding the use of estrogen as a substitutive therapy and its cardiovascular benefit. These results have confirmed the importance of the moment in which hormone replacement therapy is started after menopause to maintain its beneficial effects at the cardiovascular level, giving rise to the timing hypothesis.

Both ageing and the loss of estrogen that occur during menopause are associated with a lower NO bioavailability, an increase in vascular O_2^- levels, and an increase in contractile substances, including TXA_2 . However, it remains to be determined if the vascular deleterious effects of TXA_2 during ageing are mediated by an increase in O_2^- production and a decrease in NO bioavailability and if these effects are modulated by estrogen.

For this purpose, we have validated a vascular ageing model using accelerated senescence mice (SAM), which includes the SAMP8 strain that has predisposition to the accelerated senescence, and SAMR1 strain which exhibit resistance to the development of an accelerated senescence, and have been used as control. Longevity study, blood pressure monitoring, and morphological and biochemical determinations have carried out.

Moreover, the aortic vascular response to KCl (5 - 120 mM), U46619 (10^{-9} - 3×10^{-5} M) and acetylcholine (10^{-9} - 10^{-5} M) has been studied at 3-, 6- and 10-month-old female mice of both strains. The results indicated that endothelial dysfunction occurs earlier in SAMP8 than SAMR1 mice. The results confirmed that the SAM mice are a good model for the study of vascular ageing.

For the study of vascular ageing and lack of estrogen, both characteristics of the menopause, ovariectomy (Ovx) was performed to 5-month-old SAMR1 and SAMP8 mice and the role of estrogens was analyzed by treating ovariectomized SAM with 17β -estradiol (OvE) during 28 days. Sham-operated female mice were also included. Biochemical and morphological

studies were carried out in order to validate the efficacy of the surgery. Concentration-response curves to KCl, U46619, and acetylcholine were performed in aortic rings of Sham, Ovx and OvE mice. Ovariectomy decreased the NO bioavailability in both strains of mice, an effect that was reestablished with 17 β -estradiol treatment. Indomethacin treatment (10^{-5} M) revealed that ageing and lack of estrogen modify the contractile response to U46619 through the modulation of contractile prostanoids and COX-derived O₂⁻.

The participation of COX isoform was analyzed by using the specific inhibitor of COX-1 (SC560, 10^{-7} M) and the specific inhibitor of COX-2 (celecoxib, 10^{-5} M). The results indicated the involvement of COX-1 in the decrease of NO bioavailability and increase of O₂⁻ in the absence of estrogens in both strains. COX-2 participates in the contraction to TXA₂ through the production of vasoconstrictive substances that are increased in SAMP8 mice and further enhanced by ovariectomy. Moreover, ovariectomy induces a COX-2-dependent O₂⁻ production in SAMR1 and SAMP8 mice.

Overall, the results show a greater TXA₂ participation in the decrease of the endothelial NO bioavailability with ageing that is enhanced by the lack of estrogen, and suggests TXA₂ receptors as a possible therapeutic target for the improvement of vascular function in postmenopausal women.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENVEJECIMIENTO Y RIESGO CARDIOVASCULAR

La mejora de las condiciones de vida ha favorecido el incremento de la esperanza de vida de la población. La Organización Mundial de la Salud estima que en Europa se triplicará la población que alcance edades próximas a los 85 años para el año 2050, pasando de aproximadamente 14 millones registrados en 2010 a 40 millones en 2050 (WHO, 2017). Este incremento de la esperanza de vida está favoreciendo una mayor incidencia de enfermedades asociadas con el envejecimiento, entendido como un proceso fisiológico desencadenado por modificaciones moleculares a nivel celular que ocurren con el tiempo y que conducen a alteraciones estructurales y funcionales en los diferentes tejidos de un organismo vivo (López-Otín y cols., 2013).

El envejecimiento, junto a la herencia genética y el sexo, constituyen factores de riesgo no modificables para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (O'Donnell y Elosua, 2008; D'Agostino y cols., 2013). Estas enfermedades agrupan trastornos que afectan a la función del corazón y de los vasos sanguíneos, entre las que destacan la hipertensión arterial, la enfermedad coronaria, la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad vascular periférica, y representan una de las principales causas de muerte en los países desarrollados (WHO, 2017). En España, las enfermedades cardiovasculares causan un 29,2% de las muertes registradas en 2015, situándolas como la principal causa de muerte por encima del cáncer o las enfermedades respiratorias (INE, 2017).

Con el envejecimiento se produce un incremento del riesgo cardiovascular relacionado con alteraciones que se asocian a cambios vasculares estructurales y funcionales, y afectan a las propiedades elásticas de los vasos y a la regulación del tono vascular (Lakatta y Levy, 2003; El Assar y cols., 2013; Lakatta, 2015). La elasticidad es una propiedad estructural de la pared arterial esencial para el mantenimiento de un flujo sanguíneo contante. Una de las principales causas de la pérdida de elasticidad es el incremento en la proporción de fibras de colágeno que favorece la rigidez de la pared vascular y posibles roturas vasculares. La desorganización de las fibras de colágeno contribuye a la

proliferación de células de músculo liso causando una hipertrofia de la pared vascular. Por ello, la pérdida de elasticidad asociada a la edad también se relaciona con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como hipertensión, arteriosclerosis o enfermedad coronaria (O'Rourke y Hashimoto, 2007).

A nivel funcional, el envejecimiento altera la producción de sustancias vasoactivas de origen endotelial y predispone a procesos de inflamación, de vasoconstricción, de incremento de la permeabilidad vascular, de agregación plaquetaria y de trombosis, favoreciendo el desarrollo de patologías cardiovasculares (Lakatta y Levy, 2003; Aird, 2008; Viridis y cols., 2010). Este proceso se conoce como disfunción endotelial y se considera un buen predictor de enfermedad cardiovascular por estar asociado al inicio de procesos fisiopatológicos como aterosclerosis (George y cols., 2012), hipertensión (Harvey y cols., 2015) y síndromes inflamatorios (Rodríguez-Mañas y cols., 2009; Wang y cols., 2014).

1.2. ENDOTELIO Y FUNCIÓN VASCULAR

En 1856, el embriólogo Wilhelm Hirsch acuñó con el nombre “endotelio” a la capa celular que recubría el interior de diferentes cavidades corporales, entre ellas el lumen vascular. Posteriormente, esta definición se restringió a la capa celular que recubre los vasos sanguíneos y linfáticos (Laubichler y cols., 2007).

El endotelio vascular consiste en una monocapa de células planas, de aproximadamente $0,5 \mu\text{m}$ de grosor, que presentan una orientación lineal y paralela al flujo sanguíneo y se encuentran adheridas a una matriz extracelular de origen proteico, con abundantes glucoproteínas y proteoglicanos, conocida como membrana basal (Pries y cols., 2000; Tarbell y Pahakis, 2006). Ambas estructuras forman parte de la capa interna de los vasos o túnica íntima que descansa sobre la capa media de la pared vascular, compuesta mayoritariamente por células musculares lisas dispuestas de forma concéntrica y cuyo grosor varía a lo largo del sistema vascular (Niu y cols., 2016).

Se estima que la superficie del endotelio humano adulto es próxima a los 300 m² (Augustin y cols., 1994). Su localización luminal le permite una participación directa en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos como la permeabilidad vascular, el mantenimiento de la hemostasia y coagulación de la sangre, el control del tono vascular, la participación en la respuesta inflamatoria y en la formación de nuevas redes vasculares (Flammer y Luscher, 2010; Eckers y Haendeler, 2015). Cada una de estas funciones es posible gracias a la acción paracrina, autocrina y endocrina de las células endoteliales, que responden a estímulos físicos, químicos y hormonales que tienen lugar en el interior del vaso y liberan metabolitos implicados en diversos procesos vasoactivos (Aird, 2004; Brunner y cols., 2005). Esto remarca la importancia del endotelio vascular en el mantenimiento de un equilibrio entre moléculas vasoactivas con propiedades vasodilatadoras y vasoconstrictoras, prooxidantes y antioxidantes, procoagulantes y anticoagulantes, proinflamatorias y antiinflamatorias, entre otras (Seals y cols., 2011).

En condiciones basales, el músculo liso de los vasos sanguíneos presenta un ligero estado de contracción que permite regular el flujo y su distribución hacia los tejidos, facilitando el posterior retorno al corazón. Este estado de contracción basal, o tono vascular, está sujeto a la acción de neurotransmisores liberados por neuronas que inervan los vasos sanguíneos, de factores hormonales y de agentes vasoactivos liberados por diferentes tipos celulares, entre ellos las células endoteliales (Vanhoutte y cols., 2017). En el caso de los factores endoteliales, su liberación puede ser inducida por factores mecánicos debidos a cambios en el flujo sanguíneo y por factores bioquímicos, a través de la activación de receptores específicos de membrana. Una vez liberados, los factores endoteliales pueden inducir contracción o relajación del músculo liso vascular a través de receptores específicos asociados a proteínas G. Dependiendo de la ruta que se active, se producen modificaciones en los niveles de Ca²⁺ intracelular y en proteínas específicas implicadas en el mecanismo de contracción afectando a su actividad (Webb, 2003).

Entre los factores endoteliales implicados en la regulación del tono vascular están los factores relajantes derivados del endotelio (EDRF), que agrupan moléculas implicadas en la respuesta vasodilatadora como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), entre otros. Por otro lado, los factores contráctiles derivados del endotelio (EDCF) están implicados en la respuesta vasoconstrictora y destacan el tromboxano A₂ (TXA₂), la angiotensina II, la endotelina-1 y los aniones superóxido (O₂⁻) (Viridis y cols., 2010; Rajendran y cols., 2013).

El endotelio puede responder de forma distinta a un mismo estímulo dependiendo del lecho vascular debido a diferencias en el patrón de expresión génica y adquiere funciones especializadas y una plasticidad adaptativa ante cambios en el ambiente vascular (Aird, 2004, 2012; Galley y Webster, 2004). Por ejemplo, en las células endoteliales de origen arterial hay una mayor producción de factores vasodilatadores, especialmente de NO, mientras que en células endoteliales de vena existe una mayor expresión de moléculas de adhesión como las selectinas P y E, y la molécula de adhesión intercelular-1 (Aird, 2007a). Otro ejemplo es la variación en la regulación del tono vascular a lo largo del árbol arterial. Mientras que el NO es el principal factor vasodilatador en arterias de gran calibre como la aorta, en arterias de menor calibre y de resistencia, como las coronarias o mesentéricas respectivamente, el principal factor implicado en la relajación es el EDHF (Villar y cols., 2006; Aird, 2007b).

1.2.1. ÓXIDO NÍTRICO Y RELAJACIÓN VASCULAR

El NO fue descrito como EDRF en la década los años 80, cuando Furchgott y colaboradores describieron la existencia de un factor relajante de origen endotelial liberado en respuesta a diferentes estímulos vasodilatadores (Furchgott y Zawadzki, 1980; Furchgott y cols., 1984). Posteriormente, Moncada y cols. e Ignarro y cols. demostraron de manera independiente que el EDRF al que hacía referencia Furchgott era el NO (Ignarro y cols., 1987; Palmer y cols., 1987; Furchgott, 1988). El NO, además, participa en otros mecanismos vasculares generalmente asociados a funciones vasoprotectoras: actúa como antiagregante

plaquetario, como inhibidor de la proliferación del músculo liso vascular e inhibidor de la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular y como agente antioxidante (Badimon y Martínez-González, 2002; Vanhoutte y cols., 2017).

El NO es un metabolito resultante de la oxidación del aminoácido L-arginina (L-Arg) por el enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Palmer y cols., 1988; Schmidt y cols., 1988; Moncada y cols., 1989; Moncada y Higgs, 1993). Se conocen tres isoformas de la NOS: la neuronal (nNOS o NOS-1), la inducible (iNOS o NOS-2) y la endotelial (eNOS o NOS-3). Todas ellas se pueden expresar a nivel vascular, aunque la eNOS es la isoforma constitutiva a nivel endotelial y participa directamente en la relajación vascular (Andrew y Mayer, 1999; Alderton y cols., 2001; Zhang y cols., 2011).

Las tres isoformas de la NOS son homodímeros estructurales que presentan un dominio reductasa C-terminal y un dominio oxigenasa N-terminal (Figura 1). En la forma funcional de la NOS, el dominio oxidante de un monómero interacciona con el dominio reductor del otro monómero. Esta estructura dimérica interconectada permite un flujo de electrones a través de los diferentes cofactores que forman parte de su estructura, entre los que se encuentran como grupos prostéticos el grupo hemo (o anillo protoporfirina IX), la tetrahidrobiopterina (BH₄) y los nucleótidos de flavina (flavina mononucleótido [FMN] y flavina adenina dinucleótido [FAD]). La actividad catalítica del enzima requiere de sustratos, L-Arg y oxígeno molecular (O₂), así como de dos cofactores esenciales, la calmodulina y nicotina adenina dinucleótido fosfato (NADP) (Figura 1). Mientras que la actividad de la nNOS y la eNOS requiere de la unión previa de la calmodulina con Ca²⁺, la actividad de la iNOS es independiente de Ca²⁺, pudiendo activarse con la unión exclusiva a la calmodulina debido a su gran afinidad por ella (Sessa, 2004; Zhao y cols., 2015).

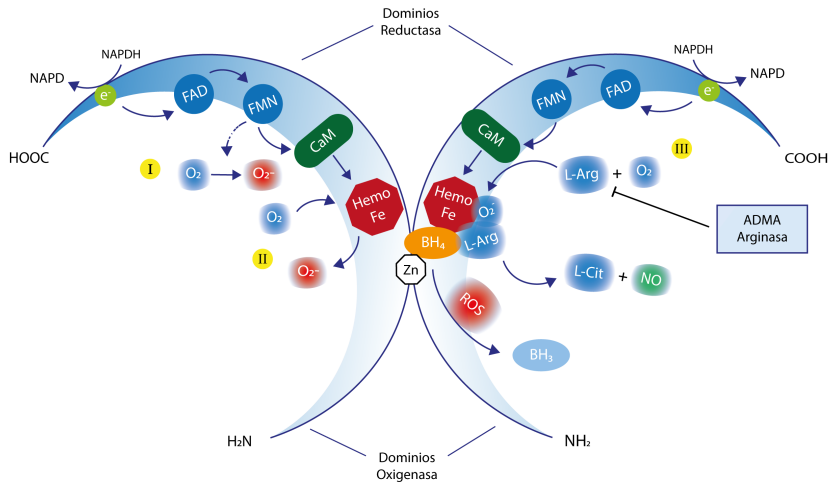


Figura 1. Homodímero de la óxido nítrico sintasa (NOS). (I) Como monómero, la NOS produce O_2^- además de NO; (II) como homodímero, puede producirse una producción de O_2^- cuando los niveles de L-arginina (L-Arg) son bajos y no saturan la actividad de la enzima; (III), cuando los niveles de L-Arg y tetrahidrobiopterina (BH_4) son normales, se unen a la NOS acoplada permitiendo el flujo de electrones desde la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ($NADP^+/NADPH$) pasen a través de la flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN), calmodulina (CaM) y al anillo de protoporfirina IX (grupo hemo) y será utilizado para la producción de NO. La BH_4 es esencial para el acoplamiento de la NOS, ya que en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). La BH_4 se oxida a BH_3 , desacoplado la NOS y bloqueando la producción de NO. La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor competitivo endógeno de la NOS, y la enzima arginasa, disminuyen la unión de la L-Arg a la NOS, disminuyendo la producción de NO. Imagen modificada de (Zhao y cols., 2015).

La eNOS es la isoforma predominante del endotelio, aunque no exclusiva; en humanos también está presente en otros tipos celulares como cardiomiocitos, leucocitos, células epiteliales y en algunas neuronas y células endocrinas (Li y cols., 2002). A nivel celular, la eNOS se localiza principalmente en pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática denominadas caveolas. Dentro de las caveolas, se encuentra asociada a la proteína caveolina-1 que mantiene retenida a la eNOS y controla su actividad. En respuesta a diferentes estímulos endógenos y exógenos, la caveolina-1 libera la eNOS facilitando su activación (Forstermann y Munzel, 2006; Rath y cols., 2009; Rafikov y cols., 2011). En condiciones normales, gran parte del NO liberado en un vaso sanguíneo es producido por la actividad constitutiva de la eNOS. Existe una gran variedad de agonistas de la actividad de la eNOS que inducen un incremento en la producción de NO por las células endoteliales, como la acetilcolina, la histamina, la serotonina, la trombina, el ADP, la bradicinina, la norepinefrina y el 17 β -estradiol (E2), entre otros. Pero también existe un mecanismo independiente de receptor considerado como el principal inductor de la síntesis y liberación basal de NO a nivel endotelial, que es el estrés hemodinámico causado por el flujo sanguíneo sobre el endotelio (Zhao y cols., 2015; Vanhoutte y cols., 2017).

Tanto la activación de receptores específicos por agonistas como la acción del flujo sanguíneo sobre la membrana endotelial, produce un incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelular que inducirá la activación de la eNOS y la síntesis de NO. La entrada de Ca²⁺ al citoplasma se produce a través de canales de Ca²⁺ en la membrana celular y desde depósitos intracelulares como el retículo endoplasmático. El incremento de la concentración intracelular de Ca²⁺ favorece su unión a la calmodulina citoplasmática, formando el complejo Ca²⁺-calmodulina. Este complejo interacciona con la eNOS e induce un cambio conformacional en su estructura que facilita un mayor flujo de electrones e incrementa la producción de NO (Figura 1). Además, existe un mecanismo de activación de la eNOS mediante modificaciones postraduccionales, especialmente por fosforilación/defosforilación de aminoácidos concretos por quinasas y fosfatasas activadas en respuesta a diferentes estímulos (Zhao y cols., 2015).

En las células musculares lisas, el aumento de los niveles de Ca^{2+} induce la activación del mecanismo de contracción a través de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) a través de una quinasa específica, la quinasa de la MLC (MLCK). Cuando el NO es liberado por el endotelio, éste difunde hacia el interior de las células del músculo liso induciendo la activación del mecanismo de relajación del mismo mediante su unión a la proteína guanilato ciclasa soluble (sGC). Este enzima cataliza la conversión de guanosina 5-trifosfato (GTP) en guanosina monofosfato cíclica (cGMP). El aumento de los niveles de cGMP activa la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG), que disminuye la concentración de Ca^{2+} citosólico disminuyendo la activación de la MLCK y con ello la fosforilación de la MLC, facilitando la relajación de la célula muscular (Figura 2) (Zhao y cols., 2015; Kraehling y Sessa, 2017). Además, la PKG también induce la eliminación de Ca^{2+} citosólico al activar la bomba de Ca^{2+} dependientes de ATP situada en la membrana del retículo sarcoplásmico (Gao, 2010; Zhao y cols., 2015). A su vez, la PKG induce la activación de una fosfatasa que elimina los grupos fosfato de la MLC, contribuyendo también a la relajación de la célula muscular (Figura 2). Por ello, el mecanismo activado por la ruta sGC-cGMP-PKG permite reducir los niveles de Ca^{2+} citosólico causando la relajación de la célula del músculo liso vascular (Zhao y cols., 2015).

En conjunto, un descenso en los niveles de NO favorece la pérdida del control del tono vascular a favor de un incremento del mecanismo de contracción como ocurre en diferentes patologías cardiovasculares (Yang y cols., 2004; George y cols., 2012; Vanhoutte y cols., 2017) o durante el envejecimiento (Matz y cols., 2000; Matz y Andriantsitohaina, 2003; S. Novella y cols., 2013).

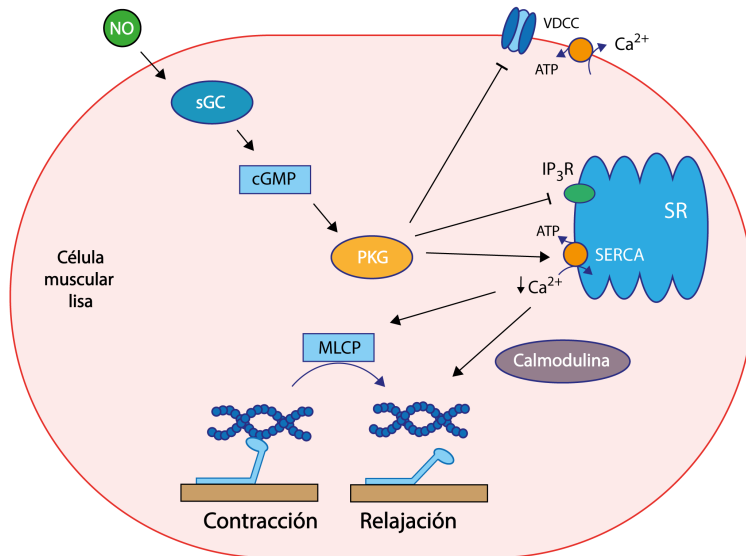


Figura 2. Regulación del tono vascular por el óxido nítrico (NO). NO regula el tono vascular principalmente mediante la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) en las células de músculo liso vascular induciendo la formación de guanilato monofosfato cíclico (cGMP). El cGMP activa la proteína quinasa G (PKG), la cual previene la entrada de Ca²⁺ extracelular por canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (VDCC) y la liberación de Ca²⁺ liberado por el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R). La PKG también participa en la eliminación de Ca²⁺ intracelular hacia el interior del retículo sarcoplásmico mediante la activación de bombas de Ca²⁺-ATPasa SERCA (del inglés, sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase). La disminución de la concentración de Ca²⁺ intracelular causa la inactivación de la calmodulina y la consiguiente inactivación de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). Esta depleción de Ca²⁺ favorece la activación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP), conduciendo a la rotura de los puentes entre actina y miosina favoreciendo la relajación del músculo liso vascular (Zhao y cols., 2015).

1.2.2. TROMBOXANO A₂ Y CONTRACCIÓN VASCULAR

Los prostanoïdes son eicosanoides derivados del metabolismo del ácido araquidónico (AA) que participan en la regulación del tono vascular. La concentración intracelular de AA está regulada por la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, concretamente de la fosfatidilserina y fosfatidilinositol, por acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Capper y Marshall, 2001; Balsinde y cols., 2002; Burke y Dennis, 2009; Leslie, 2015). El AA forma prostanoïdes, leucotrienos, lipoxinas, ácidos hidroxieicosatetraenoicos y ácidos epoxieicosatetraenoicos. La gran mayoría de sus metabolitos tienen efecto sobre las funciones endoteliales, entre ellas el mantenimiento de barrera endotelial, la adhesión leucocitaria, la migración endotelial, la proliferación, la viabilidad y la generación de mediadores bioactivos (Bogatcheva y cols., 2005).

Una de las vías de modificación del AA es la ruta de la ciclooxigenasa (COX), que implica un paso de ciclación y otro de incorporación de O₂ y da lugar a la prostaglandina precursora del resto de prostanoïdes, la PGH₂. Además, el AA también puede ser sustrato de la lipooxigenasa que genera leucotrienos implicados principalmente en procesos inflamatorios (Smith y cols., 2000).

Se conocen dos isoformas de la COX, la COX-1 y la COX-2, implicadas en la producción de prostanoïdes y cuya localización subcelular se encuentra en el retículo endoplasmático o en la membrana nuclear (Smith y cols., 2000; Morita, 2002; FitzGerald, 2003). Ambas isoformas se pueden expresar en diferentes tejidos, entre ellos el endotelio (Smith y cols., 2000; Garavito y Mulichak, 2003). La COX-1 se expresa de forma constitutiva en diferentes tejidos corporales, entre ellos el riñón y el tubo gastrointestinal (Crofford, 1997). Su expresión a nivel endotelial es constitutiva, aunque puede verse influida por otros estímulos, como el estrés de flujo (McCormick y cols., 2000; Potter y cols., 2011). La COX-1 está implicada en la producción de prostaglandinas que intervienen en diferentes procesos fisiológicos como la protección del epitelio gástrico, el mantenimiento del flujo intestinal, la agregación plaquetaria, la migración de neutrófilos y la regulación del tono vascular actuando sobre el endotelio y las células musculares

lisas. La expresión de COX-2 está regulada fundamentalmente por estímulos proinflamatorios y es un enzima clave en la producción de la PGI₂ y la PGE₂ (Viridis y cols., 2010; Feletou y cols., 2011). Se ha descrito la existencia de una tercera isoforma de la COX, la COX-3 o COX-1b, procedente de la generación de un transcrito corto de la COX-1 (Hla, 1996; Plant y Laneuville, 1999; Reinauer y cols., 2013). El transcrito de COX-3 se ha detectado en endotelio humano (Plant y Laneuville, 1999) y en otros tejidos corporales como cerebro, corazón, hígado y estómago (Warner y Mitchell, 2002; Cui y cols., 2004; Nurmi y cols., 2005; Qin y cols., 2005). Sin embargo, actualmente existen discrepancias sobre la existencia de una expresión proteica final del transcrito que dé lugar a una nueva variante de la COX (Kam y So, 2009).

Tanto la COX-1 como la COX-2 forman PGH₂ a partir del AA. La PGH₂ puede dar lugar a PGI₂ (a través de la PGI₂ sintasa), PGE₂ (a través de la PGE₂ sintasa), PGD₂ (a partir de la PGD₂ sintasa) y TXA₂ (a través de la tromboxano sintasa) (Samuelsson y cols., 1978; Davidge, 2001; Viridis y cols., 2010). Estos prostanoides activan receptores de membrana específicos presentes en diferentes tipos celulares, entre ellos las células endoteliales y las células del músculo liso vascular (Alfranca y cols., 2006; Feletou y cols., 2011).

A nivel cardiovascular, el TXA₂ participa en el desarrollo de diferentes procesos fisiológicos y patológicos relacionados con agregación plaquetaria, vasoconstricción y proliferación. El TXA₂ puede ser sintetizado por diferentes tipos celulares, debido a que el enzima implicado en la síntesis de TXA₂, la tromboxano sintasa, se encuentra presente en diferentes tejidos, entre ellos el vascular (Sun y cols., 1977). El TXA₂ posee una vida media cercana a los 30 segundos (Hamberg y cols., 1975) y es convertido en su forma inactiva TXB₂ mediante una isomerización no enzimática (Needleman y cols., 1976). El TXA₂ fue descrito por primera vez en 1970, como una sustancia implicada en la contracción vascular (Palmer y cols., 1970). Posteriormente se observó que no sólo tenía efectos a nivel vascular, sino que también inducía la contracción de células musculares lisas de otros tejidos, como bronquios (Devillier y Bessard, 1997), intestino

(Schultheiss y Diener, 1999), útero (Wilhelmsson y cols., 1981) y vejiga urinaria (Palea y cols., 1998).

El TXA₂ lleva a cabo sus acciones a través de la activación de su receptor específico TP. El receptor TP pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR), formado por siete elementos transmembrana con tres lazos extracelulares y tres lazos intracelulares (Ushikubi y cols., 1989; Hirata y cols., 1996). Se expresa en diferentes tejidos, entre ellos el endotelio y el músculo liso vascular, y se puede localizar en la membrana celular, en la envoltura nuclear y en diferentes estructuras intracelulares (Nakahata, 2008). A través del receptor TP, el TXA₂ actúa a nivel local mediante acciones autocrinas en la activación y agregación plaquetaria, y acciones paracrinas sobre células endoteliales y leucocitos (Kobayashi y cols., 2004; Muller y cols., 2015). A nivel vascular, la activación del receptor TP también se ha relacionado con procesos de migración y proliferación celular (Morinelli y cols., 1994; Suzuki y cols., 2004).

La activación del receptor TP por el TXA₂ estimula la activación de dos proteínas G principalmente, la G_{12/13} y la G_q. En el caso de la G_q, su activación conduce a la activación de la PLC, a un incremento de los niveles de IP₃ y de DAG, que conducirá a la liberación de Ca²⁺ procedente del retículo endoplasmático (o sarcoplasmático en el caso de las células musculares lisas) y a la activación de la PKC, respectivamente (Shenker y cols., 1991; Miggin y Kinsella, 1998). Por otro lado, la estimulación de la G_{12/13} activa a la proteína Rho quinasa e induce la fosforilación de la MLC, causando finalmente la contracción de la célula (Figura 3) (Offermanns y cols., 1994; Moers y cols., 2003; Watterson y cols., 2005; Miyosawa y cols., 2006). Así, mientras en el endotelio la activación del receptor TP induce, entre otros mecanismos, un aumento de la permeabilidad endotelial a causa de la reorganización del citoesqueleto de actina-miosina, en el músculo liso causa la contracción vascular (Bauer y cols., 2014).

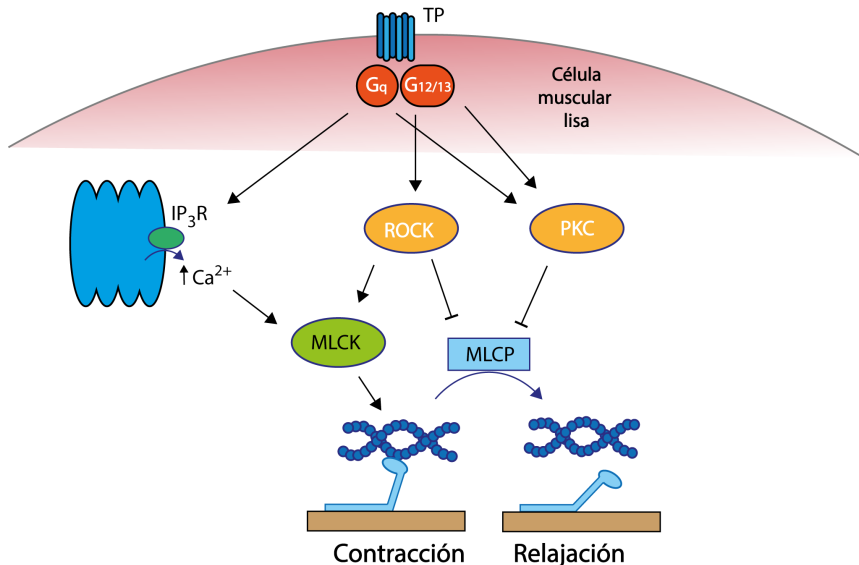


Figura 3. Mecanismo de contracción del músculo liso vascular por unión de un agonista del receptor TP. La activación del receptor TP causa un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular en la célula muscular lisa que causarán la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) y con ello la contracción. La inhibición de la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP). La estimulación del receptor TP va a conducir a la contracción del músculo liso vascular por 2 vías. La primera va a consistir en la activación de la proteína Rho quinasa (ROCK) por acción de la $\text{G}_{12/13}$. La ROCK puede fosforilar directamente la MLC. Por otro lado, la MLCP también puede ser inhibida por la activación de la proteína quinasa C (PKC) a través de G_q y $\text{G}_{12/13}$. El balance entre la actividad de la quinasa de la MLC (MLCK) y la MLCP va a conformar un mecanismo de regulación reversible de fosforilación/desfosforilación que controlará la contracción del músculo liso vascular. Imagen modificada de (Watterson y cols., 2005).

En humanos existen dos isoformas del receptor TP: la isoforma alfa (TP α), la cual también se expresa en roedores, y la isoforma beta (TP β), que presenta una modificación en el extremo C-terminal diferente al TP α . Aunque ambos receptores se expresan en la mayoría de tejidos y células del organismo, suele predominar la isoforma TP α como es el caso de las células endoteliales (Bauer y cols., 2014). El receptor TP también puede activarse por otras prostaglandinas, como la PGH $_2$, PGE $_2$, PGD $_2$, PGF $_{2\alpha}$ y por elevadas concentraciones de PGI $_2$ provocando la despolarización del músculo liso vascular (Feletou y cols., 2011; Liu y cols., 2013). El receptor TP también puede ser activado por isoprostanos, moléculas similares a las prostaglandinas, formados a partir de la peroxidación de ácidos grasos (Bauer y cols., 2014).

Se ha descrito una participación de hormonas sexuales en la regulación de los niveles de TXA $_2$ así como de la actividad del receptor TP (Keung y cols., 2005; del Campo y cols., 2008; Martorell y cols., 2009). Por otra parte, también se ha descrito el papel del receptor TP y del TXA $_2$ en diferentes patologías cardiovasculares, como en hipertensión (Michel, y cols., 2007; Garcia-Redondo y cols., 2015), diabetes (Retailleau y cols., 2010) y en el envejecimiento (de Sotomayor y cols., 2005; Vessieres y cols., 2010; Novella y cols., 2013).

1.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL: INTERACCIÓN COX-NOS

La pérdida de la función endotelial esta asociada al desarrollo de factores de riesgo cardiovascular, entre ellos el envejecimiento. Además, diferentes estudios en animales y humanos han confirmado al envejecimiento como factor independiente en la pérdida de la capacidad vasodilatadora del endotelio (Matz y Andriantsitohaina, 2003; Rodríguez-Mañas y cols., 2009; Angulo y cols., 2012). A medida que se envejece, se suceden modificaciones estructurales y funcionales a nivel vascular que van a influir en el incremento del

riesgo cardiovascular (El Assar y cols., 2012; Camici y cols., 2015; Xu y cols., 2017).

Un endotelio disfuncional muestra una disminución de sus propiedades antitrombóticas y vasodilatadoras, así como un incremento de los niveles de estrés oxidativo y de la producción de citoquinas proinflamatorias que genera un ambiente favorable para el desarrollo de diferentes patologías cardiovasculares tales como trombosis y procesos de aterogénesis (Paneni y cols., 2017; Sepúlveda y cols., 2017).

Uno de los primeros signos de la disfunción endotelial es la pérdida de la capacidad vasorrelajante dependiente de endotelio. Esta pérdida de respuesta es debida principalmente a un desequilibrio en la participación de mediadores vasodilatadores en la regulación del tono vascular y a un aumento de la sensibilidad a factores contráctiles, tales como la angiotensina II (Costa y cols., 2016), el TXA₂ (Matz y cols., 2000; Novella y cols., 2013) o la endotelina-1 (Black y cols., 2003), relacionándose con un incremento de la presión arterial (de Belchior y cols., 2012) y cambios en la reactividad vascular (Matz y Andriantsitohaina, 2003; Novella y cols., 2013a; Novella y cols., 2013b).

Un factor clave en la pérdida de respuesta relajante dependiente de endotelio es el NO. El papel del NO está influido por la actividad de la eNOS y por su biodisponibilidad, entendida como el NO neto resultante del balance entre su síntesis y degradación (Forstermann y Sessa, 2012). En este sentido, el sistema eNOS-NO puede verse afectado por diferentes factores de riesgo cardiovascular, como es el envejecimiento (Vanhoutte y cols., 2016). Su influencia sobre la disfunción endotelial se ha comprobado por diferentes estudios tanto en humanos (Taddei y cols., 1997; Eskurza y cols., 2004; Rodríguez-Mañas y cols., 2009) como en diferentes modelos murinos (Matz y cols., 2000; Matz y Andriantsitohaina, 2003; Novella y cols., 2013).

1.3.1. DISMINUCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE NO

La disfunción endotelial mediada por una disminución en la biodisponibilidad de NO puede deberse a alteraciones que afectan directamente a su síntesis como puede ser: (1) la disminución de la expresión y de la actividad de la eNOS a través de modificaciones postraduccionales (Forstermann y Sessa, 2012; Vanhoutte y cols., 2016); (2) un descenso de la biodisponibilidad del precursor de NO, el L-Arg a causa de un incremento de la actividad arginasa a nivel endotelial (Bode-Boger y cols., 2003; Santhanam y cols., 2008; Kim y cols., 2009; Chandra y cols., 2012); (3) un incremento de los niveles de dimetilarginina asimétrica (ADMA), inhibidor de la eNOS (Hermenegildo y cols., 2002; Bermudez y cols., 2008; Serna y cols., 2013; Lluch, Segarra y Medina, 2015; Segarra y cols., 2016); (4) un descenso de la biodisponibilidad de su cofactor BH₄ (Vasquez-Vivar y cols., 2003; Higashi y cols., 2006).

La disfunción endotelial también se ha relacionado con un incremento del estrés oxidativo generado por un desequilibrio entre la producción y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Versari y cols., 2009; Vanhoutte y cols., 2017). A nivel vascular y en condiciones normales, las ROS participan en la modulación de diferentes mecanismos celulares, entre ellos el tono vascular (Forstermann y cols., 2017; Yang y cols., 2017). En cambio, elevadas concentraciones de ROS alteran el funcionamiento de la pared vascular, favoreciendo procesos de proliferación y apoptosis celular, alterando la composición de la matriz extracelular o induciendo procesos inflamatorios, lo que se relaciona con patologías cardiovasculares (Touyz, 2004; Paravicini y Touyz, 2008). El incremento de ROS a nivel vascular se ha asociado con el envejecimiento y con procesos patológicos como hipertensión, diabetes y aterosclerosis. Las ROS, concretamente del O₂⁻, interaccionan con el NO para generar peroxinitrito, lo que anula su acción vasodilatadora sobre el músculo liso vascular (Taddei y cols., 2001). A su vez, elevados niveles de ROS y de peroxinitrito, afectan la actividad de la eNOS al disminuir la biodisponibilidad

de su cofactor BH_4 , y alterando con ello el transporte de electrones a través de su estructura y desviándolos hacia la oxidación del oxígeno molecular. Este proceso se conoce como “desacoplamiento de la eNOS” y finaliza con la formación de O_2^- en lugar de NO (Forstermann y Munzel, 2006). Por otra parte, niveles elevados de ROS también se han relacionado con un aumento de ADMA a través de una disminución de la actividad del enzima implicado en su catabolismo, la dimetilarginina dimetilamino hidrolasa (DDAH), y de un aumento en la expresión de proteínas metiltransferasas responsables de la transformación de residuos de arginina de las proteínas en ADMA (Landmesser y cols., 2004).

A nivel vascular, una de las principales fuentes de ROS es la NADPH oxidasa (NOX), que se compone de una familia de cinco NOX (NOX-1 a NOX-5) y de dos Dual oxidasas (DUOX-1 y DUOX-2). De ellas, NOX-1, NOX-2, NOX-4 y NOX-5 están presentes en células de la pared vascular del músculo y endotelio (Touyz, 2004; Donato y cols., 2007; Lassègue y Griendling, 2010). La NOX es una de las principales fuentes de O_2^- , y su función se ha relacionado con otros complejos enzimáticos como la cadena respiratoria mitocondrial (Doughan y cols., 2008; Dikalova y cols., 2010; Kroller-Schon y cols., 2014), la xantina oxidasa (McNally y cols., 2003; Landmesser y cols., 2007) y la forma disfuncional de la eNOS desacoplada (Landmesser y cols., 2003). La NOX se encarga del transporte de electrones del citoplasma hacia el interior de orgánulos, utilizando como donador la NADPH y como aceptor final el O_2 (Forstermann y cols., 2017). Para su actividad, la NOX requiere diferentes subunidades reguladoras adicionales como la $\text{p}22^{\text{phox}}$, la $\text{p}47^{\text{phox}}$, la $\text{p}67^{\text{phox}}$ y la $\text{p}40^{\text{phox}}$ así como la proteína G Rac1. La activación de la NOX se produce principalmente por la fosforilación de la subunidad $\text{p}47^{\text{phox}}$ por proteínas G o por cambios intracelulares de la concentración de Ca^{2+} (Drummond y Sobey, 2014).

Mediante el incremento de los niveles de ROS intracelulares, la NOX participa en el desarrollo de diferentes patologías cardiovasculares, como la aterosclerosis o la hipertensión (Ritchie y cols., 2017).

1.3.2. COX Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

A nivel vascular, la disfunción endotelial se asocia con un incremento de factores contráctiles derivados directamente de la actividad de la COX (El Assar y cols., 2012). Estudios en humanos han demostrado la implicación de la COX en la disminución de la respuesta relajante dependiente de endotelio con la edad (Rodríguez-Mañás y cols., 2009). En modelos animales de hipertensión también se ha demostrado una participación de factores contráctiles derivados de COX en la disfunción endotelial (Vanhoutte y cols., 2015). En este sentido, se ha observado una disminución de la biodisponibilidad de NO endotelial en varios lechos vasculares de pacientes con hipertensión esencial (Flammer y cols., 2012). En estos pacientes, el tratamiento con inhibidores no selectivos de la COX permite la normalización de la función endotelial (Taddei y Vanhoutte, 1993) y restaura la biodisponibilidad del NO mediada por ROS (Taddei y cols., 1997). Estos estudios confirman la acción directa de la COX sobre la biodisponibilidad de NO. Actualmente, la COX representa una de las principales vías que actúa como fuente de ROS a nivel endotelial en la hipertensión humana (Virdis y cols., 2013).

A nivel vascular, ambas isoformas de la COX se expresan constitutivamente en células del músculo liso vascular y endoteliales, aunque la COX-1 se expresa habitualmente en mayor medida que la COX-2 (Feletou y cols., 2011). Sin embargo, actualmente se desconoce cuál de las dos isoformas es la que contribuye en mayor medida a la generación de ROS durante el envejecimiento (Matz y cols., 2000).

1.4. ESTRÓGENOS Y FUNCIÓN VASCULAR

Los estrógenos son hormonas esteroideas involucradas en la regulación del desarrollo y función de los órganos reproductores masculinos y femeninos (Carreau y cols., 2012; Cui, Shen y Li, 2013), pero también están implicados en la modulación de diferentes procesos fisiológicos, como el metabolismo lipídico y glucídico, el balance de electrolitos, el sistema nervioso central, la homeostasis ósea, la cognición, el comportamiento y el sistema cardiovascular (Burns y Korach, 2012). Los estrógenos también están implicados en la regulación de los procesos oxidativos que se suceden en el organismo, especialmente a través de la disminución del estrés oxidativo y de la oxidación lipídica, aumentando los niveles y actividad de enzimas antioxidantes (Hermenegildo y cols., 2002; Thibodeau y cols., 2002; Wassmann y cols., 2005).

En términos absolutos, la incidencia de enfermedades cardiovasculares es mayor en mujeres que en hombres, aunque en mujeres éstas se producen a edades más avanzadas (Townsend y cols., 2016). Este aumento del riesgo cardiovascular de la mujer se ha relacionado con el déficit hormonal que se produce después de la menopausia (Bailey Merz y cols., 2006; Shaw y cols., 2006; Go y cols., 2013).

Existe controversia sobre la causa de la evolución creciente del riesgo cardiovascular en mujeres después de la menopausia, especialmente por la falta de coincidencia entre resultados de estudios clínicos y básicos. El foco de atención se centra en el papel de las hormonas sexuales, especialmente de los estrógenos, en el incremento del riesgo cardiovascular. A nivel clínico destacan dos estudios iniciados a principios de la década de los 90 con objeto de evaluar el efecto de la terapia hormonal de reemplazo (THR) en mujeres después de la menopausia: el estudio *Women's Health Initiative* (WHI) (Rossouw y cols., 2002) y el estudio *Heart y Estrogen/progestin Replacement Study* (HERS) (Gambacciani y cols., 2002).

El estudio WHI ha sido el ensayo aleatorizado más extenso diseñado hasta el momento y se incluyeron 161.808 mujeres con edades comprendidas entre los 50 y 79 años. Uno de sus objetivos era analizar el efecto de la THR (estrógenos conjugados equinos o combinada con progestágenos) en la incidencia y evolución de la enfermedad coronaria en mujeres postmenopáusicas. En 2002, los primeros resultados del WHI indicaron un elevado riesgo de desarrollo de cáncer de mama y un ligero aumento del riesgo cardiovascular en las mujeres tratadas con la THR utilizando conjuntamente estrógenos y progestágenos. Además, no se observaron beneficios claros sobre la incidencia de otras patologías como el cáncer de colon o la trombosis venosa (Rossouw y cols., 2002). En 2004, fue cancelada la parte del estudio de THR únicamente con estrógenos, debido al incremento del riesgo de infarto de miocardio observado (Ghazal y Pal, 2013; Gurney y cols., 2014).

Por otro lado, el estudio HERS se centró en determinar el efecto de la THR con estrógenos y progestina sobre la prevalencia de la enfermedad coronaria (Grady y cols., 1998). En dicho estudio, se incorporaron 2.763 mujeres de 44 a 79 años con antecedentes de enfermedad coronaria y se distribuyeron aleatoriamente entre el grupo tratado y el placebo. Los resultados obtenidos indicaron un incremento del riesgo de tromboembolismo venoso además de no modificar el riesgo de enfermedad coronaria durante el primer año de THR. Ello conllevó a no recomendar el tratamiento con THR para la mejora de eventos coronarios en mujeres que ya habían padecido uno. En cambio, a partir de los 3-5 años de tratamiento, la THR parecía mostrar un efecto beneficioso sobre el riesgo de enfermedad coronaria. Esto dio lugar a la aparición del estudio HERS II, una prolongación del estudio inicial que tenía como objetivo hacer un seguimiento de las mujeres que recibieron THR para detectar posibles efectos beneficiosos a largo plazo (Grady y cols., 2002). El estudio HERS II no demostró beneficio de la THR con estrógenos y progestágenos e indicó la existencia de un incremento de riesgo de tromboembolismo venoso y de cáncer de mama. Los resultados obtenidos por los estudios HERS y HERS II, confirmaron los resultados

previos obtenidos por el estudio WHI en cuanto a la THR con estrógenos y progestágenos.

Análisis posteriores de los resultados, especialmente en el estudio WHI, indicaron como posible causa de los resultados obtenidos a la elevada heterogeneidad de edad de las mujeres y el tiempo transcurrido entre el inicio de la menopausia y la THR recibida. Se planteó así la hipótesis temporal (*timing hypothesis*), en la que se postula la existencia de una ventana temporal en la que el efecto beneficioso de la THR supera al riesgo cardiovascular asociado. Así, la THR administrada a mujeres durante la primera década de climaterio reduciría el riesgo cardiovascular mientras que éste aumentaría si se empezaba a administrar transcurridos 10 años desde la menopausia (Manson y cols., 2013; Lacey, 2014; Boardman y cols., 2015; Carrasquilla y cols., 2017). Posteriores análisis de estudios observacionales como el Nurses Health Study han confirmado los beneficios de iniciar con el tratamiento con estrógenos en los cuatro años posteriores al inicio de la menopausia frente a tratamientos más tardíos (Grodstein y cols., 2006). También en el estudio observacional “*Early y Late Intervention Trial with Estradiol*” (ELITE), se determinó que el tratamiento con estrógenos iniciado dentro de los 6 años posteriores a la menopausia estaba asociado a una menor progresión de aterosclerosis (Hodis y cols., 2016). Estos resultados confirman los obtenidos años antes en primates, donde el tratamiento temprano con estrógenos equinos después de inducir una menopausia quirúrgica retrasaba el desarrollo de aterosclerosis (Mikkola y Clarkson, 2002).

1.4.1. ESTRADIOL Y MECANISMO DE ACCIÓN

Durante la etapa fértil de la mujer, la principal síntesis de estrógenos tiene lugar en los ovarios, el cuerpo lúteo y la placenta. En cambio, en etapas no reproductivas, como el periodo previo de la pubertad y el periodo posterior a la menopausia, la síntesis principal de estrógenos tiene lugar en tejidos extragonadales como los riñones, el corazón, el hígado, el tejido adiposo, la piel

y el cerebro (Cui y cols., 2013). A diferencia de los estrógenos sintetizados a nivel ovárico y en las glándulas suprarrenales que son liberados directamente a la circulación, los estrógenos sintetizados en tejidos extragonadales ejercen su función de forma paracrina o autocrina en el lugar de síntesis, manteniendo las funciones específicas de estos tejidos, principalmente por un incremento de la actividad aromatasa, el enzima implicado en la síntesis de estrógenos (Watanabe y cols., 2007; Inoue y cols., 2012).

Existen tres tipos de estrógenos naturales: la estrona, el estriol y el 17 β -estradiol (E2). El E2 es el estrógeno de mayor actividad fisiológica, con características hidrofóbicas que le permite atravesar la membrana celular fácilmente (Baquedano y cols., 2007). Los niveles en sangre de E2 oscilan entre 0,1 - 1 ng/mL según la etapa menstrual de la mujer (Geisler, 2003), descendiendo drásticamente a un valor medio de 35 pg/mL tras la menopausia (Stricker y cols., 2006).

Los efectos del E2 están mediados a través de la activación de receptores de estrógenos (ER) que median una respuesta lenta o “genómica”, que implica la activación de la maquinaria de transcripción para la expresión de genes específicos y una respuesta rápida que implica la activación de diferentes rutas señaladoras (Usselman y cols., 2016).

En la vía lenta o genómica están implicados principalmente dos isoformas del ER denominadas ER clásicos, el ER α y el ER β . Ambos receptores poseen múltiples dominios estructurales, entre los que se incluye un dominio de unión hormonal, que presenta una homología estructural entre isoformas del 56 %, y un dominio de reconocimiento y unión a DNA con una homología del 96 %. Por otra parte, ambas isoformas del ER se encuentran formando homo- y heterodímeros en el citoplasma celular, esperando su activación por el E2. El ER unido al E2 se trasloca al núcleo donde interacciona con regiones específicas de DNA o elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (Edwards, 2005; Cui y cols., 2013). Los ERE son secuencias reguladoras de DNA que dan lugar a la expresión de diferentes proteínas y

factores de transcripción responsables de la acción a largo plazo de los estrógenos (Meyer y cols., 2011). Además, existe otro mecanismo alternativo en el que ambos ER pueden modular la transcripción génica sin interactuar directamente con el DNA, a través de proteínas reguladoras y factores de transcripción que se unirán a otras secuencias específicas y modularán la transcripción (Simoncini, 2009; Schultz-Norton y cols., 2011; Cui y cols., 2013).

Por otro lado, la acción rápida del E2 modula la actividad celular mediante la activación de diferentes vías enzimáticas y la apertura de canales iónicos (Fu y Simoncini, 2008; Levin, 2009). En esta vía están implicados los receptores ER α y ER β de membrana, que se pueden encontrar tanto en la membrana plasmática celular como en la membrana de diferentes orgánulos celulares como es el caso de la mitocondria o del retículo endoplasmático (Levin, 2009). La activación de estos receptores de membrana puede dar lugar a un incremento de los niveles de Ca²⁺ intracelular y/o de NO, así como a la regulación de la expresión de diferentes genes a través de la inducción de factores de transcripción modulados por diferentes cascadas enzimáticas asociadas a quinasas (Hammes y Levin, 2007; Arnal y cols., 2010; Arévalo, y cols., 2015).

Además, también se ha descrito un receptor de estrógenos unido a proteína G (GPER) localizado principalmente en la membrana plasmática del retículo endoplasmático, además de en el aparato de Golgi y en la membrana nuclear (Revankar y cols., 2005; Filardo y cols., 2007). Mediante el GPER se pueden activar rutas de señalización rápidas que podrían conducir a la activación de factores de transcripción, participando de forma indirecta en la vía genómica y regulando de este modo la expresión de genes que no están regulados por elementos ERE (Prossnitz y cols., 2008).

1.4.2. ESTRADIOL Y FUNCIÓN ENDOTELIAL

Una de las principales dianas del E2 a nivel vascular es el endotelio. El E2, además de propiedades antitrombóticas y antiinflamatorias, tiene un papel importante en el control del tono vascular (Novella y cols., 2012). El E2 mejora la respuesta relajante dependiente de endotelio a acetilcolina en vasos aislados de conejas ovariectomizadas (Gisclard y cols., 1987). Además, en células endoteliales en cultivo, el tratamiento con E2 incrementa los niveles de NO (Chambliss y Shaul, 2002). Estos efectos se deben a la acción directa del E2 sobre diferentes mecanismos implicados en la producción de NO, a través del incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular (Rubio-Gayosso y cols., 2000) o la disminución de los niveles de ADMA (Monsalve y cols., 2007). También aumenta la expresión de la eNOS (Sumi y Ignarro, 2003) o su activación mediante fosforilación a través de la ruta PI_3K/AKT (Hisamoto y cols., 2001) y de la MAPK (Chen y cols., 1999).

También se ha descrito la acción del E2 en la modulación del tono vascular a través de sustancias vasodilatadoras derivadas de COX, concretamente de PGI_2 (Ospina y cols., 2003; Sobrino y cols., 2009), así como una disminución de agentes vasoconstrictores en diferentes lechos vasculares (Davidge y Zhang, 1998; Dantas y cols., 1999; Novella y cols., 2010).

El E2 actúa también como antioxidante y disminuye los niveles de ROS mediante la estimulación de la expresión de enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa (Capel y cols., 1981) y la superóxido dismutasa (Sivritas y cols., 2011). Además, disminuye la expresión de enzimas oxidantes, como la NAPDH oxidasa (Wassmann y cols., 2001; Dantas y cols., 2002).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

El envejecimiento está relacionado con alteraciones estructurales y funcionales de la pared vascular que inducen disfunción endotelial, que se manifiesta principalmente por una disminución de la biodisponibilidad de NO, así como por un incremento en la producción de sustancias vasoconstrictoras. Entre ellas destaca el TXA₂, derivado de la COX, implicado en la disfunción vascular asociada al envejecimiento (Briones y cols., 2005; Vanhoutte, 2009).

Los estrógenos ejercen un papel protector a nivel vascular activando la síntesis y liberación de sustancias dilatadoras, como NO y PGI₂ (Novella y cols., 2010; Sobrino y cols., 2010). La disminución de los niveles de estrógenos que se produce a partir de la menopausia induce una menor biodisponibilidad del NO y a un incremento de sustancias contráctiles, entre ellas el TXA₂ (Dantas y cols., 1999, 2004), que genera una disfunción vascular que aumenta el riesgo cardiovascular (Taddei y cols., 1996; Lisabeth y cols., 2009; Moreau y Hildreth, 2014). Debido a que la menopausia coincide temporalmente con un envejecimiento vascular, que el mayor riesgo cardiovascular sea función del envejecimiento, o una consecuencia de la menopausia, o ambas, ha sido objeto de debate durante mucho tiempo (Bittner, 2009).

Un factor común que disminuye la biodisponibilidad del NO tanto en el envejecimiento como en situaciones en las que hay una disminución de estrógenos es el incremento de O₂⁻ (Matz y cols., 2000; LeBlanc y cols., 2008; El Assar y cols., 2012). El O₂⁻ procede de diversas fuentes, fundamentalmente de la NADPH oxidasa (Ray y Shah, 2005; Drummond y Sobey, 2014; Viridis y cols., 2016) aunque se han descrito otras como la COX (da Cunha y cols., 2000; Martínez-Revelles y cols., 2013). Además, el TXA₂ puede aumentar los niveles de O₂⁻ a través de la activación de sus receptores (Zhang y cols., 2011).

En el presente trabajo se utilizan ratonas con senescencia acelerada a las que se les induce de forma quirúrgica la pérdida de estrógenos, un modelo en el que coincide el envejecimiento y la ausencia de estrógenos,

características de la menopausia. La hipótesis del trabajo es que durante el envejecimiento el TXA₂ induce una disfunción endotelial mediada por un incremento de la producción de O₂⁻ y una menor biodisponibilidad del NO y que esta respuesta puede estar modulada por los estrógenos.

2.2. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis es estudiar la participación de las vías de la COX y la NOS en la respuesta al TXA₂ en aorta de ratonas con senescencia acelerada (SAMP8) y ratonas con un envejecimiento biológico normal (SAMR1), comparando las posibles modificaciones con el envejecimiento, la ovariectomía y la terapia hormonal con E2.

Objetivos específicos:

- Caracterizar las ratonas SAM como modelo de envejecimiento vascular, mediante la determinación de su esperanza de vida y la evolución temporal de las características morfológicas y funcionales de la pared vascular.
- Estudiar el papel de los estrógenos en las alteraciones vasculares asociadas al envejecimiento. Para ello, en aorta de ratonas ovariectomizadas con y sin tratamiento con E2, se determinarán las siguientes características morfológicas y funcionales:
 - Parámetros bioquímicos y morfológicos de la pared arterial.
 - Respuesta vascular al KCl, U46619 y acetilcolina.
 - Participación de NOS, COX-1, COX-2 y sus interacciones en la contracción al U46619.
 - Producción de O₂⁻ inducido por el U46619 y contribución de las isoformas de la COX.
 - Expresión génica y proteica de NOS, COX-1 y COX-2.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València y los experimentos se realizaron de acuerdo al Real Decreto 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación.

3.1. MODELO EXPERIMENTAL DE ENVEJECIMIENTO Y MENOPAUSIA

Para la realización de los estudios se utilizó un modelo de ratonas con senescencia acelerada, ratonas SAM (Senescence Accelerated Mouse), obtenido por selección fenotípica a partir de una colonia de ratones AKR/J y descrito en 1981 por Takeda y colaboradores (Takeda y cols., 1981). Se han caracterizado varias cepas de ratonas SAM que desarrollan alteraciones fenotípicas asociadas con el envejecimiento acelerado (Figura 4) (Takeda y cols., 1999). En los experimentos de esta tesis se utilizaron ratonas de la cepa SAMR1, que presentan un envejecimiento biológico normal y fueron utilizadas como grupo control, y ratonas de la cepa SAMP8, que desarrollan senescencia acelerada. Los ratones SAMP8 se caracterizan por mostrar alteraciones asociadas al envejecimiento como cataratas, osteoporosis, amiloidosis senil y pérdida de memoria.

Las colonias de ratonas SAMR1 y SAMP8 fueron criadas y mantenidas en el animalario de la Unidad Central de Investigación de Medicina de la Universitat de València, en un ambiente controlado según las directrices institucionales (temperatura constante a 22 °C, ciclos luz/oscuridad de 12 horas, humedad del 60 %, pienso estándar y agua ad libitum).



Figura 4. Fotografía representativa del fenotipo mostrado por las ratonas SAMR1 (arriba) y SAMP8 (abajo) a los 10 meses de edad. Las ratonas SAMP8 muestran pérdida de pelo y un menor tamaño corporal.

3.1.1. GRUPOS DE ESTUDIO

Los estudios destinados a la caracterización del fenotipo senescente de las ratonas SAMP8 se realizó en ratonas SAMR1 ($n = 70$) y ratonas SAMP8 ($n = 70$), que se distribuyeron en los siguientes grupos:

- Estudio de longevidad: 30 ratonas SAMR1 y 30 ratonas SAMP8.
- Estudio de la evolución temporal de la presión arterial: 10 ratonas SAMR1 y 10 ratonas SAMP8.
- Estudio del envejecimiento en la reactividad vascular: 30 ratonas SAMR1 y 30 ratonas SAMP8. Los estudios se realizaron a los 3 meses (10 ratonas), 6 meses (10 ratonas) y 10 meses (10 ratonas) de edad en cada una de las cepas.

Para el estudio del efecto conjunto de los estrógenos y el envejecimiento, se utilizaron ratonas SAMR1 (n = 72) y ratonas SAMP8 (n = 72) que se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales:

- Controles de la cirugía (Sham): grupo control al que se realizó el mismo procedimiento quirúrgico que a los demás grupos, pero manteniendo intactos los ovarios.
- Ovariectomizadas (Ovx): grupo experimental al que se realizó la extirpación quirúrgica de los ovarios junto al oviducto y la grasa periovárica.
- Ovariectomizadas y tratadas con estrógenos (OvE): grupo al que se le realizó la ovariectomía y además, se les implantó una bomba osmótica de liberación continua de 17 β -estradiol (E2, 10 μ g/Kg/día).

3.1.2. EXTIRPACIÓN QUIRÚRGICA DE LOS OVARIOS

Para determinar el efecto conjunto de los estrógenos y el envejecimiento en la función vascular, ratonas SAMR1 y SAMP8 se ovariectomizaron a los 5 meses de edad. Los animales se anestesiaron mediante la administración de isoflurano por vía inhalatoria. El protocolo analgésico se completó con la administración de buprenorfina por vía subcutánea (0,05 mg/kg). Se colocó al animal en decúbito lateral derecho y se desinfectó la zona a abordar. Tras comprobar la profundidad anestésica por pérdida de reflejos podales, se procedió al abordaje del flanco lateral derecho realizándose una incisión de 0,5 cm en el borde dorsal de la última costilla. Tras la incisión cutánea y muscular, se expuso el ovario con el infundíbulo y el ligamento ovárico. Se realizó una ligadura transfixiante por debajo del infundíbulo con una sutura monofilamento reabsorbible de 5/0 (Monosyn, Braun). Se repitió la misma operación en el lado izquierdo del animal. Finalizada la intervención, se desinfectó la zona y se proporcionó analgesia postoperatoria mediante la administración de meloxicam (0,3 mg/kg cada 24 horas durante 3 días).

Para el tratamiento de reemplazo con estrógenos se utilizaron minibombas osmóticas (Alzet Osmotic Pumps® Model 2004, Durect Corporation) que liberan de manera continua pequeñas cantidades de solución de carga a razón de 0,25 $\mu\text{L}/\text{h}$ durante 28 días. Estas bombas se caracterizan por poseer un reservorio flexible e impermeable que contiene polietilenglicol como agente osmótico y una membrana semipermeable que permite la difusión pasiva del líquido. Las bombas osmóticas se prepararon con una concentración de E2 (Sigma-Aldrich) de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por mg de peso del animal. Para ello, se preparó una solución stock de 8 mg/mL de E2 en dimetilsulfóxido (DMSO) absoluto (Sigma-Aldrich). Posteriormente se realizó una dilución 1:200 en DMSO al 50 % en solución salina fisiológica (NaCl 0,9 %, Sigma Aldrich). La solución se filtró con un filtro de 0,22 μm y las bombas se cargaron con 200 μL .

La implantación de las bombas se llevó a cabo después de la ovariectomía, mientras el animal se mantenía bajo anestesia y analgesia. La bomba se colocó en la zona subescapular del animal. Mediante el uso de una pinza hemostática se creó un bolsillo subcutáneo y se introdujo la bomba en el interior con la apertura del moderador de flujo en dirección a la cabeza del animal. El E2 liberado es absorbido por los capilares de la zona de implantación permitiendo su paso a la circulación sistémica.

3.2. ESTUDIOS *IN VIVO*

3.2.1. DETERMINACIÓN DE LA ESPERANZA DE VIDA MÁXIMA Y MEDIA

Para determinar la longevidad de las ratonas se realizó el seguimiento y registro de las defunciones. El estudio se inició con 30 ratonas SAMR1 y 30 SAMP8 de 2 meses de edad que se separaron de la madre coincidiendo con el fin de la lactancia, para descartar posibles muertes prematuras por alteraciones durante el desarrollo. El registro de las defunciones se realizó hasta la muerte del último animal incluido en el estudio. Durante todo el periodo, los animales se

mantuvieron en condiciones normales de temperatura, humedad, comida y agua.

Completado el registro, se procedió a la elaboración de curvas de supervivencia utilizando el estimador Kaplan-Meyer para determinar la esperanza de vida máxima, definida como la edad máxima alcanzada por la última ratona de cada cepa, y la esperanza de vida media, promedio de edad que alcanzó el conjunto de las ratonas estudiadas en cada cepa.

3.2.2. REGISTRO DE LA PRESIÓN ARTERIAL

La presión arterial de las ratonas se determinó mediante el método del manguito de cola (*tail-cuff*) (Buñag, 1973), que permite la medida indirecta de la presión arterial en animales conscientes. La técnica está basada en la medida esfigmomanométrica utilizada en humanos adaptada a roedores. El manguito de cola dispone de una membrana de presión cuya finalidad es inflarse para ocluir el flujo sanguíneo de la arteria caudal. Junto al manguito, un transductor detecta los cambios en el pulso del flujo arterial.

En este estudio se utilizó el equipo PanLab LE5002 (Harvard Apparatus) y se registraron los valores de presión arterial sistólica (PAS) y de presión arterial diastólica (PAD). La determinación se llevó a cabo entre las 8:00 h y las 11:00 h para evitar fluctuaciones de los valores de presión arterial por los ritmos circadianos. Las medidas se realizaron una vez los animales se adaptaron a las condiciones ambientales de trabajo.

Debido a que los animales se estresan fácilmente en condiciones no habituales, es imprescindible un buen acondicionamiento antes de iniciar la medida de la presión arterial. El acondicionamiento se inició a los 2 meses de edad, introduciéndolas durante 15 - 20 min en el soporte específico del equipo. El soporte dispone de una apertura en un extremo por la cual sale la cola del animal permitiendo su manipulación. Durante este tiempo se realizaron diferentes ciclos de medida para la adaptación del animal al sistema. Los valores registrados durante este periodo no se incluyeron en el estudio.

El registro de la presión arterial se llevó a cabo una vez se estableció en el sistema una buena amplitud y estabilización de la señal de pulso, indicador de una adecuada vasodilatación de la cola y ausencia de estrés en el animal. En cada determinación se registraron 3 - 4 medidas por animal.

3.3. ESTUDIOS *EX VIVO*

3.3.1. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS, OBTENCIÓN DE PLASMA Y ANÁLISIS BIOQUÍMICO

Antes del sacrificio de los animales, se registró su peso para determinar las variaciones debidas al envejecimiento y/o cirugía. Las ratonas fueron anestesiadas y mediante punción intracardiaca, se obtuvo una muestra de sangre y se sacrificaron. La muestra de sangre se recogió en un tubo con EDTA (BD Vacutainer, Becton-Dickinson), se centrifugó a 1500 x g durante 15 min a 4 °C. El plasma obtenido se conservó a -80 °C hasta su posterior uso.

La efectividad de la ovariectomía y el tratamiento con E2 se comprobó mediante el registro del peso del útero y el análisis de la concentración plasmática de estrógenos. Además, se determinaron los niveles plasmáticos de glucosa, triacilglicéridos, colesterol total y urea mediante un autoanalizador (ADVIA Centaur® CP Immunoassay System, Siemens).

3.3.2. REACTIVIDAD VASCULAR EN BAÑO DE ÓRGANOS

Una vez el animal fue sacrificado se aisló la aorta en una placa Petri con solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) a 4 °C. La aorta se limpió cuidadosamente de grasa y adherencias con tijeras de microdisección, bajo una lupa estereoscópica (Nikon Instruments Inc.) e iluminada con luz fría (EK-1, Euromex).

La aorta abdominal se utilizó para el estudio histológico de la pared vascular, la expresión génica y proteica mediante inmunohistoquímica, y la producción de aniones superóxido.

De la aorta torácica se obtuvieron 4 segmentos de 4 mm de longitud. Cada uno de los segmentos arteriales se montó en un baño de órganos para el registro de la tensión isométrica. El procedimiento consistió en introducir dos alambres finos y rígidos de acero inoxidable (150 μm de diámetro) a través de la luz del anillo vascular. Uno de los alambres se encontraba fijo a un soporte del baño de órganos. El otro alambre era móvil para permitir su desplazamiento de forma paralela al fijo y estaba conectado a un transductor de fuerza (Pioden controls Ltd.) (Figura 5). Cada baño de órganos contenía 5 mL de solución fisiológica Krebs-Henseleit modificada. Esta solución está compuesta por NaCl 115 mM, KCl 4,6 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ 1,2 mM, CaCl_2 2,5 mM, NaHCO_3 25 mM, glucosa 11,1 mM y EDTA disódico 0,01 mM. Esta solución se burbujeó con carbógeno (95 % O_2 y 5 % CO_2). El pH de la solución se mantuvo entre 7,3 y 7,4 y la temperatura a 37°C durante todo el experimento mediante un termocirculador (Harvard Apparatus).

En experimentos preliminares se determinó la tensión basal óptima, aquella a la se produce la respuesta máxima a una solución despolarizante de KCl 60 mM. En la aorta torácica de ratón, la tensión basal óptima registrada fue de 9,8 mN.

Una vez montado el anillo en el baño de órganos con ayuda del tornillo micrométrico se le aplicó la tensión basal óptima. Puesto que la respuesta inmediata de los segmentos vasculares a la distensión es la relajación, la tensión se reajustó periódicamente hasta alcanzar una tensión estable. Durante este periodo de equilibrio la solución del baño se renovó cada 15 min. Los cambios de tensión isométrica se registraron en un ordenador a través de un sistema conversor analógico-digital y de adquisición de datos PowerLab/8e (AD Instruments Ltd.) y fueron analizados mediante el software Chart v3.4/s (AD Instruments Ltd.) (Figura 5).

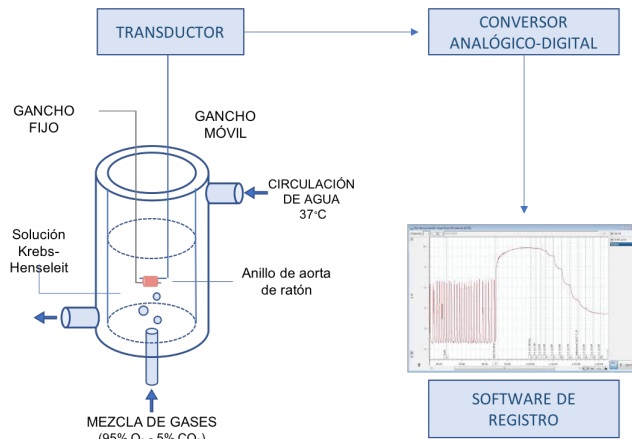


Figura 5. Diagrama representativo de los diferentes componentes requeridos para llevar a cabo los estudios de reactividad vascular en baño de órganos con aorta de ratón.

Tras un periodo de estabilización de 1h, los segmentos aórticos se activaron con cloruro potásico (KCl) (60 mM), que causa contracción al inducir la despolarización del músculo liso vascular y la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. A los 15-20 min se alcanzó una respuesta estable en meseta. De esta forma se comprobó que los segmentos arteriales son funcionales y se descartaron aquellos que respondieron con una contracción menor a 5 mN.

La integridad funcional del endotelio se comprobó en segmentos vasculares previamente contraídos con serotonina (10⁻⁵ M) a los que, una vez alcanzada una contracción estable, se les adicionó acetilcolina (10⁻⁶ M). Una relajación superior al 60% se consideró indicativa de una buena integridad endotelial.

Para determinar si las respuestas vasculares dependían de la presencia de endotelio, se estudió un grupo de segmentos arteriales en los que se eliminó el endotelio de forma mecánica, introduciendo suavemente un

alambre rugoso de acero inoxidable por la luz del vaso y con la ayuda de unas pinzas se desplazó el segmento aórtico longitudinal y transversalmente. La ausencia de endotelio se comprobó por la ausencia de relajación inducida por acetilcolina de los vasos precontraídos con serotonina.

Las respuestas inducidas por los diferentes agonistas utilizados en los experimentos se obtuvieron añadiendo concentraciones acumulativas del agonista en el baño de órganos para alcanzar la concentración final requerida. Se realizaron curvas concentración-respuesta al KCl (5 - 120 mM) para determinar la respuesta contráctil del músculo liso ante una despolarización directa. Para estudiar la relajación endotelio-dependiente, se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) en segmentos con y sin endotelio previamente contraídos con serotonina (10^{-5} M). Para comprobar la participación del NO en respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M), los segmentos vasculares se incubaron 15 min con L-NAME (10^{-4} M), inhibidor de la NOS (Rees y cols., 1990).

La relajación independiente de endotelio se estudió mediante la respuesta al nitroprusiato sódico, un vasodilatador que induce relajación al actuar directamente sobre el músculo liso vascular. Segmentos vasculares con y sin endotelio de todos los grupos de estudio se contrajeron con serotonina (10^{-5} M) y después de obtener una contracción estable se añadió nitroprusiato sódico (10^{-11} - 10^{-7} M).

El TXA_2 tiene una vida media muy corta, aproximadamente 30 segundos, y se degrada rápidamente a una forma inactiva, el TXB_2 (Hamberg y cols., 1975). Por este motivo los estudios que abordan los efectos vasculares del TXA_2 se han realizado utilizando el U46619, un mimético estable del TXA_2 . En segmentos vasculares de todos los grupos de estudio se realizaron curvas concentración-respuesta al U46619 (10^{-9} - 3×10^{-7} M). La participación del NO en la respuesta al U46619 se analizó mediante la incubación durante 15 min con L-NAME (10^{-4} M). La participación de las COX se determinó con la incubación durante 15 min con indometacina (10^{-5} M), un

inhibidor inespecífico de las COX (Botting y cols., 2006), con SC560 (10^{-7} M), un inhibidor selectivo de la COX-1 (Smith y cols., 1998) o celecoxib (10^{-5} M), un inhibidor selectivo de la COX-2 (Davies y cols., 2000). La participación conjunta de la NOS y las COX, se determinó con la inhibición simultánea con L-NAME (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M), SC560 (10^{-7} M) o celecoxib (10^{-5} M).

3.4. ESTUDIOS *IN VITRO*

3.4.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA

Para el estudio de la estructura de la pared vascular se utilizaron muestras de aorta abdominal fijadas y conservadas en Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek Europe) procedentes de ratonas de los grupos Sham, Ovx y OvE SAMR1 (n = 4 por grupo) y SAMP8 (n = 4 por grupo). Se realizaron secciones arteriales de 4 μ m de grosor en un microtomo criostato Leica CM1900 (Leica Microsistemas). Las muestras se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio SuperFrost (ThermoFisher Scientific) y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 - 60 min. Posteriormente se realizó una tinción con hematoxilina-eosina.

Para el análisis del grosor de la pared arterial se realizaron 6 capturas por sección con un microscopio óptico digital Leica DMD108 (Leica Microsistemas) y las imágenes se analizaron mediante el software del propio microscopio LAS-DMD v1.3.1 (Leica Microsistemas).

3.4.2. EXPRESIÓN DE PROTEINAS POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES ARTERIALES

La expresión proteica se estudió en cortes de 4 μ m de grosor de aorta abdominal realizados en el microtomo criostato, procedentes de muestras fijadas y conservadas en Tissue-Tek OCT de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los grupos Sham, Ovx y OvE (n = 4 - 6 aortas por grupo). Las secciones arteriales se colocaron sobre portaobjetos recubiertos de Polilisina (Menzel-Gläser,

ThermoFisher Scientific) y se secaron a temperatura ambiente entre 30 - 60 min. Para el desenmascaramiento antigénico, los portaobjetos se sumergieron en agua destilada durante 30 min y después en una solución de citrato sódico 10 mM (pH 6) a 83°C durante 40 min. Posteriormente, se dejaron 40 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se bloquearon durante 30 min con suero de cabra o burro al 3% (Sigma Aldrich). A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario diluido en el suero de bloqueo durante 18 h a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-COX-1, anti COX-2 (de ratón) y anti-eNOS (de conejo), todos ellos de SantaCruz Biotechnologies. Al día siguiente, los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS y los cortes se incubaron con anticuerpos secundarios con fluorocromo AlexaFluor® 488 anti-ratón o AlexaFluor® 647 anti-conejo (ThermoFisher Scientific) diluidos 1:500 en PBS durante 1 h. Para el montaje se utilizó ProLong Gold Reagent con DAPI (Molecular Probes, Life Technologies).

La captura y el posterior análisis de las imágenes se realizó en un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse-Ti conectado a un ordenador con el software NIS-elements Basic Research v3.22. Se realizaron 4 - 6 capturas por sección de tejido con una magnificación de 400X exponiendo las muestras a diferentes filtros de excitación: (1) 387 ± 11 nm para el DAPI, (2) 482 ± 35 nm para el AlexaFluor 488, y (3) 628 ± 40 nm para el AlexaFluor® 647. La cuantificación de la fluorescencia se delimitó únicamente a nivel endotelial utilizando la herramienta de marcaje del propio software y que proporcionó valores de intensidad de fluorescencia a partir de la relación del número de píxeles por área delimitada.

3.4.3. PRODUCCIÓN DE SUPERÓXIDO EN SECCIONES ARTERIALES

La producción de anión superóxido (O_2^-) se detectó in situ mediante la tinción con dihidroetidio (DHE, Molecular Probes), compuesto no fluorescente que puede atravesar la membrana celular, y una vez en el

interior cuando es oxidado por el O_2^- produce hidroetidina (HE), compuesto que se intercala en el DNA emitiendo fluorescencia. Se utilizaron secciones de 14 μm de grosor de aorta abdominal, fijadas en Tissue-Tek OCT, de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los grupos Sham, Ovx y OvE (n = 4 - 8 aortas por grupo).

Los cortes arteriales se mantuvieron en PBS a 37°C durante todo el experimento para mantener su hidratación. Después de 15 min se añadió la DHE (2 μM) y se incubó durante 30 min en oscuridad. En algunos cortes, a los 10 min de iniciar la incubación con DHE, se añadió U46619 10^{-8} M.

Para caracterizar el origen del O_2^- en respuesta al U46619, 15 min antes de la adición de la DHE, se añadió GR32191B (10^{-7} M), un antagonista del receptor TP (He y cols., 1999); tempol (10^{-2} M), un mimético de la enzima superóxido dismutasa que degrada el O_2^- (Petronio y cols., 2013) o apocinina (3×10^{-3} M), un inhibidor inespecífico de las NOX. Para determinar la posible participación de las COX en la producción de O_2^- , los cortes se incubaron con indometacina (10^{-5} M), SC560 (10^{-7} M), celecoxib (10^{-5} M) o SC560 (10^{-7} M) más celecoxib (10^{-5} M). Las incubaciones se realizaron con los agonistas o antagonistas en ausencia (Control) y en presencia de U46619 (10^{-8} M).

Al finalizar las incubaciones, las muestras se lavaron con PBS a 37°C y se montaron con medio de montaje ProLong Gold Diamant (ThermoFisher Scientific). La captura de las imágenes se realizó con un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse-Ti. Se realizaron 4 - 6 capturas por sección de tejido con una magnificación de 400X exponiendo las muestras con el filtro de luz polarizada verde (Excitación: 535 ± 25 nm/Emisión: > 590 nm). Las imágenes se analizaron con el software NIS-elements Basic Research v3.22 determinando la intensidad de fluorescencia como la relación del número de píxeles por área de pared arterial.

3.4.4. EXPRESIÓN DE mRNA EN AORTA

La determinación de los niveles de RNA mensajero (mRNA) se realizó a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR consiste en la amplificación exponencial de un segmento específico de DNA actuando como molde para formar millones de copias del mismo. La particularidad de la PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real es la posibilidad de monitorizar el desarrollo de la reacción mediante el uso de fluorocromos específicos. Una de las tecnologías existentes actualmente son los ensayos de expresión TaqMan® (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific), la cual se basa en el uso de sondas que reconocen secuencias cortas de DNA del gen de interés. Esta sonda presenta un fluorocromo unido a un extremo y un inhibidor de fluorescencia al otro extremo, donde a medida que avanza la reacción de polimerización y alcanza la sonda, esta es degradada y el fluorocromo queda libre emitiendo fluorescencia. Con cada copia nueva se produce un incremento proporcional de la intensidad de fluorescencia detectada permitiendo conocer la cantidad aproximada de DNA de interés que ha sido amplificado.

Los segmentos de aorta utilizados para la extracción de RNA total fueron conservados en RNAlater® (Ambion) a -80 °C hasta el día de la extracción. El tejido se disgregó con el sistema *MagnaLyser* (Roche) usando tubos con perlas de cerámica en presencia de 1 mL de TRIzol® Reagent (ThermoFisher Scientific). Se realizaron 4 ciclos de 20 segundos a 7.000 rpm con intervalos de 2 min en hielo para reducir la temperatura. Seguidamente el sobrenadante se hizo pasar varias veces por una aguja de 25G para la completa disgregación del tejido. La primera etapa del aislamiento de RNA consistió en la obtención de una fase orgánica con los ácidos nucleicos mediante el método del fenol-cloroformo. Para ello se adicionó 0,2 volúmenes de cloroformo a la muestra con TRIzol® Reagent y posteriormente se centrifugó a 12.000 x *g* durante 15 min a 4 °C. De las 3 fases generadas, se recuperó la fase orgánica superior. Mediante el uso de un kit de purificación por minicolumnas (PureLink, Life Technologies) se aisló el RNA total siguiendo las indicaciones del fabricante. Durante este proceso, se incluyó un paso de

digestión enzimática con DNasa I (ThermoFisher Scientific). El RNA total se eluyó de la columna en 30 - 50 μ L de agua libre de RNasas y se congeló a -80°C hasta su utilización. La cuantificación del RNA total se realizó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Una muestra con una relación de absorbancias de 260/280 próxima o igual a 2 se consideró una muestra de elevada pureza en RNA.

Antes de la realización de la PCR, se realizó la retrotranscripción del mRNA a DNA complementario (cDNA) mediante el uso del kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. La RT se realizó a partir de 100-150ng de RNA total para un volumen de reacción de 20 μ L y se llevó a cabo en un termociclador (MasterCycler 5891T13, Eppendorf) programado con las condiciones de temperatura óptimas. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su uso.

Las PCR se llevaron a cabo mediante el sistema QuantStudio 5 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) con soporte para placa de 384 pocillos conectado a un ordenador con el software QuantStudio 1.3 (Applied Biosystems). Se utilizaron sondas de expresión *TaqMan® Gene Assay* (Applied Biosystems) para cada uno de los genes de interés (PTGS1: Mm00478374_m1; PTGS2: Mm00447271_m1; NOS3: Mm00435217_m1; GAPDH: Mm03302249_g1) y el *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) como medio en el que se desarrolló la reacción.

Finalizada la PCR, el software proporcionó para cada pocillo un valor de ciclo umbral (Ct, del inglés *cycle threshold*) para cada uno de los genes. El valor de Ct viene referido al número de ciclo de amplificación de PCR en el cual la intensidad de fluorescencia detectada supera al ruido de fondo de la reacción. Cada uno de los genes se relativizó frente al gen de referencia, en nuestro caso el GAPDH y se empleó el método del $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Para el análisis de los resultados se utilizó el software QuantStudio 1.3 (Thermofisher Scientific).

3.5. FÁRMACOS UTILIZADOS

Para la realización de los diferentes estudios se utilizaron los siguientes sustancias:

- Clorhidrato de serotonina
- Cloruro de acetilcolina
- 9,11-dideoxi-9 α ,11 α -metano-epoxi-prostaglandina F_{2 α} (U46619)
- N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME)
- Indometacina
- 5-(4-clorofenil)-1-(4- metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazole (SC560)
- 4-[5-(4-Metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] bencenosulfonamida (celecoxib)
- 4'-Hidroxi-3'-metoxiacetofenona (Apocinina)
- 4-Hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil (Tempol)
- Ácido (4Z)-7-[(1R,2R,3S,5S)-5-([1,1'-Bifenil]-4-ilmetoxi)-3-hidroxi-2-(1-piperidinil)ciclopentil]-4-heptenoico (GR32191B)
- Nitroprusiato sódico
- 17 β -Estradiol (E2)

Todos los fármacos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Los reactivos utilizados se disolvieron inicialmente en solución Krebs-Henseleit excepto el U46619, la indometacina, el SC560 y el celecoxib que inicialmente se disolvieron en etanol. El E2 se disolvió en DMSO al 50 % en solución salina fisiológica (NaCl 0,9 %). Posteriores diluciones se llevaron a cabo en solución salina fisiológica para los experimentos de reactividad vascular o en PBS para el resto de estudios moleculares. Las diluciones de trabajo de cada fármaco se prepararon el día del experimento y se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM).

Para el análisis comparativo de la esperanza de vida de las cepas de ratonas SAMR1 y SAMP8 se utilizó el test estadístico Log-Rank. Los datos se expresaron como el porcentaje de animales vivos desde el inicio del estudio a los 2 meses de edad.

En los experimentos de reactividad vascular las respuestas contráctiles se expresaron como tensión absoluta (mN) y la vasorrelajación se expresa como el porcentaje de relajación (%) de la contracción alcanzada con el fármaco vasoconstrictor. Para cada una de las curvas concentración-respuesta se calculó el pD_2 (-log de la concentración requerida para alcanzar el 50% de la respuesta máxima [EC_{50}]) mediante análisis de regresión no lineal. El área bajo la curva (ABC) se calculó para cada una de las curvas concentración-respuesta al U46619 y se expresó en unidades arbitrarias (U.A.). La contribución de la NOS y/o de la COX en la contracción inducida por el U46619 se determinó mediante la diferencia entre el ABC del U46619 en presencia de L-NAME y/o indometacina, SC560 o celecoxib y el ABC del U46619.

Para determinar las diferencias de las medias entre grupos de la misma cepa (SAMR1 o SAMP8), ya sea por envejecimiento (3, 6 o 10 meses) o por cirugía (Sham, Ovx o OvE) se utilizó un test ANOVA de una vía seguido de un test de Bonferroni. Para determinar las diferencias entre grupos de las dos cepas (SAMR1 vs SAMP8) con el envejecimiento o cirugía se utilizó un test ANOVA multivariante seguido de un test de Bonferroni. En todos los casos una probabilidad menor de 0,05 ($p < 0,05$) se consideró significativa. El análisis estadístico se realizó con el software Prism 6 (GraphPad Software Inc.).

4. RESULTADOS

4.1. RATONAS SAM COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO VASCULAR

4.1.1. CURVAS DE SUPERVIVENCIA

Para caracterizar el fenotipo senescente se determinaron las curvas de supervivencia de ratonas SAMR1 y SAMP8 y los parámetros de longevidad media y máxima para ambas cepas (Figura 6).

Las ratonas SAMP8 mostraron una longevidad media de 12 meses, calculada a partir de la edad a la que el 50 % de las ratonas permanecían vivas. Las ratonas SAMR1 mostraron una mayor longevidad media, de 22 meses. En el caso de la longevidad máxima, edad máxima alcanzada por el último individuo incluido en el estudio, en las ratonas SAMP8 fue de 22 meses mientras que para las ratonas SAMR1 fue de 38 meses (Figura 6).

4.1.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

La Tabla 1 recoge las características morfológicas y los parámetros bioquímicos del plasma de las ratonas SAMR1 y SAMP8 a los 3, 6 y 10 meses de edad. Las ratonas de ambas cepas aumentaron su peso corporal con la edad, siendo este incremento mayor en las ratonas SAMR1 que en las SAMP8 (Tabla 1). El peso uterino y los niveles plasmáticos de E2, indicadores de la función ovárica, no mostraron variaciones con la edad en ratonas SAMR1 y SAMP8, ni tampoco cuando se compararon estos parámetros entre ambas cepas. De la misma forma los valores de glucosa, creatinina y bilirrubina total tampoco se vieron modificados ni por la cepa, ni por la edad de las ratonas (Tabla 1).

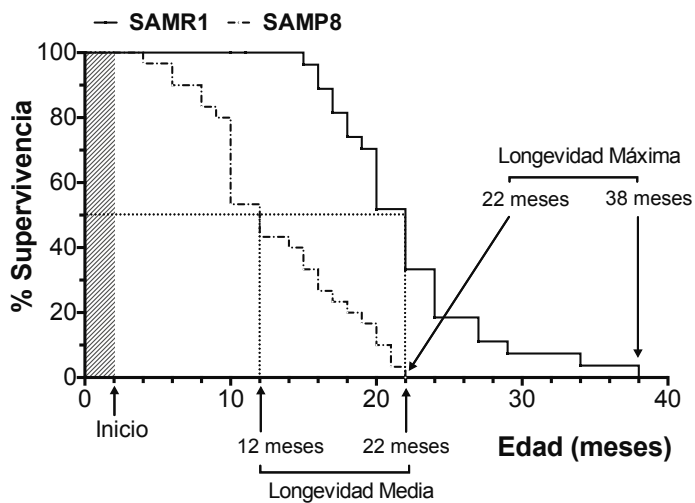


Figura 6. Curvas de supervivencia de ratonas SAMR1 y SAMP8. Determinación de la longevidad media mediante interpolación en cada una de las curvas al 50 % de supervivencia. Determinación de la longevidad máxima como punto de corte de las curvas sobre el eje de las ordenadas donde se alcanza el 0 % de supervivencia. *n* = 30 ratonas por cepa.

Tabla 1. Parámetros morfológicos y bioquímicos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad.

	SAMR1	SAMP8
Peso corporal (g)		
3 meses	23,7 ± 0,20	23,2 ± 0,30
6 meses	26,7 ± 0,60 [#]	24,6 ± 0,40 ^{*#}
10 meses	30,7 ± 1,00 ^{#§}	27,4 ± 0,70 ^{*#§}
Peso útero (g)		
3 meses	1,05 ± 0,08	1,00 ± 0,05
6 meses	1,08 ± 0,10	1,00 ± 0,07
10 meses	1,12 ± 0,07	1,09 ± 0,05
17β-estradiol (µg/mL)		
3 meses	0,29 ± 0,08	0,33 ± 0,60
6 meses	0,27 ± 0,07	0,29 ± 0,05
10 meses	0,28 ± 0,07	0,31 ± 0,04
Glucosa (mg/dL)		
3 meses	165 ± 31	159 ± 13
6 meses	170 ± 18	173 ± 15
10 meses	185 ± 17	197 ± 11
Creatinina (mg/dL)		
3 meses	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,02
6 meses	0,27 ± 0,02	0,28 ± 0,01
10 meses	0,26 ± 0,02	0,30 ± 0,02
Bilirrubina total (mg/dL)		
3 meses	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
6 meses	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01
10 meses	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01

Media ± SEM. n=10 ratonas por grupo de estudio. *p<0,05 vs. ratonas SAMR1 de la misma edad; #p<0,05 vs. ratonas de 3 meses de la misma cepa; §p<0,05 vs. ratonas de 6 meses de edad de la misma cepa.

4.1.3. EVOLUCIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL CON LA EDAD

El estudio de la evolución de la presión arterial con la edad se determinó en el rango de 3 a 10 meses, teniendo en cuenta que la longevidad media de la cepa SAMP8 es de 12 meses. Este intervalo comprende todas las etapas de la vida de las ratonas SAMP8, evitando llegar a edades donde su supervivencia estuviera comprometida. Los valores medios de PAS y PAD desde los 3 hasta los 10 meses de edad se muestran en la Tabla 2 y la Figura 7.

En ratonas SAMR1 de 3 meses de edad los valores de PAS y PAD fueron de 100 ± 1 mmHg y 78 ± 1 mmHg, respectivamente. Con la edad se observó un aumento en la PAS a los 9 meses, mientras que en el rango de edades del estudio la PAD no se modificó. En las ratonas SAMP8, el valor de PAS a los 3 meses de edad (103 ± 2 mmHg) aumentó a los 6 meses y el de PAD (83 ± 2 mmHg) a los 8 meses.

Cuando se compararon los valores de PAS y PAD entre las cepas SAMR1 y SAMP8, no se observaron diferencias significativas a los 3 meses. Estos resultados indican que a edades tempranas las dos cepas son normotensas y tienen valores de presión arterial similares, por lo que los cambios observados serían atribuibles al envejecimiento acelerado característico de la cepa SAMP8. A partir de los 6 meses la PAS fue significativamente mayor en SAMP8, mientras que el aumento en la PAD se observó a los 8 meses de edad ($p < 0,05$, Tabla 2 y Figura 7).

Tabla 2. Valores de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) en ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3 a 10 meses de edad.

Edad	SAMR1		SAMP8	
	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
3 meses	100 ± 1	78 ± 1	103 ± 1	83 ± 2
4 meses	103 ± 4	79 ± 3	105 ± 3	82 ± 1
5 meses	105 ± 4	79 ± 4	107 ± 1	84 ± 1
6 meses	105 ± 2	78 ± 2	112 ± 1*#	85 ± 1
7 meses	106 ± 2	81 ± 2	114 ± 1*#	88 ± 2
8 meses	107 ± 1	83 ± 1	115 ± 1*#	91 ± 1*#
9 meses	108 ± 1#	83 ± 1	118 ± 2*#	93 ± 2*#
10 meses	108 ± 1#	83 ± 1	118 ± 2*#	95 ± 2*#

Media ± SEM. n=10 ratonas por cepa. * $p < 0,05$ vs. grupo SAMR1 de la misma edad, # $p < 0,05$ vs. 3 meses de edad.

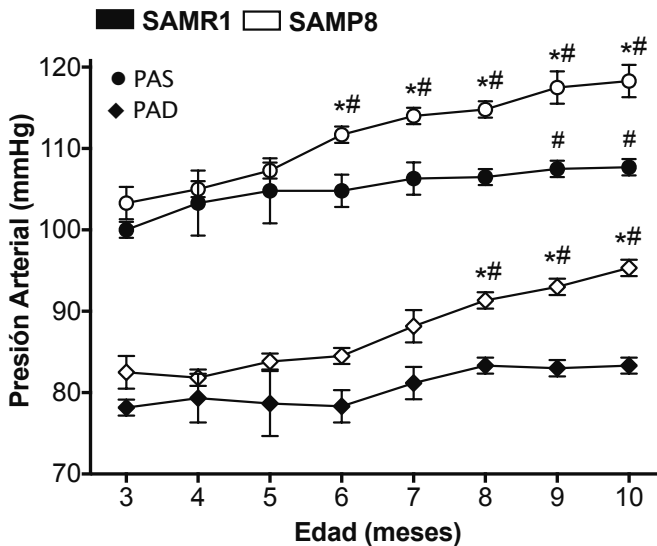


Figura 7. Evolución de los valores de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) con la edad en ratonas SAMR1 y SAMP8. Los puntos representan la media ± SEM. n = 10 ratonas por cepa. * $p < 0,05$ vs. grupo SAMR1 de la misma edad, # $p < 0,05$ vs. 3 meses de edad.

4.1.4. ESTUDIO DE REACTIVIDAD VASCULAR

Para continuar con la caracterización del modelo de ratonas SAM, estudiamos la respuesta vascular a diferentes vasoconstrictores y vasorrelajantes en segmentos aórticos de ambas cepas. Con base en los estudios previos de longevidad y de presión arterial se decidió realizar este estudio a las edades de 3, 6 y 10 meses. A los 3 meses, las dos cepas tienen la misma supervivencia y los mismos valores de PAS y PAD. A los 6 meses de edad se observan diferencias en los valores de presión arterial: la PAS de las ratonas SAMP8 aumenta significativamente respecto a las ratonas SAMR1. A los 10 meses, las ratonas SAMP8 están cerca de la supervivencia media y existen diferencias significativas en los valores de PAS y PAD (Tabla 2 y Figura 7).

La solución despolarizante de KCl indujo una contracción dependiente de la concentración en todos los segmentos aórticos. En aorta de ratonas de 3 meses de edad, el KCl indujo una respuesta similar a la obtenida en ratonas SAMP8 en términos de pD_2 y efecto máximo (E_{max}) (Tabla 3 y Figura 8A). Estos resultados descartan posibles diferencias en la contracción al KCl debidas a características intrínsecas de las cepas. Sin embargo, a los 6 meses, las SAMP8 mostraron una mayor contracción al KCl que las SAMR1, diferencia que se mantuvo a los 10 meses de edad. Los valores de pD_2 al KCl no mostraron diferencias entre SAMR1 y SAMP8 de la misma edad (Tabla 3 y Figura 8A).

Por otra parte, en ratonas SAMR1, las aortas mostraron una contracción similar a los 3 y 6 meses de edad y sólo se evidenciaron diferencias a los 10 meses, cuando aumentó la máxima contracción y el pD_2 al KCl (Tabla 3 y Figura 8A). En ratonas SAMP8 la contracción al KCl aumentó a los 6 meses de edad y el incremento fue mayor a los 10 meses. Además, a los 10 meses también aumentó el pD_2 (Tabla 3).

El U46619, un agonista de los receptores del TXA₂, indujo contracción dependiente de la concentración en todos los grupos estudiados. Esta contracción fue mayor en aorta de ratonas SAMP8 cuando se comparó con la de ratonas SAMR1, mientras que el pD₂ aumentó únicamente a los 6 y 10 meses (Tabla 3 y Figura 8B). Dentro de la misma cepa, las aortas de las ratonas SAMP8 registraron un incremento en la máxima contracción al U46619 a los 6 meses. A los 10 meses se observó un incremento mayor de la Emax al U46619, aumentando también el pD₂. En el grupo de ratonas SAMR1, sólo a los 10 meses de edad aumentó significativamente el pD₂ y la Emax (Tabla 3 y Figura 8B).

Tabla 3. Valores de pD₂ y efecto máximo (Emax) en respuesta al KCl (5 - 120 mM) y U46619 (10⁻⁹ - 3x10⁻⁷ M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad.

	KCl		U46619	
	pD ₂	Emax (mN)	pD ₂	Emax (mN)
SAMR1				
3 meses	1,48 ± 0,01	6,08 ± 0,16	7,93 ± 0,04	12,00 ± 0,50
6 meses	1,44 ± 0,01	6,25 ± 0,25	7,92 ± 0,09	12,06 ± 0,60
10 meses	1,53 ± 0,02#§	7,44 ± 0,24#§	8,13 ± 0,08#§	13,73 ± 0,44#§
SAMP8				
3 meses	1,48 ± 0,01	6,37 ± 0,21	8,07 ± 0,04	14,07 ± 0,60*
6 meses	1,45 ± 0,02	7,49 ± 0,38*#	8,24 ± 0,03*#	15,50 ± 0,51*#
10 meses	1,52 ± 0,01#§	9,00 ± 0,23*#§	8,30 ± 0,08*#	18,56 ± 0,67*#§

Media ± SEM. n=10 ratonas por grupo. *p<0,05 vs. grupo SAMR1 de la misma edad; #p<0,05 vs. ratonas de 3 meses de la misma cepa; §p<0,05 vs. grupo de 6 meses de la misma cepa.

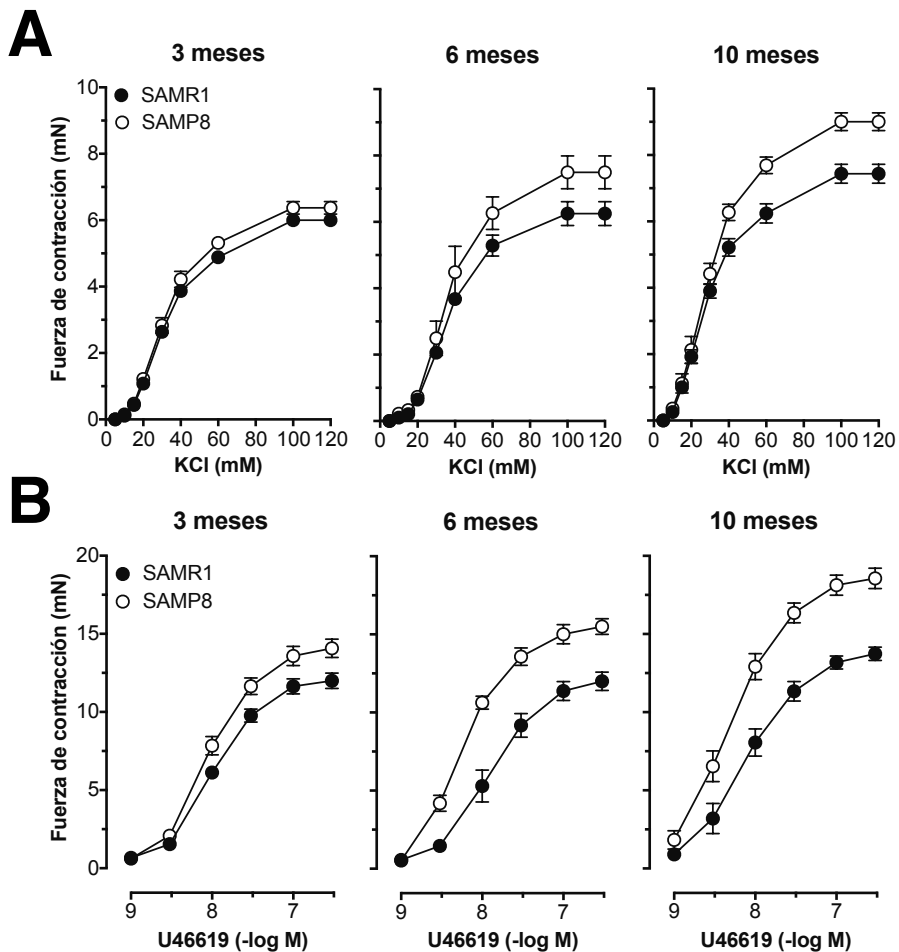


Figura 8. Curvas concentración respuesta (A) al KCl (5 - 120 mM) y (B) al U46619 (10^{-9} - 3×10^{-7} M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad. Los puntos representan la media \pm SEM. n = 10 ratonas por grupo de estudio.

En la respuesta relajante dependiente del endotelio, el efecto del envejecimiento se estudió mediante la respuesta a la acetilcolina (10^{-6} M) en anillos con y sin endotelio previamente contraídos con serotonina (10^{-5} M). En todos los anillos aórticos con endotelio la acetilcolina indujo relajación (Figura 9A), mientras que, en anillos desprovistos de endotelio, la acetilcolina no indujo ningún efecto. Además, en segmentos con endotelio incubados con L-NAME (10^{-4} M), la relajación a la acetilcolina fue inhibida en todos los casos (Figura 9B), indicando que en aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 la relajación dependiente de endotelio inducida por la acetilcolina está mediada por el NO.

El efecto del envejecimiento en la respuesta de la acetilcolina se estudió en ratonas SAMR1 y SAMP8. A los 3 meses de edad las aortas de ratonas SAMR1 y SAMP8 no mostraron diferencias significativas en la respuesta vasorrelajante, lo que descarta la posibilidad de que el efecto se debiera a características propias de la cepa. Sin embargo, a los 6 y a los 10 meses disminuyó significativamente la respuesta relajante y el pD_2 a la acetilcolina en aortas SAMP8. En el caso de las ratonas SAMR1 no mostraron una pérdida significativa de la relajación a la acetilcolina hasta los 10 meses de edad, mientras que en SAMP8 la relajación fue menor a los 6 meses, disminución que se mantuvo a los 10 meses (Tabla 4 y Figura 10).

La evolución temporal de la respuesta al nitroprusiato sódico (3×10^{-9} M) se estudió en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8. El nitroprusiato sódico indujo una relajación independiente de la presencia de endotelio (Figura 11A) en todos los grupos de estudio. El pD_2 y el efecto máximo al nitroprusiato sódico no se alteraron por el envejecimiento ni por la cepa utilizada (Figura 11B).

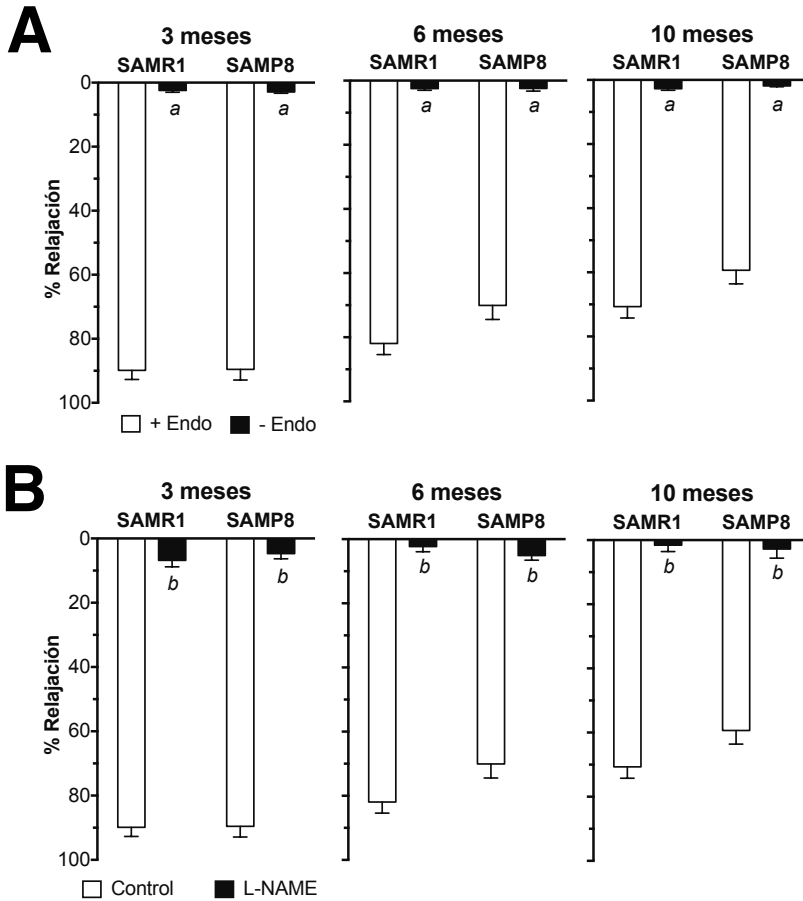


Figura 9. Relajación a la acetilcolina (10^{-6} M) en anillos arteriales de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad (A) en presencia (+ Endo) y en ausencia (- Endo) de endotelio y (B) en anillos con endotelio en ausencia (Control) y en presencia de L-NAME (10^{-4} M). Las barras representan la media \pm SEM. $n = 10$ ratonas por grupo de estudio. $^a p < 0,05$ vs, segmentos con endotelio; $^b p < 0,05$ vs. segmentos control.

Tabla 4. Valores de pD₂ y contracción máxima (Emax) de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10⁻⁹ - 10⁻⁵ M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad.

Edad	SAMR1		SAMP8	
	pD ₂	Emax (%)	pD ₂	Emax (%)
3 meses	7,80 ± 0,09	92 ± 3	7,81 ± 0,07	91 ± 3
6 meses	7,96 ± 0,09	85 ± 4	7,57 ± 0,08 [#]	72 ± 4 ^{*#}
10 meses	7,16 ± 0,08 ^{#§}	76 ± 4 ^{#§}	7,01 ± 0,09 ^{#§}	64 ± 4 ^{*#§}

Media ± SEM. n = 10 ratonas por cepa. ^{*}p<0.05 vs. ratonas SAMR1 del mismo grupo de edad; [#]p<0,05 vs ratonas de 3 meses de la misma cepa; [§]p<0,05 vs. ratonas de 6 meses de edad de la misma cepa.

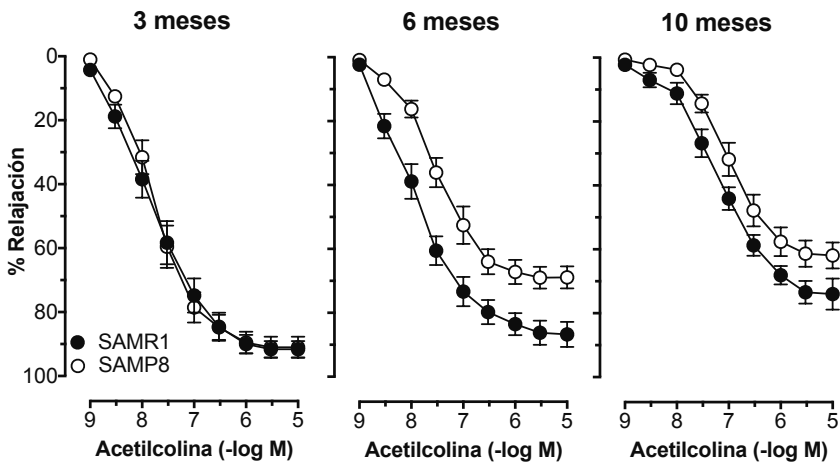


Figura 10. Curvas concentración respuesta a la acetilcolina (10⁻⁹ a 10⁻⁵ M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses precontraídos con serotonina (10⁻⁵ M). Cada punto representa la media ± SEM. n=10 ratonas por grupo de estudio.

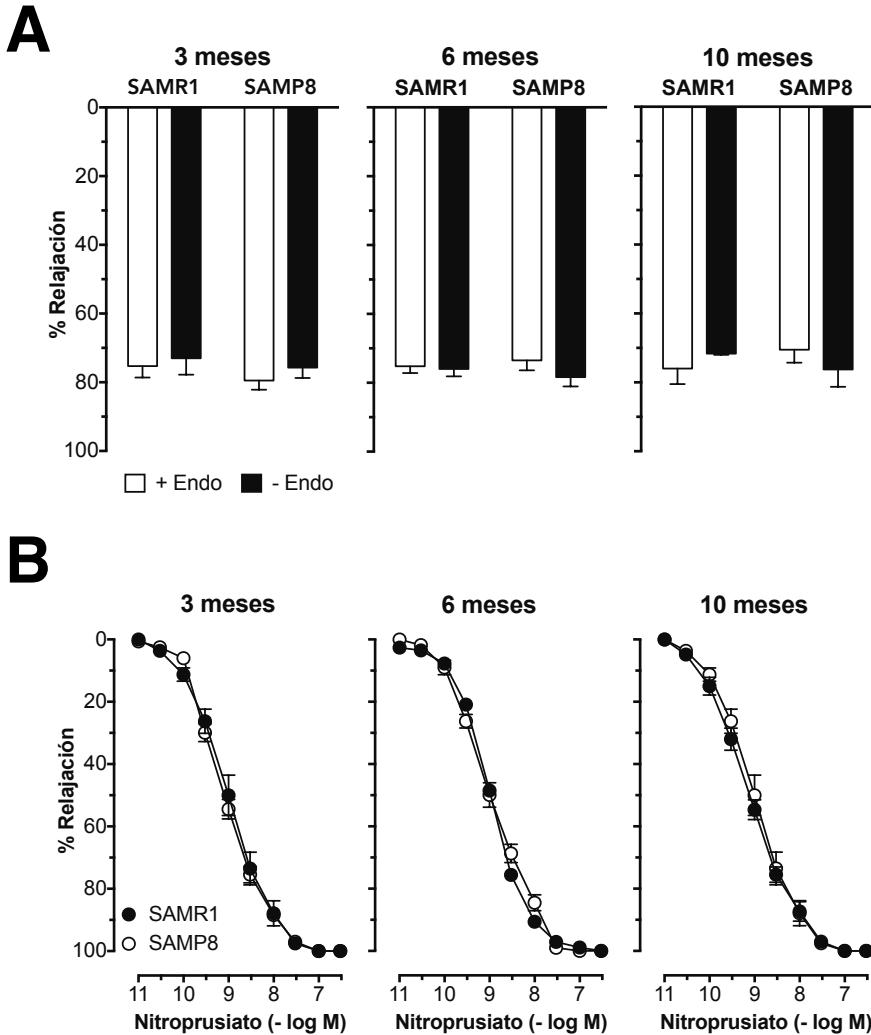


Figura 11. (A) Relajación en respuesta al nitroprusiato sódico (3×10^{-9} M) y (B) Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico (10^{-11} a 3×10^{-7} M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de 3, 6 y 10 meses de edad precontraídos con serotonina (10^{-5} M). Las barras y los puntos representan la media \pm SEM. n = 10 ratonas por grupo de estudio.

Estos resultados forman parte de la caracterización vascular del modelo de ratonas SAM e indican que mantienen un patrón de envejecimiento que se refleja en la función cardiovascular, con un aumento de la PAS y PAD, una reducción en la relajación dependiente del endotelio y un incremento de la contracción dependiente e independiente de la activación de receptor. Los resultados obtenidos concuerdan con las alteraciones vasculares asociadas a la edad descritas previamente en humanos (Taddei y cols., 1995; Davidge y cols., 1996; Barnes y cols., 2014). Por ello, nuestros resultados confirman la utilidad de este modelo murino para el estudio de las alteraciones vasculares asociadas al envejecimiento. Por otro lado, estas ratonas mantienen sus niveles de estrógenos a lo largo del periodo de tiempo estudiado y, aunque se puede considerar un modelo de envejecimiento vascular, no sería apropiado para estudiar los efectos vasculares después de la menopausia, donde además del envejecimiento se produce una disminución de los niveles de estrógenos circulantes. Por ello, se realizaron experimentos en los que se sometió a las ratonas SAMR1 y SAMP8 a la extirpación quirúrgica de los ovarios para reducir los niveles de estrógenos y poder estudiar los efectos vasculares de la menopausia.

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO MURINO DE MENOPAUSIA EXPERIMENTAL Y ENVEJECIMIENTO VASCULAR

4.2.1. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS Y BIOQUÍMICOS

Para determinar la eficacia de la ovariectomía (Ovx) y del tratamiento con estrógenos (OvE), se registró el peso uterino y los niveles de E2 circulantes, así como el peso corporal (Figura 12).

Con la ovariectomía, las ratonas mostraron una reducción significativa del peso uterino y de los niveles plasmáticos de E2 (Figura 12), demostrándose la eficacia del proceso quirúrgico. En cambio, el tratamiento con E2 previno la pérdida de masa uterina en las ratonas ovariectomizadas (Figura 12A), así como el mantenimiento de los niveles de E2 plasmáticos, que fueron similares a los presentes en las ratonas Sham (Figura 12B).

En cuanto al peso corporal, las ratonas SAMP8 registraron un peso significativamente inferior al de las ratonas SAMR1 en todos los grupos de estudio (Figura 12B). Las ratonas SAMR1 mostraron un incremento significativo del peso corporal con la ovariectomía. Este incremento del peso no se produjo en aquellas ratonas ovariectomizadas que fueron tratadas con E2. En cambio, en ratonas SAMP8 ni la ovariectomía ni el tratamiento con E2 modificó el peso corporal (Figura 12B).

Las concentraciones plasmáticas de glucosa, creatinina y bilirrubina no se modificaron entre cepas ni entre los distintos grupos de estudio (Tabla 5). Estos resultados sugieren la ausencia de alteraciones metabólicas, renales o hepáticas en todos los grupos.

Tabla 5. Parámetros bioquímicos analizados en plasma de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham, control) a la extirpación de los ovarios (Ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas tratadas con E2 (OvE).

	SAMR1	SAMP8
Glucosa (mg/dL)		
Sham	162 ± 15	169 ± 13
Ovx	177 ± 08	164 ± 10
OvE	175 ± 11	161 ± 06
Creatinina (mg/dL)		
Sham	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Ovx	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,03
OvE	0,30 ± 0,01	0,27 ± 0,02
Bilirrubina total (mg/dL)		
Sham	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Ovx	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,01
OvE	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,01

Media ± SEM. n=25 por grupo de estudio.

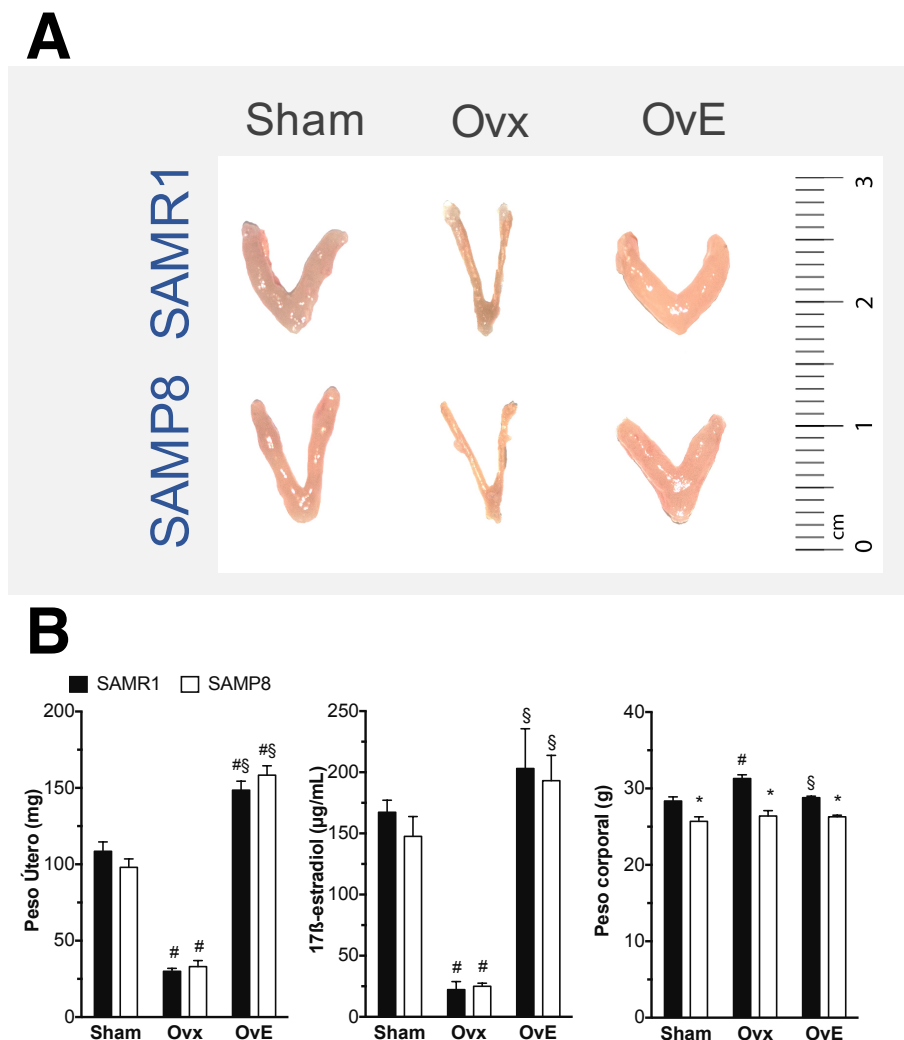


Figura 12. (A) Fotografía representativa del útero de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham), a la extirpación de los ovarios (Ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas tratadas con E2 (OvE) y **(B)** peso uterino (g), niveles plasmáticos de E2 (pg/mL) y peso corporal (g) de las ratonas de cada grupo de estudio. Las barras representan la media \pm SEM. $n = 25$ ratonas por grupo de estudio. $*p < 0,05$ vs. ratonas SAMR1 con la misma intervención quirúrgica. $\#p < 0,05$ vs. ratonas del grupo Sham de la misma cepa, $\$p < 0,05$ vs. ratonas del grupo Ovx de la misma cepa.

4.2.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA PARED ARTERIAL

Para analizar el efecto de la ovariectomía y el tratamiento con E2 sobre la organización de la pared arterial, se realizaron estudios histológicos para determinar el grosor de la aorta utilizando una tinción hematoxilina-eosina (Figura 13).

El análisis de las secciones arteriales no mostró un efecto significativo de la ovariectomía ni del tratamiento con estrógenos sobre el grosor de la pared aórtica tanto en ratonas SAMR1 como SAMP8. De la misma forma, tampoco se observaron diferencias en el grosor al comparar las ratonas SAMR1 y SAMP8 con la misma cirugía. Estos resultados sugieren que los posibles cambios en la respuesta contráctil o relajante de la aorta de ratonas SAM no pueden atribuirse a cambios en la morfología y cantidad de capas de células musculares, sino que estarían probablemente relacionados con cambios funcionales que afectarían a la pared vascular.

4.2.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA OVARIECTOMÍA Y EL TRATAMIENTO CON E2 SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR

Para evaluar el efecto conjunto del envejecimiento y la pérdida de estrógenos sobre la capacidad funcional de la aorta, se realizaron estudios de reactividad vascular en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8. En un grupo las ratonas fueron ovariectomizadas (grupo Ovx) y los resultados se compararon con el grupo de ratonas con cirugía simulada (grupo Sham). A su vez, el papel del E2 sobre la regulación de la función vascular se estudió en ratonas ovariectomizadas a las que se les administró E2 (grupos OvE).

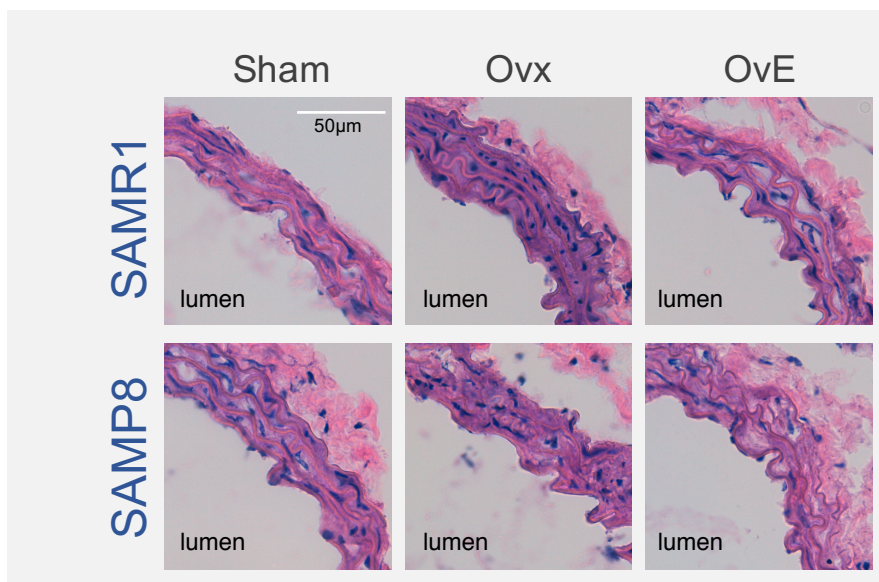
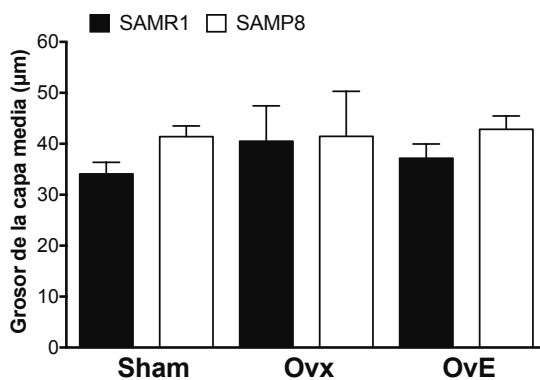
A**B**

Figura 13. (A) Microfotografías representativas (400X) de la organización estructural de la pared aórtica y (B) cuantificación del grosor de la aorta abdominal de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham) a la extirpación de los ovarios (Ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas tratadas con E2 (OvE). Cada barra representa la media \pm SEM. n = 8 aortas por grupo de estudio.

4.2.3.1. Respuesta al KCl y al U46619

Se analizó la respuesta contráctil a la despolarización de los anillos arteriales con KCl (5 - 120 mM) de cada uno de los grupos de estudio (Tabla 6 y Figura 14A). Los anillos arteriales de ratonas SAMP8 mostraron una mayor contracción que los de ratonas SAMR1 con independencia de la cirugía realizada. La contracción en ratonas SAMR1 no se modificó ni por la ovariectomía ni con el tratamiento con E2. En cambio, en las ratonas SAMP8 la ovariectomía incrementó la capacidad contráctil y el tratamiento con E2 revirtió el efecto de la ovariectomía (Tabla 6 y Figura 14A). En ningún grupo de estudio se observaron cambios en el pD_2 al KCl (Tabla 6).

Se realizaron curvas concentración respuesta al U46619 (10^{-9} - 3×10^{-7} M) para cada uno de los grupos de estudio en ratonas SAMR1 y SAMP8 (Tabla 6 y Figura 14B). Al comparar ambos grupos Sham, Ovx u OVE, las aortas de ratonas SAMP8 mostraron una pD_2 y una contracción mayor que las SAMR1.

En ratonas SAMR1 ni la ovariectomía ni el tratamiento con E2 modificaron la contracción máxima ni el pD_2 de las curvas al U46619. En cambio, en ratonas SAMP8 la ovariectomía incrementó la contracción máxima al U46619 que fue revertida por el tratamiento con E2 (Tabla 6 y Figura 14B). Estos resultados indican que la contracción al TXA_2 , aumenta con el envejecimiento y se potencia con falta de estrógenos.

Tabla 6. Valores de pD₂ y contracción máxima (Emax) de las curvas concentración-respuesta al KCl (5 - 120 mM) y al U46619 (10⁻⁹ - 3x10⁻⁷ M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham, control), a la extirpación de los ovarios (ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas y tratadas con E2 (OvE).

	KCl		U46619	
	pD ₂	Emax (mN)	pD ₂	Emax (mN)
SAMR1				
Sham	1,31 ± 0,08	5,43 ± 0,16	7,77 ± 0,10	13,63 ± 0,59
Ovx	1,35 ± 0,06	5,83 ± 0,24	7,82 ± 0,06	13,53 ± 0,59
OvE	1,24 ± 0,09	5,74 ± 0,28	7,82 ± 0,04	13,34 ± 0,49
SAMP8				
Sham	1,21 ± 0,07	7,39 ± 0,25*	8,12 ± 0,05*	15,89 ± 0,59*
Ovx	1,39 ± 0,08	9,39 ± 0,39*#	8,10 ± 0,03*	18,83 ± 0,39*#
OvE	1,27 ± 0,07	7,65 ± 0,30*§	8,11 ± 0,08*	15,79 ± 0,39*§

Media ± SEM. n=14 ratonas por grupo de estudio. *p<0,05 vs. ratonas SAMR1 con el mismo tratamiento; #p<0,05 vs ratonas Sham de la misma cepa; §p<0,05 vs. ratonas Ovx de la misma cepa.

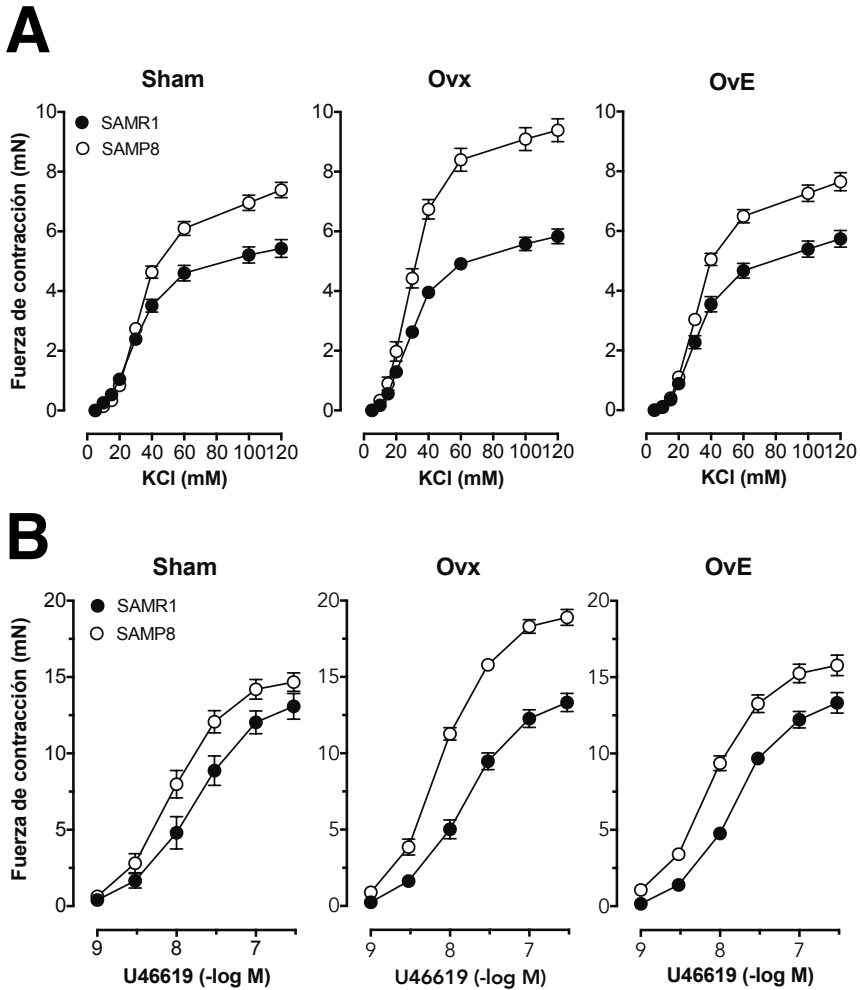


Figura 14. Curvas concentración respuesta (A) al KCl (5 - 120 mM) y (B) al U46619 (10^{-9} - 3×10^{-7} M) en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham), a la extirpación de los ovarios (ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas y tratadas con E2 (Ove). Los puntos representan la media \pm SEM. n = 8 ratonas por grupo de estudio.

4.2.3.2. Respuesta a la acetilcolina

El efecto de la ovariectomía y el tratamiento con E2 sobre la relajación dependiente de endotelio se estudió en anillos arteriales previamente contraídos con serotonina (10^{-5} M) a los que se les administró acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M).

La relajación máxima a la acetilcolina fue similar en los grupos Sham de ambas cepas, disminuyó el pD_2 en el grupo Sham SAMP8. Cuando se compararon los grupos de ratonas ovariectomizadas, en la cepa SAMP8 disminuyó tanto la relajación máxima como el pD_2 . El tratamiento con E2 revirtió el efecto de la ovariectomía, pero no el debido al envejecimiento (Tabla 7 y Figura 15).

Por otra parte, cuando se compararon los efectos de la acetilcolina en aortas de ratonas SAMR1, ni la ovariectomía ni el tratamiento con E2 modificaron la relajación a la acetilcolina. En cambio, en las ratonas SAMP8 la ovariectomía disminuyó significativamente la relajación máxima y el pD_2 , mientras que el tratamiento con E2 revirtió los efectos de la ovariectomía pero no del envejecimiento (Tabla 7 y Figura 15).

Tabla 7. Valores de pD_2 y relajación máxima (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham), a la extirpación de los ovarios (ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas y tratadas con E2 (OvE).

	SAMR1		SAMP8	
	pD_2	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)
Sham	8,31 \pm 0,13	97 \pm 2	7,91 \pm 0,12*	94 \pm 3
Ovx	8,12 \pm 0,09	99 \pm 1	7,30 \pm 0,10*#	84 \pm 4*#
OvE	8,17 \pm 0,10	97 \pm 1	7,73 \pm 0,06*§	96 \pm 4§

Media \pm SEM. n=14 ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. grupo SAMR1 con el mismo tratamiento, # $p < 0,05$ vs. grupo Sham de la misma cepa y § $p < 0,05$ vs. grupo Ovx de la misma cepa.

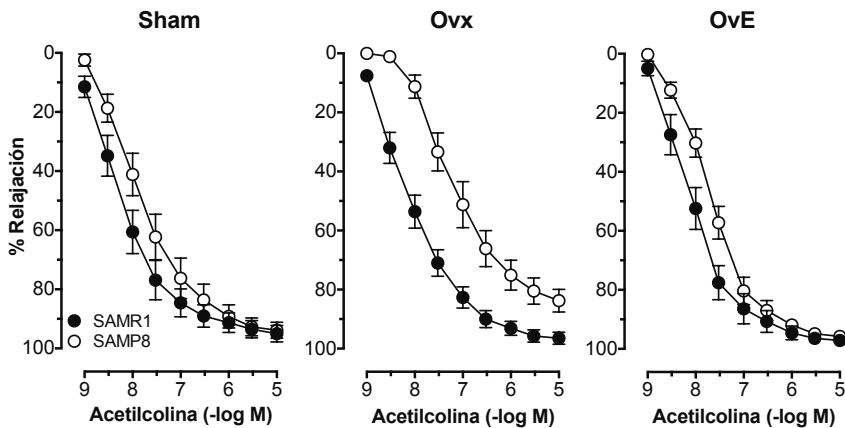


Figura 15. Curvas concentración respuesta a la acetilcolina (10^{-9} a 10^{-5} M) de anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 sometidas a intervención quirúrgica simulada (Sham), a la extirpación de los ovarios (Ovariectomía, Ovx) y ovariectomizadas y tratadas con E2 (OvE). Los puntos representan la media \pm SEM. n = 8 ratonas por grupo de estudio.

4.3. PAPEL DE LA NOS Y LA COX EN LA CONTRACCIÓN AL U46619

Según lo observado hasta el momento, el envejecimiento asociado a la falta de estrógenos incrementa la contracción al TXA₂. Para evaluar la participación del NO y de las sustancias derivadas de la COX se incubó con L-NAME (10⁻⁴ M) e indometacina (10⁻⁵ M), respectivamente.

4.3.1. INHIBICIÓN DE LA NOS EN LA CONTRACCIÓN AL U46619

El L-NAME indujo un incremento significativo de la respuesta máxima al U46619 en anillos arteriales de los grupos Sham (Tabla 8 y Figura 16A). En el grupo Sham SAMR1 el L-NAME aumentó el pD₂, efecto que no se observó en el grupo Sham SAMP8. En cambio, en los anillos arteriales de los grupos Ovx el L-NAME no modificó ni la contracción máxima ni el pD₂ (Tabla 8). Estos resultados sugieren la participación del NO dependiente de hormonas ováricas en la contracción al TXA₂. En anillos arteriales de ratonas OvE el L-NAME incrementó significativamente la respuesta máxima al U46619, aunque este aumento fue menor en las SAMP8 (Tabla 8 y Figura 16A). Estos resultados sugieren que el E2 aumenta la biodisponibilidad del NO en respuesta al estímulo de los receptores del TXA₂.

Para una mejor valoración de la contribución del NO en la respuesta al U46619, se determinó la diferencia del área bajo la curva (Δ ABC) de las curvas concentración respuesta al U46619 en presencia y ausencia de L-NAME (Figura 16B). Estos resultados corroboran la participación del NO en respuesta al U46619 en ratonas Sham y OvE, si bien en las SAMP8 esta participación es menor, efecto probablemente debido a la senescencia acelerada de la cepa (Tabla 8 y Figura 16A).

Tabla 8. Valores de pD₂ y contracción máxima (Emax) al U46619 en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx, y OvE), en ausencia (Control) y en presencia de L-NAME (10⁻⁴ M), indometacina (10⁻⁵ M) o L-NAME más indometacina.

	SAMR1		SAMP8	
	pD ₂	Emax (mN)	pD ₂	Emax (mN)
Sham				
Control	7,77 ± 0,10	13,63 ± 0,59	8,12 ± 0,05*	15,89 ± 0,59*
L-NAME	8,21 ± 0,06 ^a	16,63 ± 0,59 ^a	8,25 ± 0,04	18,14 ± 0,59 ^a
Indometacina	7,61 ± 0,09	11,96 ± 0,69	7,72 ± 0,08 ^a	15,69 ± 0,88
L-NAME + Indometacina	7,70 ± 0,06	14,12 ± 0,29	8,10 ± 0,06 ^b	14,61 ± 0,39
Ovx				
Control	7,82 ± 0,06	13,53 ± 0,59	8,10 ± 0,03*	18,83 ± 0,39* [#]
L-NAME	7,92 ± 0,07	13,63 ± 0,59	8,15 ± 0,06	18,86 ± 0,59
Indometacina	7,40 ± 0,06 ^a	10,79 ± 0,59 ^a	7,67 ± 0,06 ^a	14,71 ± 0,69 ^a
L-NAME ± Indometacina	7,70 ± 0,09 ^b	13,63 ± 0,49 ^b	8,06 ± 0,12 ^b	18,14 ± 0,78 ^b
OvE				
Control	7,82 ± 0,04	13,34 ± 0,49	8,11 ± 0,04*	15,79 ± 0,39* [§]
L-NAME	8,06 ± 0,08 ^a	17,26 ± 0,88 ^a	8,17 ± 0,07	18,04 ± 0,69 ^a
Indometacina	7,71 ± 0,06	12,06 ± 0,69	7,73 ± 0,04 ^a	16,18 ± 0,69
L-NAME + Indometacina	7,75 ± 0,06	13,24 ± 0,59	8,04 ± 0,07 ^b	15,20 ± 0,39

Media ± SEM. n=8 ratonas por grupo de estudio. **p* < 0,05 vs. grupo SAMR1 con el mismo tratamiento y cirugía, [#]*p* < 0,05 vs. grupo Sham de la misma cepa y tratamiento; [§]*p* < 0,05 vs. grupo Ovx de la misma cepa y tratamiento; ^a*p* < 0,05 vs. Control de la misma cepa y cirugía; ^b*p* < 0,05 vs tratados con indometacina de la misma cepa y cirugía.

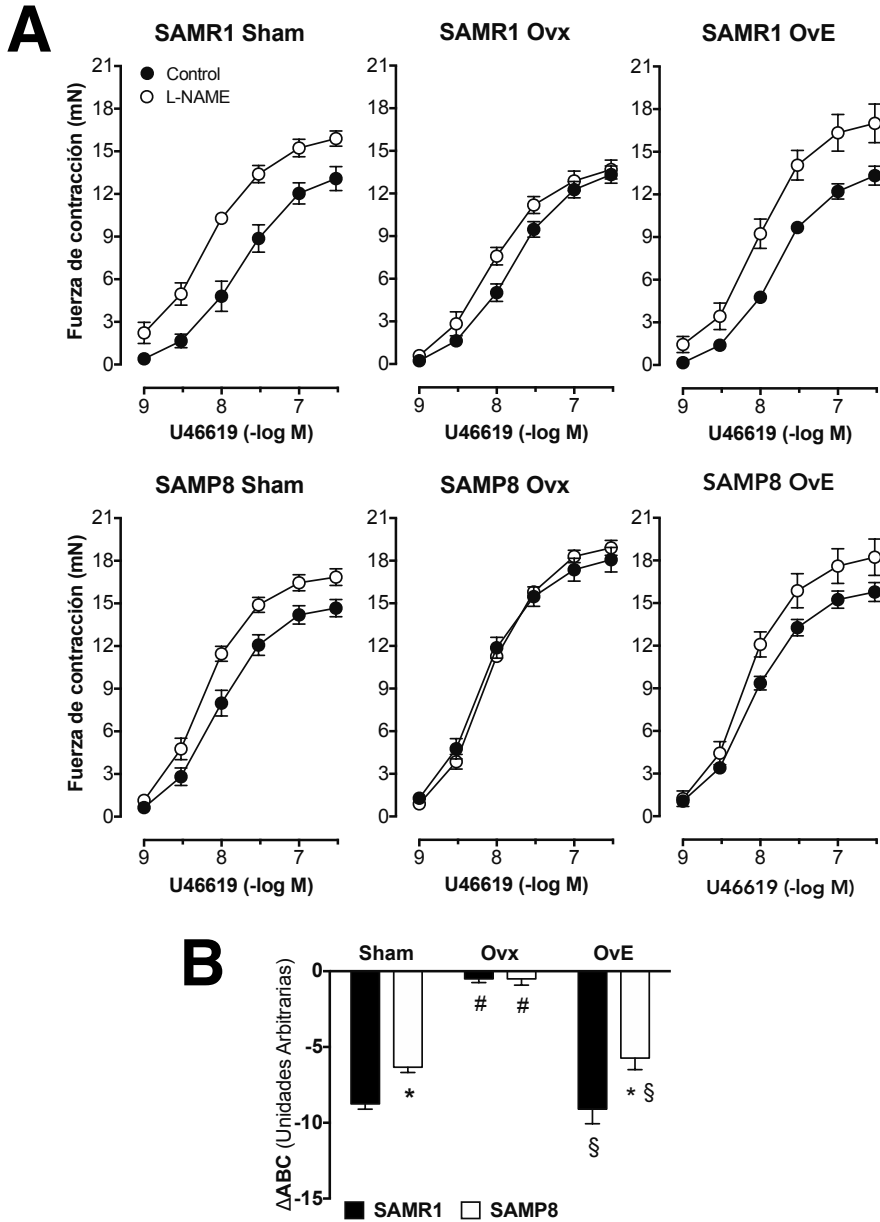


Figura 16. (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de L-NAME (10^{-4} M). Los puntos y las barras representan la media \pm SEM. $n=8$ ratonas por grupo de estudio. * $p<0,05$ vs. SAMR1 con la misma cirugía. # $p<0,05$ vs. grupo Sham de la misma cepa. § $p<0,05$ vs. grupo Ovx de la misma cepa.

4.3.2. INHIBICIÓN DE LA COX EN LA CONTRACCIÓN AL U46619

La indometacina (10^{-5} M), un inhibidor inespecífico de la COX, no modificó significativamente la contracción al U46619 en aorta de ratonas Sham SAMR1. Sin embargo, en las ratonas Sham SAMP8 disminuyó el pD_2 sin modificar la máxima contracción (Tabla 8 y Figura 17A), lo que sugiere una participación de sustancias contráctiles derivadas de la COX en la respuesta al U46619 asociada al envejecimiento. En los grupos Ovx la indometacina disminuyó el pD_2 y E_{max} en las ratonas SAMR1 y SAMP8 (Tabla 8 y Figura 17A). En ratonas ovariectomizadas y tratadas con E2 (OvE) la indometacina no modificó la contracción al U46619 en SAMR1 y disminuyó el pD_2 en SAMP8 (Tabla 8 y Figura 17A). Estos resultados indican que en la contracción al TXA_2 además del envejecimiento, la ausencia de estrógenos también incrementaría la liberación de sustancias vasoconstrictoras derivadas de la COX.

Mediante el análisis del ABC en ausencia y en presencia de indometacina se observó un incremento en la participación de las sustancias contráctiles derivadas de la COX en las ratonas SAMP8, incremento que podría estar asociado a la senescencia acelerada característica de estas ratonas. Esta participación aumentó en las ratonas ovariectomizadas, especialmente en las SAMP8 donde converge el envejecimiento y la falta de estrógenos. El tratamiento con E2 revirtió el efecto de la ovariectomía (Figura 17B).

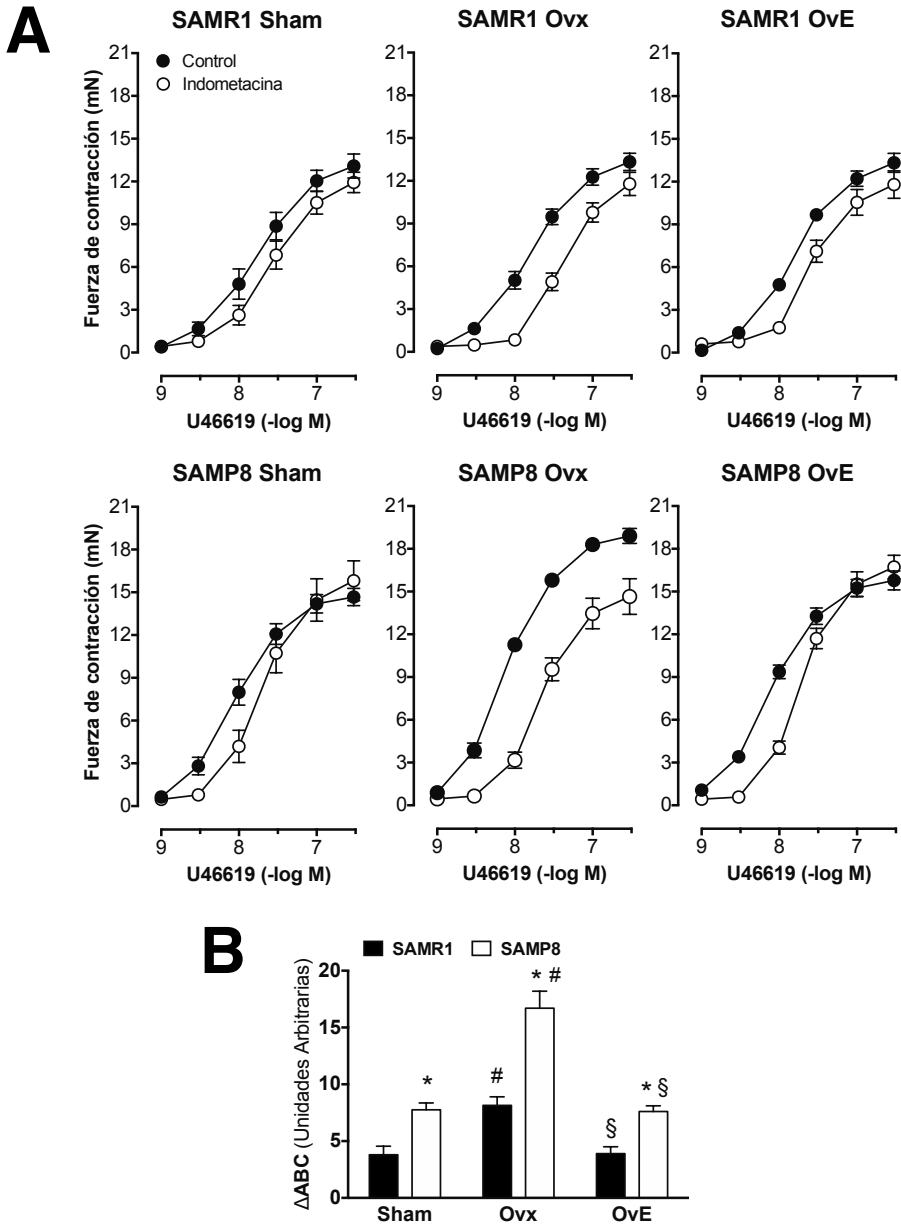


Figura 17. (A) Curvas concentración respuesta y **(B)** diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de indometacina (10^{-5} M). Los puntos y las barras representan la media \pm SEM. $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. SAMR1 con la misma cirugía. # $p < 0,05$ vs. grupo Sham de la misma cepa. § $p < 0,05$ vs. grupo Ovx de la misma cepa.

4.3.3. INHIBICIÓN CONJUNTA DE LA NOS Y LA COX EN LA CONTRACCIÓN AL U46619

El estudio de la participación conjunta de la NOS y la COX durante el envejecimiento y la menopausia se realizó mediante la incubación simultánea con L-NAME (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M) previa a la realización de las curvas concentración-respuesta al U46619.

En todos los grupos de ratonas estudiados, la incubación con L-NAME e indometacina no modificó el pD_2 ni el E_{max} de las curvas contracción respuesta al U46619 con respecto a sus correspondientes curvas control (Tabla 8 y Figura 18A). El análisis del ABC en ausencia y en presencia de L-NAME e indometacina tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio (Figura 18B).

En conjunto, los resultados mostrados sugieren que el NO parece contrarrestar a los mediadores contráctiles derivados de la COX en aorta de los grupos Sham y OvE. Sin embargo, en ratonas ovariectomizadas la participación del NO sólo se pone de manifiesto en presencia de indometacina, sugiriendo que la ausencia de estrógenos induce la formación de sustancias derivadas de las COX que reducirían la biodisponibilidad del NO.

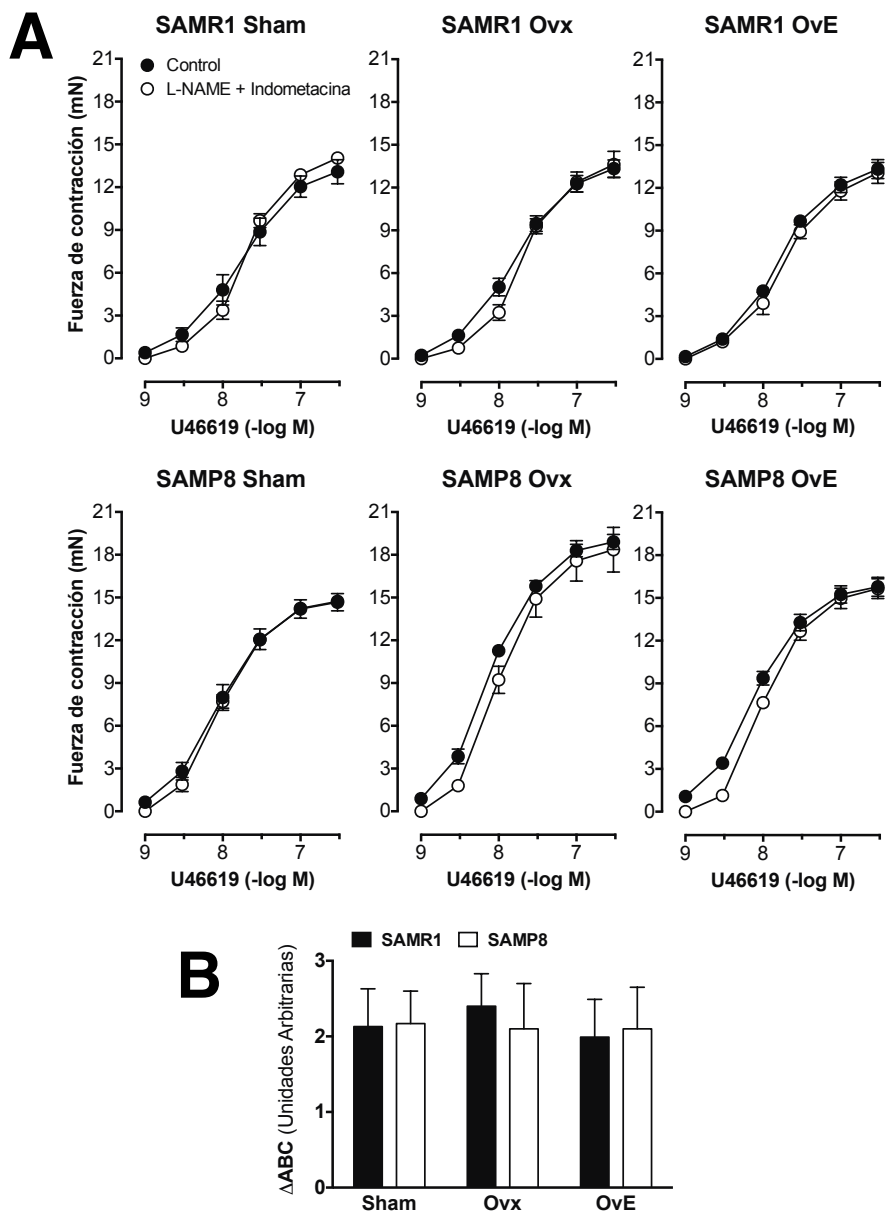


Figura 18. (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de L-NAME (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M). Los puntos y las barras representan la media \pm SEM. $n = 8$ ratonas por grupo de estudio.

4.3.4. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO Y MENOPAUSIA EXPERIMENTAL EN LA PRODUCCIÓN DE ANIONES SUPERÓXIDO

El envejecimiento se asocia a un incremento en los niveles de moléculas oxidativas frente a aquellas que poseen un carácter antioxidante. Una de las especies reactivas de oxígeno con más relevancia a nivel vascular es el anión superóxido (O_2^-). Por ello se determinaron los efectos del envejecimiento y/o la falta de estrógenos sobre los niveles de O_2^- en secciones aórticas de ratonas SAMR1 y SAMP8 tratadas con DHE, que emite fluorescencia tras reaccionar con O_2^- .

En aortas de ratonas SAMR1 las diferentes cirugías no modificaron los niveles basales de O_2^- . En ratonas SAMP8 la ovariectomía aumentó los niveles basales de O_2^- , incremento que fue revertido con el tratamiento con E2. Cuando se compararon las dos cepas con la misma cirugía, se observó un incremento basal de O_2^- en ratonas SAMP8 (Figura 19).

La incubación con U46619 (10^{-8} M) incrementó los niveles de O_2^- en todos los grupos de estudio, siendo este incremento mayor en las ratonas SAMP8. La ovariectomía potenció el efecto del U46619 sobre los niveles de O_2^- . En ambas cepas de ratonas ovariectomizadas, el tratamiento con E2 disminuyó los niveles de O_2^- a niveles similares a los obtenidos en ratonas Sham (Figura 19).

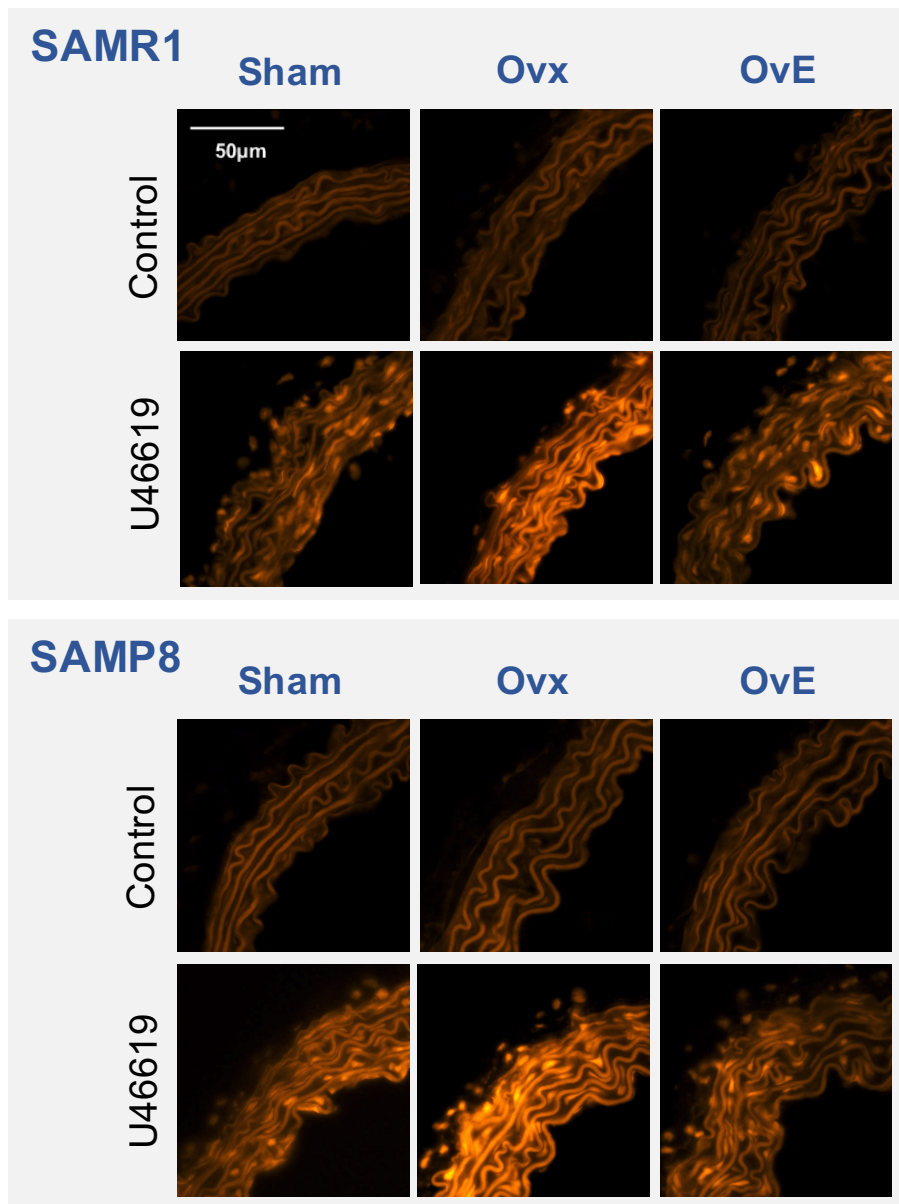


Figura 19A. Imágenes representativas de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) en ausencia (Control) y presencia de U46619 (10^{-8} M).

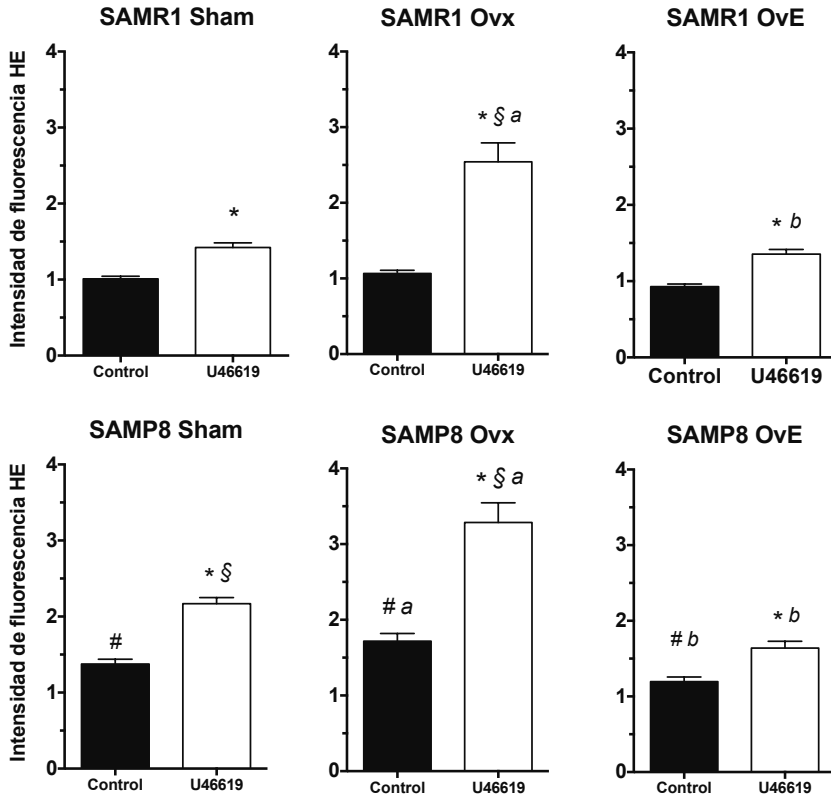


Figura 19B. Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) en ausencia (Control) y presencia de U46619 (10^{-8} M). Las barras representan la media \pm SEM, como U.A. relativizadas a SAMR1 Sham (Control). $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. Control de la misma cepa y cirugía; # $p < 0,05$ vs. SAMR1 Control con la misma cirugía; § $p < 0,05$ vs. SAMR1 U46619 con la misma cirugía; ^a $p < 0,05$ vs. grupo Sham de la misma cepa y tratamiento; ^b $p < 0,05$ vs. grupo Ovx de la misma cepa y tratamiento.

A continuación, se diseñaron una serie de experimentos para corroborar que el incremento de fluorescencia de las muestras estaba mediado por el O_2^- y para determinar el origen del mismo. Para ello, se utilizó tempol, un mimético de la superóxido dismutasa que elimina el de O_2^- ; GR32191B, un antagonista del receptor TP; apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa (NOX) e indometacina, como inhibidor de la COX. Para una mejor comprensión de los resultados, las imágenes que se muestran en las Figuras son las representativas de la respuesta al U46619 en ausencia y en presencia de los inhibidores. No obstante, en las gráficas de cuantificación de intensidad de la fluorescencia se muestran además los resultados de las secciones arteriales control (no tratadas con U46619) en ausencia y en presencia de estos inhibidores.

La incubación con tempol (10^{-3} M) redujo significativamente la señal a la HE, lo que indica que los niveles basales de fluorescencia eran debidos al O_2^- (Figura 20A). En presencia de tempol, el U46619 (10^{-8} M) no modificó los niveles de fluorescencia en ningún grupo experimental, lo que confirma que el U46619 incrementa los niveles de O_2^- (Figura 20B).

Por otra parte, la incubación con el antagonista del receptor TP GR32191B (10^{-7} M), no modificó los niveles basales de O_2^- en ninguno de los grupos estudiados, pero inhibió el incremento de O_2^- causado por el U46619 (Figura 21). Estos resultados indican que el incremento de O_2^- se produce a través de la activación de su receptor TP.

Los niveles basales de O_2^- no se modificaron con la incubación previa con apocinina (3×10^{-3} M) en ningún grupo de estudio (Figura 22B). En secciones de aorta de ratonas SAMR1, la apocinina no modificó los niveles de O_2^- inducidos por el U46619 (Figura 22). Sin embargo, en las ratonas SAMP8 la apocinina inhibió aproximadamente un 20 % la producción de O_2^- inducido por el U46619 en las ratonas Sham, inhibición que se mantuvo en las ratonas ovariectomizadas. El tratamiento con E2 eliminó la participación

de la NOX en la producción de O_2^- inducido por el U46619 (Figura 22). Estos resultados indican que además de la NOX hay otras fuentes de O_2^- . Por tanto, se estudió la posible participación de la COX.

La incubación con indometacina (10^{-5} M) no modificó los niveles basales de O_2^- en ningún grupo de estudio (Figura 23), pero inhibió el incremento de O_2^- inducido por el U46619. Estos resultados sugieren que la COX no participa en la producción basal de O_2^- , aunque sería responsable del incremento de los niveles de O_2^- inducido por el U46619 y de sus variaciones por el envejecimiento y la pérdida de estrógenos.

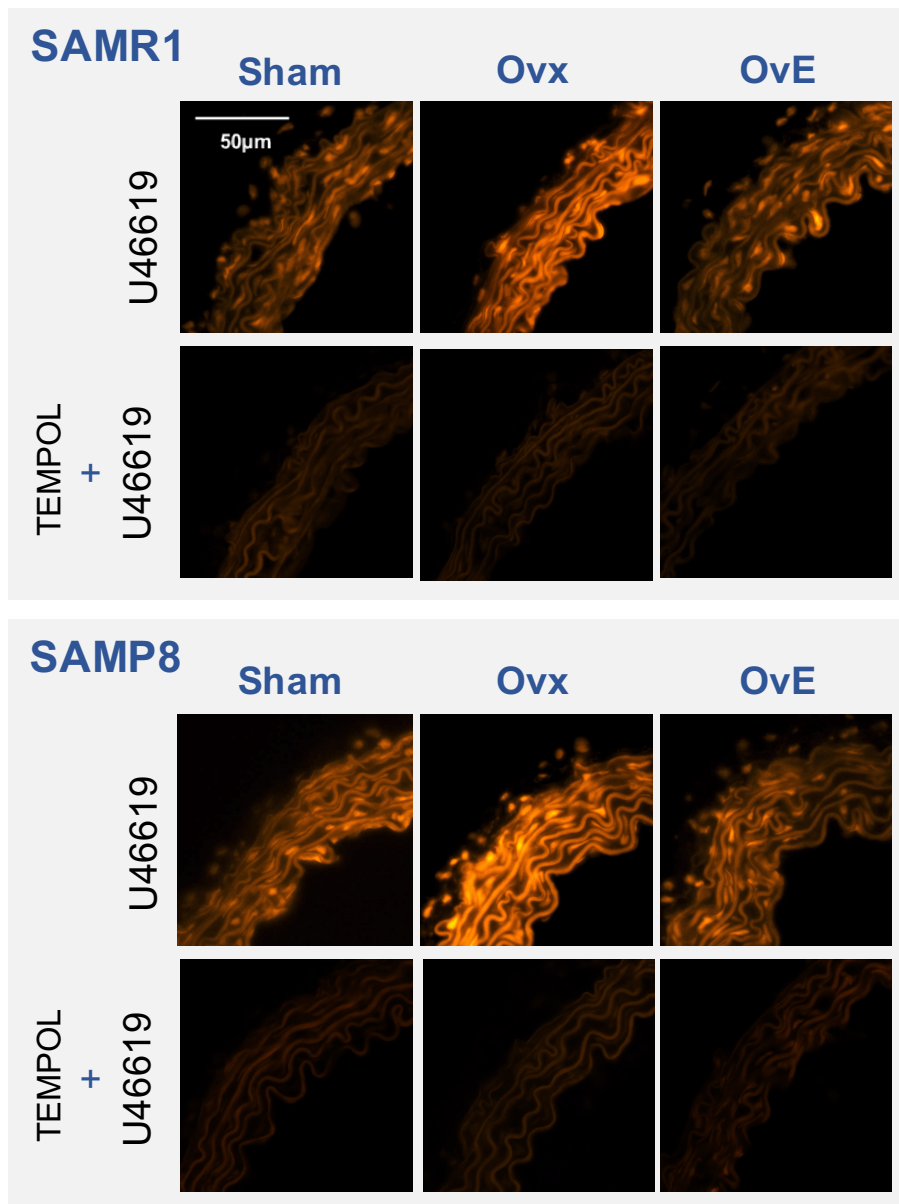


Figura 20A. Imágenes representativas de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de tempol (10^{-3} M).

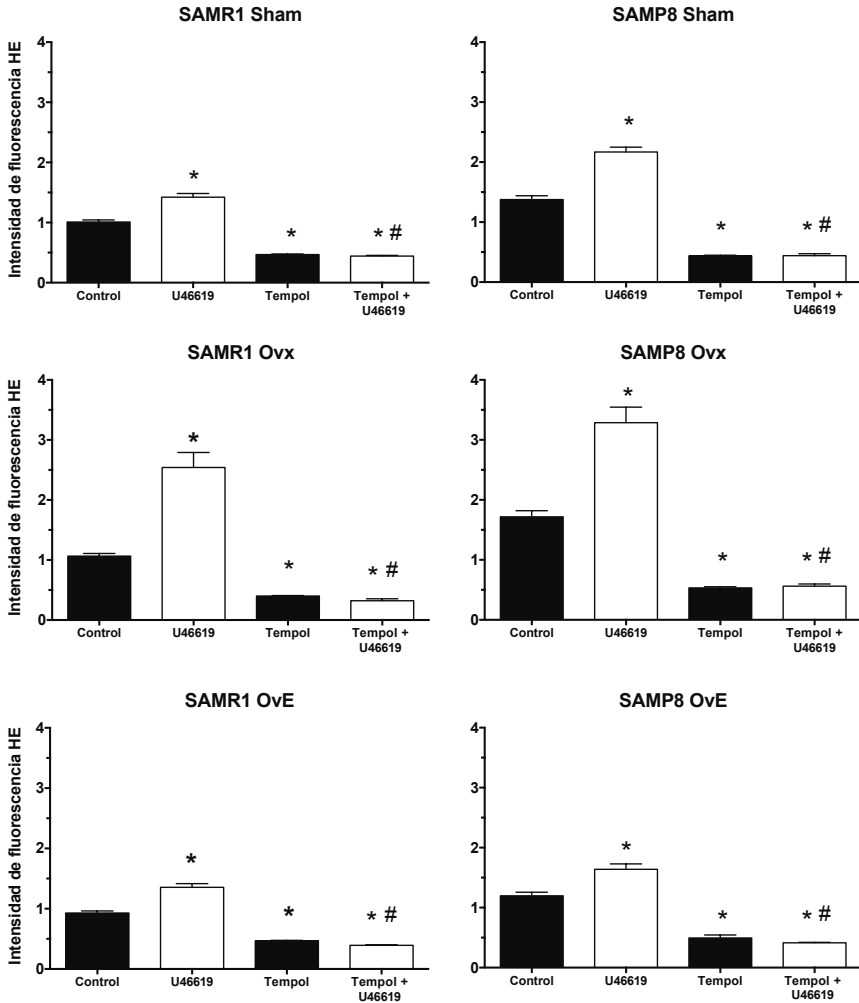


Figura 20B. Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y Ove), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de tempol (10^{-3} M). Las barras representan la media \pm SEM, como U.A. relativizadas a SAMR1 Sham (Control). $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. Control de la misma cepa y cirugía; # $p < 0,05$ vs. tratadas con U46619 de la misma cepa y cirugía.

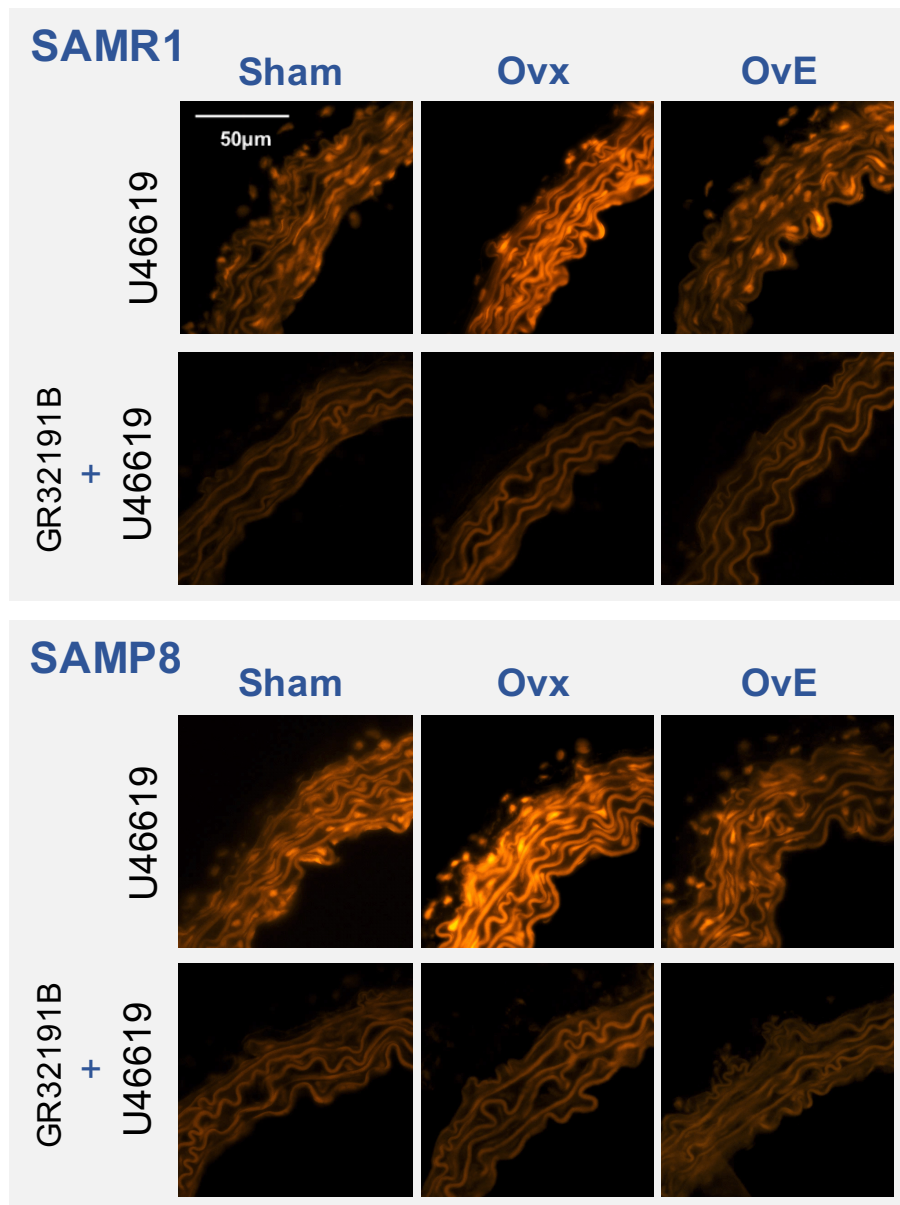


Figura 21A. Imágenes representativas de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de GR32191B (10^{-7} M).

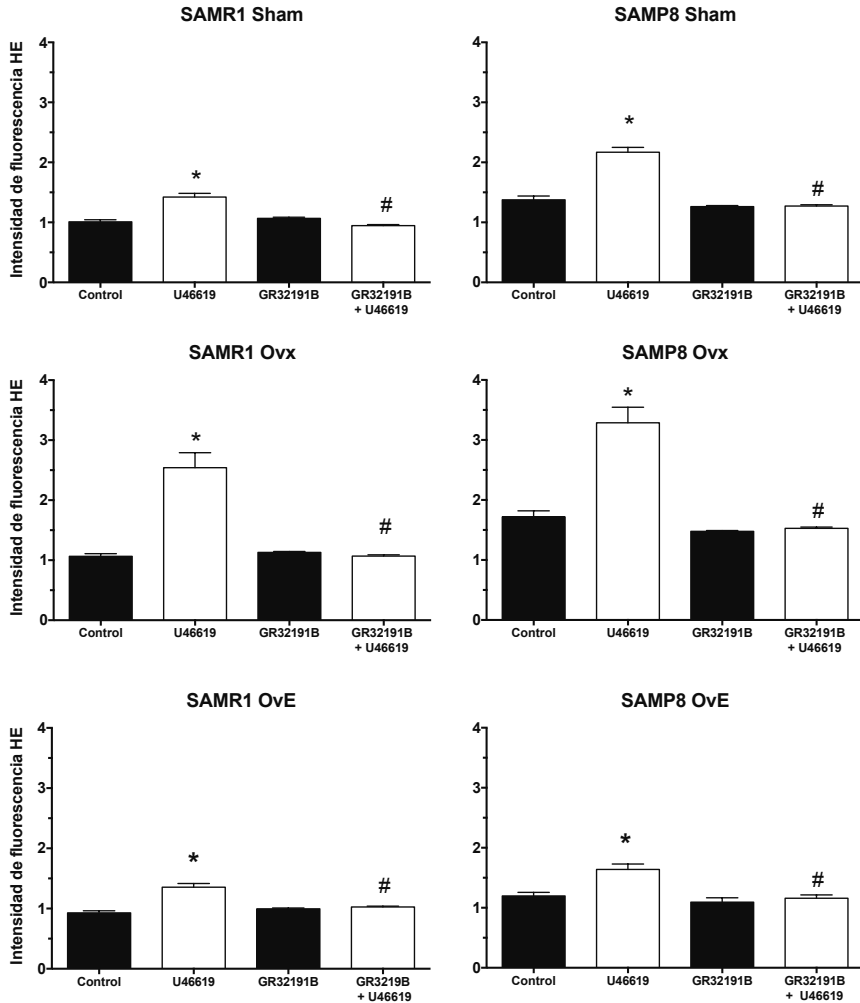


Figura 21B. Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de GR32191B (10^{-7} M). Las barras representan la media \pm SEM, como U.A. relativizadas a SAMR1 Sham (Control). $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. Control de la misma cepa y cirugía; # $p < 0,05$ vs. tratadas con U46619 de la misma cepa y cirugía.

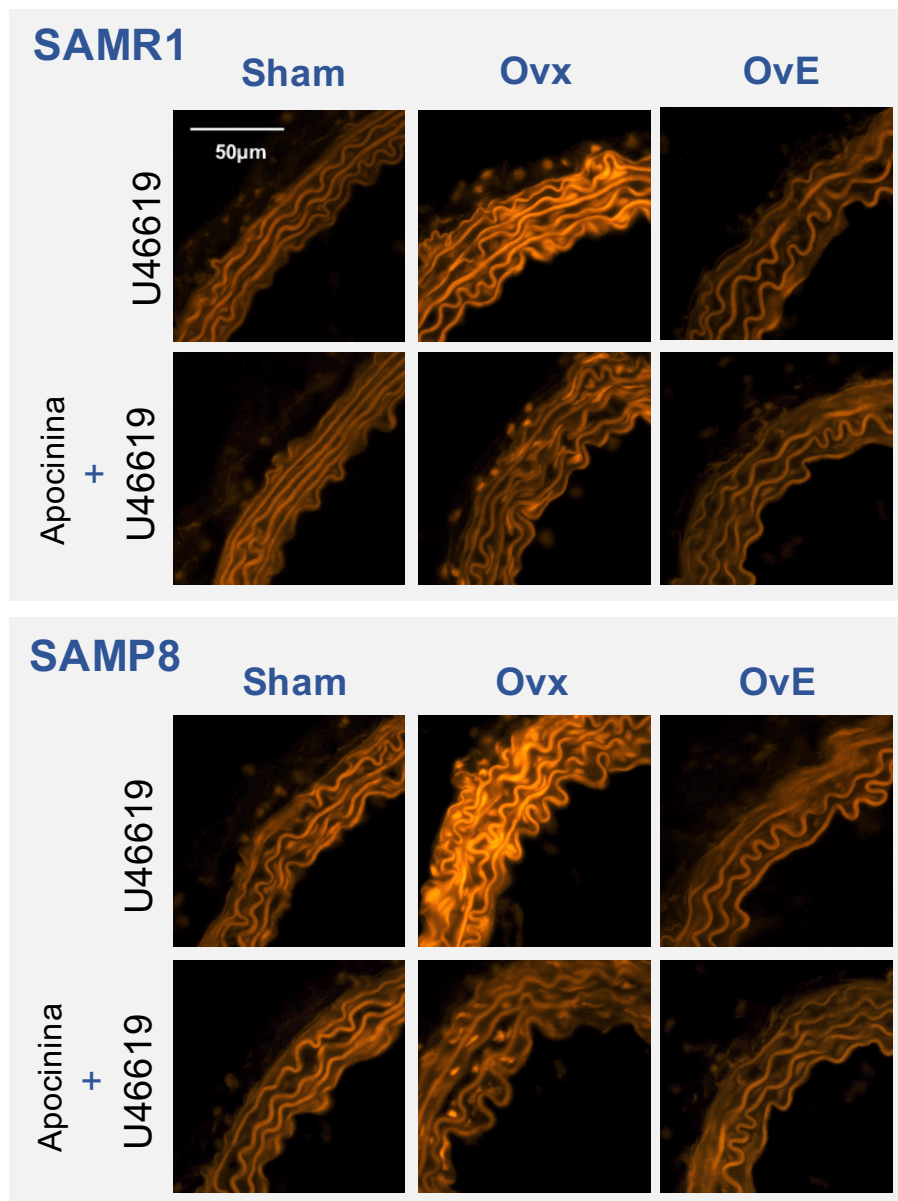


Figura 22A. Imágenes representativas de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de apocinina (3×10^{-3} M).

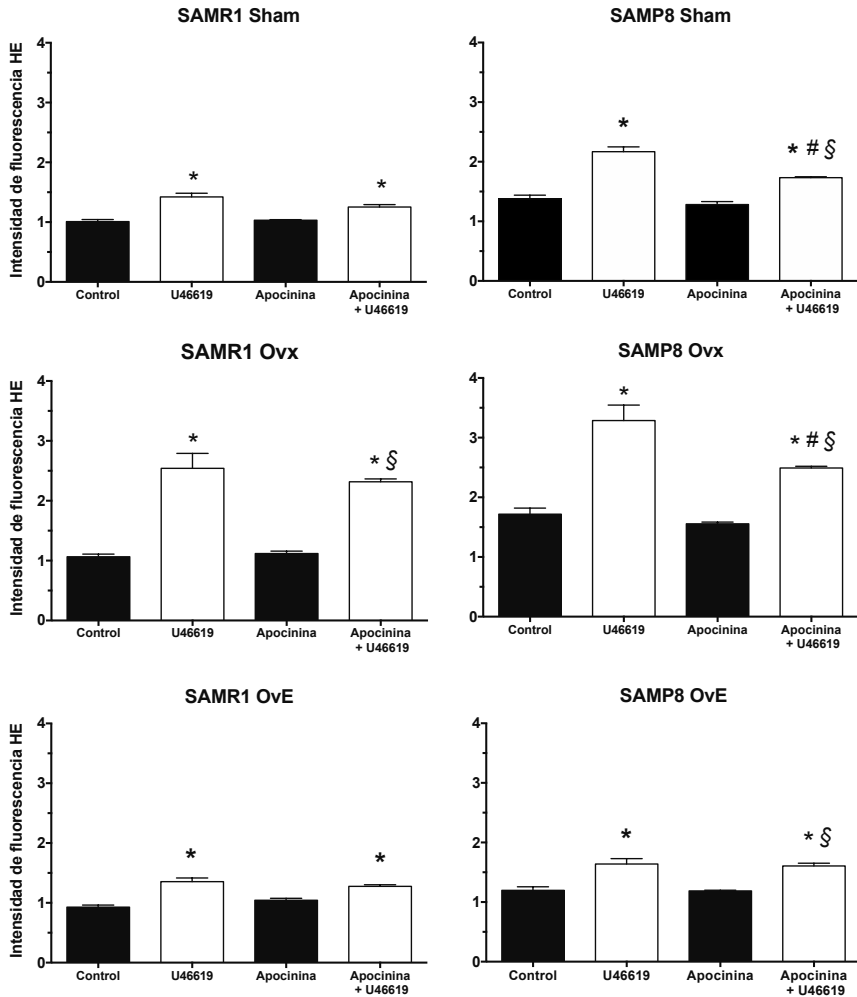


Figura 22B. Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y Ove), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de apocinina (3×10^{-3} M). Las barras representan la media \pm SEM, como U.A. relativizadas a SAMR1 Sham (Control). $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. Control de la misma cepa y cirugía; # $p < 0,05$ vs. tratadas con U46619 de la misma cepa y cirugía; § $p < 0,05$ vs. tratadas con apocinina de la misma cepa y cirugía.

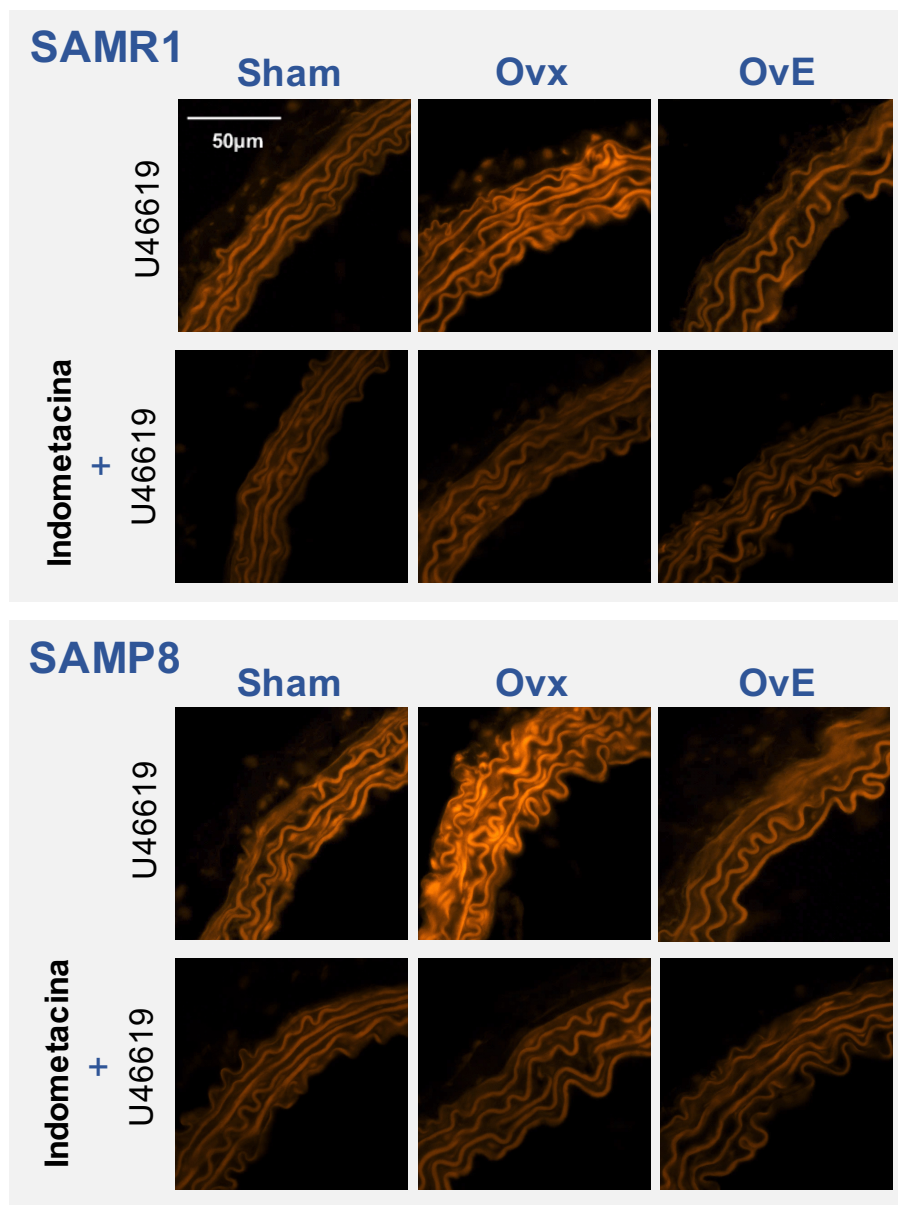


Figura 23A. Imágenes representativas de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10⁻⁸ M) en ausencia y en presencia de indometacina (10⁻⁵ M).

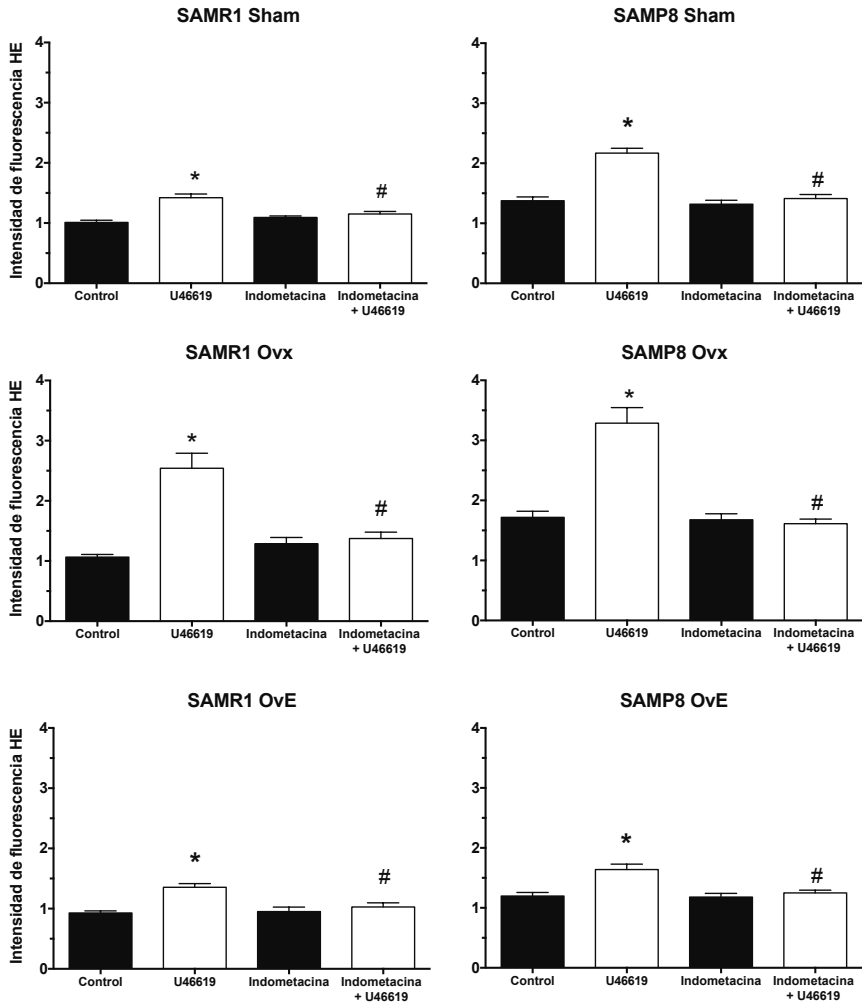


Figura 23B. Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y Ove), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de indometacina (10^{-5} M). Las barras representan la media \pm SEM, como U.A. relativizadas a SAMR1 Sham (Control). $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. Control de la misma cepa y cirugía; # $p < 0,05$ vs. tratadas con U46619 de la misma cepa y cirugía.

4.4. CONTRIBUCIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA COX A LA RESPUESTA VASCULAR AL U46619

Una vez comprobada la implicación de la COX en la respuesta vascular al TXA₂ y su alteración con el envejecimiento y falta de estrógenos, el siguiente objetivo fue determinar la implicación de la COX-1 y COX-2. Para cada una de ellas, se analizó su participación en la respuesta al U46619, su interacción con el NO y con la producción de O₂⁻.

4.4.1. PAPEL DE LA COX-1 EN LA CONTRACCIÓN AL U46619 Y LA BIODISPONIBILIDAD DEL NO

El inhibidor de la COX-1, SC560 (10⁻⁷ M), no modificó la contracción al U46619 en ningún grupo (Tabla 9 y Figura 24A). De la misma forma, no modificó la diferencia entre las áreas bajo la curva (ABC) en presencia de SC560 (Figura 24B).

La participación de la COX-1 en la modulación del NO en respuesta al U46619 se comprobó mediante la incubación conjunta de ambos inhibidores, SC560 y L-NAME. Tanto en ratonas SAMR1 como en SAMP8, la inhibición conjunta de COX-1 y NOS, aumentó la máxima contracción y el pD₂ al U46619 (Tabla 9). En los grupos Sham y OvE, este efecto fue similar al observado sólo en presencia de L-NAME (Figura 16). Sin embargo, en ratonas ovariectomizadas donde el L-NAME y SC560 por separado (Figura 16 y 24, respectivamente) no modificaron la contracción al U46619, la presencia de los dos inhibidores sí incrementó el Emax, lo que deja al descubierto la interacción entre COX-1 y NOS (Tabla 9 y Figura 25A). Sin embargo, la inhibición de ambas enzimas no revirtió los efectos del envejecimiento sobre la contracción al U46619, al mantenerse las diferencias en el ABC entre SAMR1 y SAMP8 con las diferentes cirugías (Figura 25B).

Tabla 9. Valores de pD₂ y contracción máxima (Emax) al U46619 en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx, y OvE), en ausencia (Control) y en presencia de L-NAME (10⁻⁴ M), SC560 (10⁻⁷ M) o L-NAME más SC560.

	SAMR1		SAMP8	
	pD ₂	Emax (mN)	pD ₂	Emax (mN)
Sham				
Control	7,78 ± 0,12	13,08 ± 0,86	8,20 ± 0,09*	15,89 ± 0,65*
L-NAME	8,22 ± 0,10 ^a	15,90 ± 0,55 ^a	8,40 ± 0,06	18,16 ± 0,44 ^a
SC560	7,67 ± 0,07	12,65 ± 0,36	8,16 ± 0,08	16,55 ± 0,67
L-NAME + SC560	8,14 ± 0,08 ^{ab}	16,47 ± 0,90 ^{ab}	8,43 ± 0,05 ^b	19,10 ± 0,21 ^{ab}
Ovx				
Control	7,83 ± 0,08	13,32 ± 0,61	8,18 ± 0,05*	18,90 ± 0,53* [#]
L-NAME	8,13 ± 0,10	13,69 ± 0,68	8,32 ± 0,08	19,30 ± 0,86
SC560	7,72 ± 0,10	13,00 ± 0,73	8,18 ± 0,06	19,10 ± 0,75
L-NAME + SC560	8,16 ± 0,06 ^{ab}	16,60 ± 0,47 ^{abc}	8,30 ± 0,12	20,11 ± 0,76 ^b
OvE				
Control	7,82 ± 0,04	13,31 ± 0,68	8,16 ± 0,08*	16,05 ± 0,45* [§]
L-NAME	8,09 ± 0,05 ^a	17,90 ± 0,99 ^a	8,30 ± 0,09	18,34 ± 0,38 ^a
SC560	7,68 ± 0,08	14,51 ± 0,71	8,15 ± 0,08 ^a	15,80 ± 0,75
L-NAME + SC560	8,09 ± 0,07 ^{ab}	17,69 ± 0,81 ^{ab}	8,20 ± 0,11	18,24 ± 0,60 ^{ab}

Media ± SEM. n = 8 ratonas por grupo de estudio. *p < 0,05 vs. grupo SAMR1 con el mismo tratamiento y cirugía; #p < 0,05 vs. grupo Sham de la misma cepa y tratamiento; §p < 0,05 vs. grupo Ovx de la misma cepa y tratamiento; ^ap < 0,05 vs. Control de la misma cepa y cirugía; ^bp < 0,05 vs tratados con SC560 de la misma cepa y cirugía.

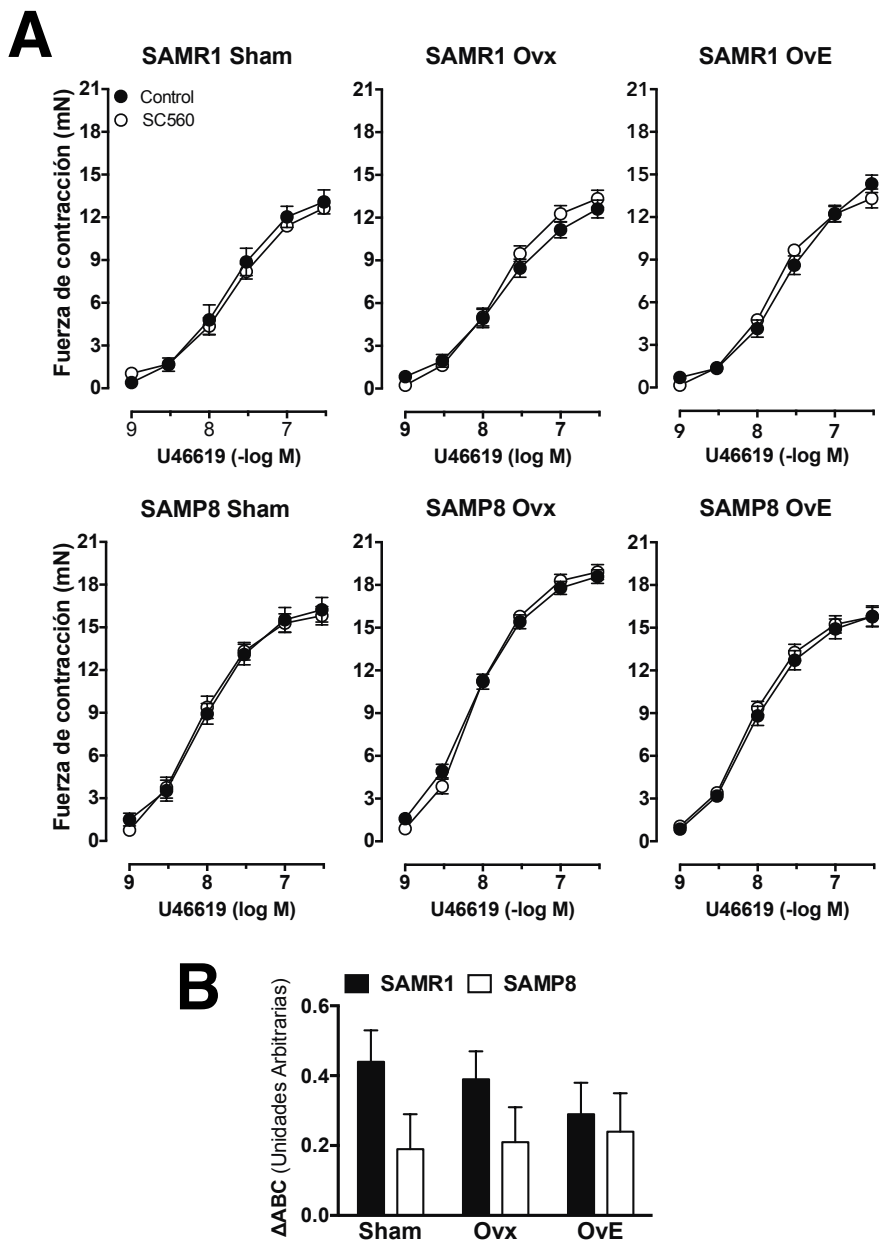


Figura 24. (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de SC560 (10^{-7} M). Los puntos y las barras representan la media \pm SEM. n = 8 ratonas por grupo de estudio.

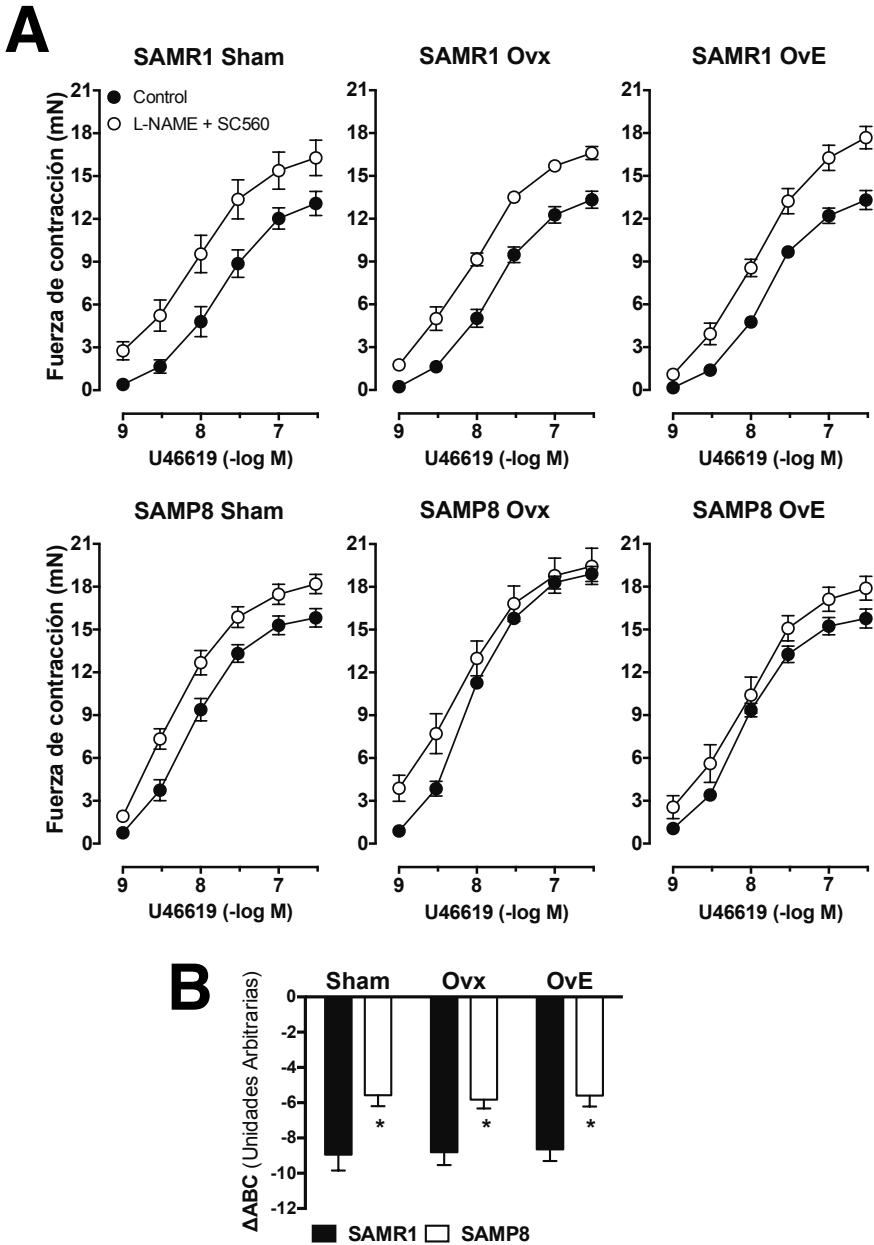


Figura 25. (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (Δ ABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, OvX y OvE), en ausencia (Control) y presencia de SC560 (10^{-7} M) y L-NAME (10^{-4} M). Los puntos y las barras representan la media \pm SEM. $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. SAMR1 con la misma cirugía.

4.4.2. PAPEL DE LA COX-2 EN LA CONTRACCIÓN AL U46619 Y LA BIODISPONIBILIDAD DEL NO

La inhibición de la COX-2 con celecoxib (10^{-5} M) disminuyó la respuesta contráctil al U46619 en todos los grupos de estudio (Tabla 10 y Figura 26A). El ABC en presencia y en ausencia del celecoxib, indica una participación de sustancias derivadas de la COX-2 mayor en ratonas SAMP8. En estas ratonas, la ovariectomía aumentó la participación de dichas sustancias, incremento que fue revertido por el tratamiento con E2 (Figura 26B).

La interacción de la COX-2 con la NOS se estudió mediante la incubación conjunta con celecoxib y L-NAME. En ratonas SAMR1, esta inhibición no modificó la respuesta contráctil al U46619 en ningún grupo (Figura 27A). Los resultados obtenidos en las ratonas SAMR1 Sham y OvE sugieren la existencia de un balance entre la NOS y la COX-2 que mantiene la contracción al U46619, mediante la producción de NO (Figura 16) y prostaglandinas contráctiles (Figura 23). En ratonas SAMR1 ovariectomizadas este balance cambia y la participación del NO sólo se observa en presencia de celecoxib, indicando que la ausencia de estrógenos disminuye la biodisponibilidad del NO a través de la COX-2.

En las ratonas SAMP8, la incubación conjunta de celecoxib y L-NAME, no modificó la máxima contracción, pero disminuyó el pD_2 (Tabla 10 y Figura 27A). Al igual que en SAMR1 se observa una disminución en la biodisponibilidad del NO y un aumento de prostaglandinas contráctiles. En ratonas ovariectomizadas, cuando se bloquean las dos rutas se observa un aumento en la biodisponibilidad del NO.

En el análisis del ABC en presencia y en ausencia de L-NAME y celecoxib, se observó un mayor ΔABC en las SAMP8, que fue similar en todos los grupos quirúrgicos (Figura 27B). Estos resultados obtenidos en ausencia de la modulación por NOS y COX-2 indican que las diferencias observadas entre el ABC de SAMP8 y SAMR1 son debidas a mecanismos dependientes del envejecimiento.

Tabla 10. Valores de pD₂ y contracción máxima (Emax) al U46619 en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx, y OvE), en ausencia (Control) y en presencia de L-NAME (10⁻⁴ M), celecoxib (10⁻⁵ M) o L-NAME más celecoxib.

	SAMR1		SAMP8	
	pD ₂	Emax (mN)	pD ₂	Emax (mN)
Sham				
Control	7,78 ± 0,12	13,08 ± 0,86	8,20 ± 0,09*	15,81 ± 0,65*
L-NAME	8,22 ± 0,10 ^a	15,90 ± 0,55 ^a	8,40 ± 0,06	18,16 ± 0,44 ^a
Celecoxib	7,16 ± 0,09 ^a	10,31 ± 0,52 ^a	7,34 ± 0,09 ^a	11,77 ± 0,74 ^a
L-NAME + celecoxib	7,66 ± 0,08	13,14 ± 0,64 ^{bc}	7,79 ± 0,06 ^{abc}	14,61 ± 0,39 ^{bc}
Ovx				
Control	7,83 ± 0,08	13,32 ± 0,61	8,18 ± 0,05*	18,90 ± 0,53* [#]
L-NAME	7,13 ± 0,10	13,69 ± 0,68	8,32 ± 0,08	19,30 ± 0,86
Celecoxib	7,25 ± 0,09 ^a	10,78 ± 0,46 ^a	7,45 ± 0,09 ^a	12,82 ± 0,69 ^a
L-NAME + celecoxib	7,79 ± 0,09 ^b	14,11 ± 0,21 ^b	7,87 ± 0,08 ^{abc}	17,55 ± 0,84 ^b
OvE				
Control	7,82 ± 0,04	13,34 ± 0,49	8,16 ± 0,08*	16,05 ± 0,45* [§]
L-NAME	8,09 ± 0,05 ^a	17,26 ± 0,88 ^a	8,30 ± 0,09	18,34 ± 0,38 ^a
Celecoxib	7,01 ± 0,11 ^a	12,06 ± 0,69	7,45 ± 0,09 ^a	11,61 ± 0,46 ^a
L-NAME + celecoxib	7,66 ± 0,06 ^{bc}	13,24 ± 0,59	7,79 ± 0,09 ^{abc}	14,85 ± 0,87 ^{bc}

Media ± SEM. n = 8 ratonas por grupo de estudio. *p<0,05 vs. grupo SAMR1 con el mismo tratamiento y cirugía, #p<0,05 vs. grupo Sham de la misma cepa y tratamiento; §p<0,05 vs. grupo Ovx de la misma cepa y tratamiento; ^ap<0,05 vs. Control de la misma cepa y cirugía; ^bp<0,05 vs tratados con celecoxib de la misma cepa y cirugía; ^cp<0,05 vs tratados con L-NAME de la misma cepa y cirugía

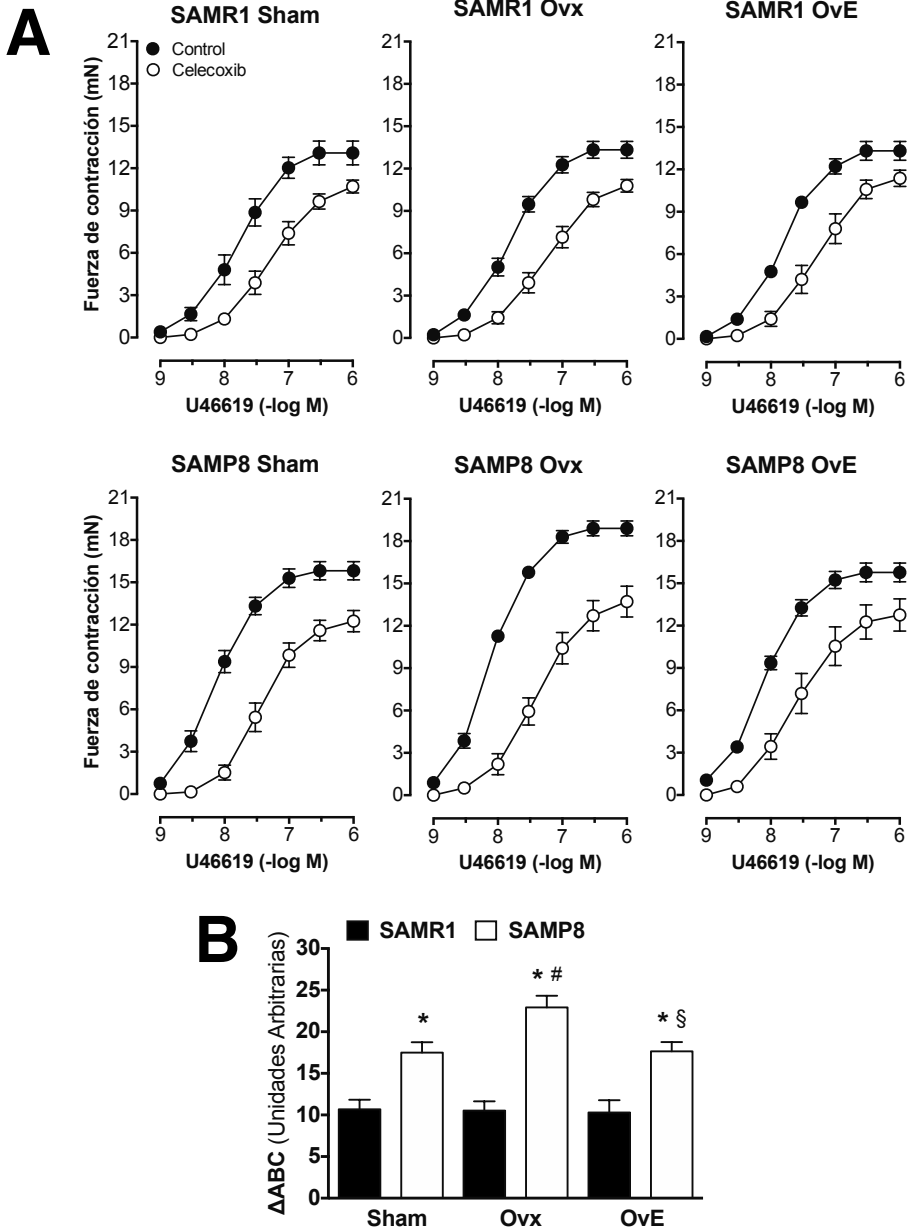


Figura 26. (A) Curvas concentración respuesta y **(B)** diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de celecoxib (10^{-5} M). Los puntos y las barras representan la media \pm SEM. $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. SAMR1 con la misma cirugía; # $p < 0,05$ vs. grupo Sham de la misma cepa; § $p < 0,05$ vs. grupo Ovx de la misma cepa.

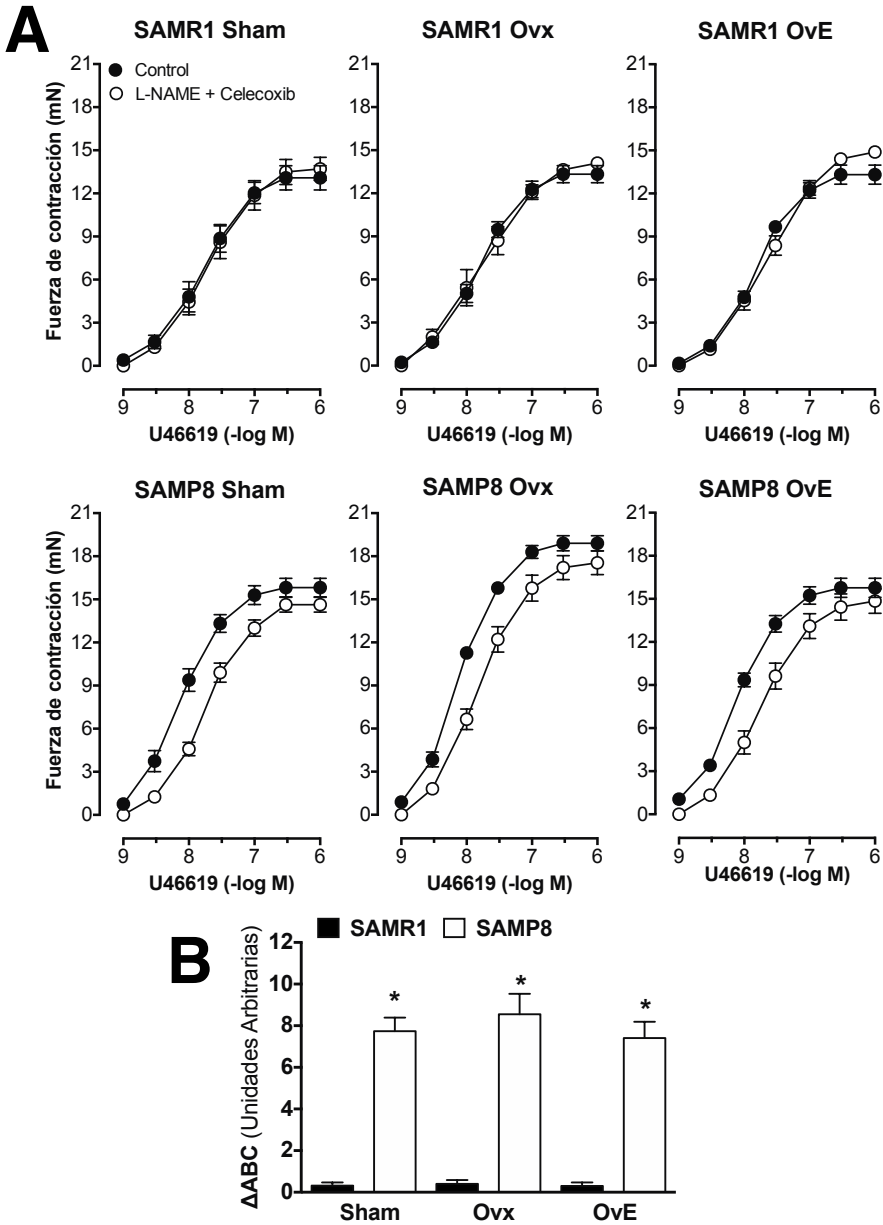


Figura 27. (A) Curvas concentración respuesta y (B) diferencia del área bajo la curva (ΔABC) al U46619, en anillos aórticos de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), en ausencia (Control) y presencia de L-NAME (10^{-4} M) más celecoxib (10^{-5} M). Los puntos y las barras representan la media \pm SEM. $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. SAMR1 con la misma cirugía.

4.4.3. PARTICIPACIÓN DE LA COX-1 Y COX-2 EN LA PRODUCCIÓN DE ANIONES SUPERÓXIDO

Como se ha demostrado previamente, la COX está implicada en la producción de O_2^- en respuesta al U46619 (Figura 23). Para determinar el papel que ejerce la COX-1 y la COX-2 en dicho mecanismo, las secciones aórticas se incubaron con los inhibidores específicos, SC560 (10^{-7} M) y celecoxib (10^{-5} M), respectivamente.

La incubación con SC560 (10^{-7} M) no modificó la intensidad de fluorescencia respecto a su control, pero disminuyó significativamente el efecto del U46619 en la producción de O_2^- en todos los grupos (Figura 28). Como en el apartado 3.4, las imágenes que se muestran en las figuras son las representativas de la respuesta al U46619 en ausencia y en presencia de SC560 y/o celecoxib. En las gráficas de cuantificación de intensidad de la fluorescencia se muestran además los resultados de las secciones arteriales no tratadas con U46619 en ausencia y en presencia de estos inhibidores.

En ratonas SAMR1 y SAMP8 la inhibición de la COX-1 revirtió la producción de O_2^- inducida por el U46619 en los grupos Sham y OvE. Sin embargo, en las ratonas ovariectomizadas disminuyó la producción de O_2^- , aunque no se alcanzaron los niveles basales (Figura 28B), sugiriendo la participación de otras fuentes de O_2^- distintas a la COX-1 en ausencia de estrógenos.

La inhibición de la COX-2 con celecoxib (10^{-5} M) no alteró la producción basal de O_2^- ningún grupo de estudio (Figura 29). El incremento de la producción de O_2^- inducido por el U46619 tampoco se alteró con la inhibición con celecoxib en ratonas Sham y OvE de ambas cepas, indicando que en estos grupos la inhibición de la COX-2 no altera los niveles de O_2^- inducidos por la activación del receptor TP. Sin embargo, en las ratonas ovariectomizadas el celecoxib disminuyó parcialmente el efecto del U46619,

indicando otras fuentes de O_2^- distintas a la COX-2 inducidas por el U46619 en ausencia de estrógenos (Figura 29).

En todos los grupos de estudio, el incremento de los niveles de O_2^- inducido por el U46619 fue bloqueado por la inhibición conjunta de COX-1 y COX-2 con SC560 y celecoxib, respectivamente (Figura 30). Este efecto coincide con el obtenido con la incubación con indometacina (Figura 23), un inhibidor inespecífico de la COX. En conjunto, los resultados sugieren que el aumento de los niveles de O_2^- inducido por el U46619 procedería de COX-1 en presencia de estrógenos y de COX-1 y COX-2 en ausencia de estrógenos.

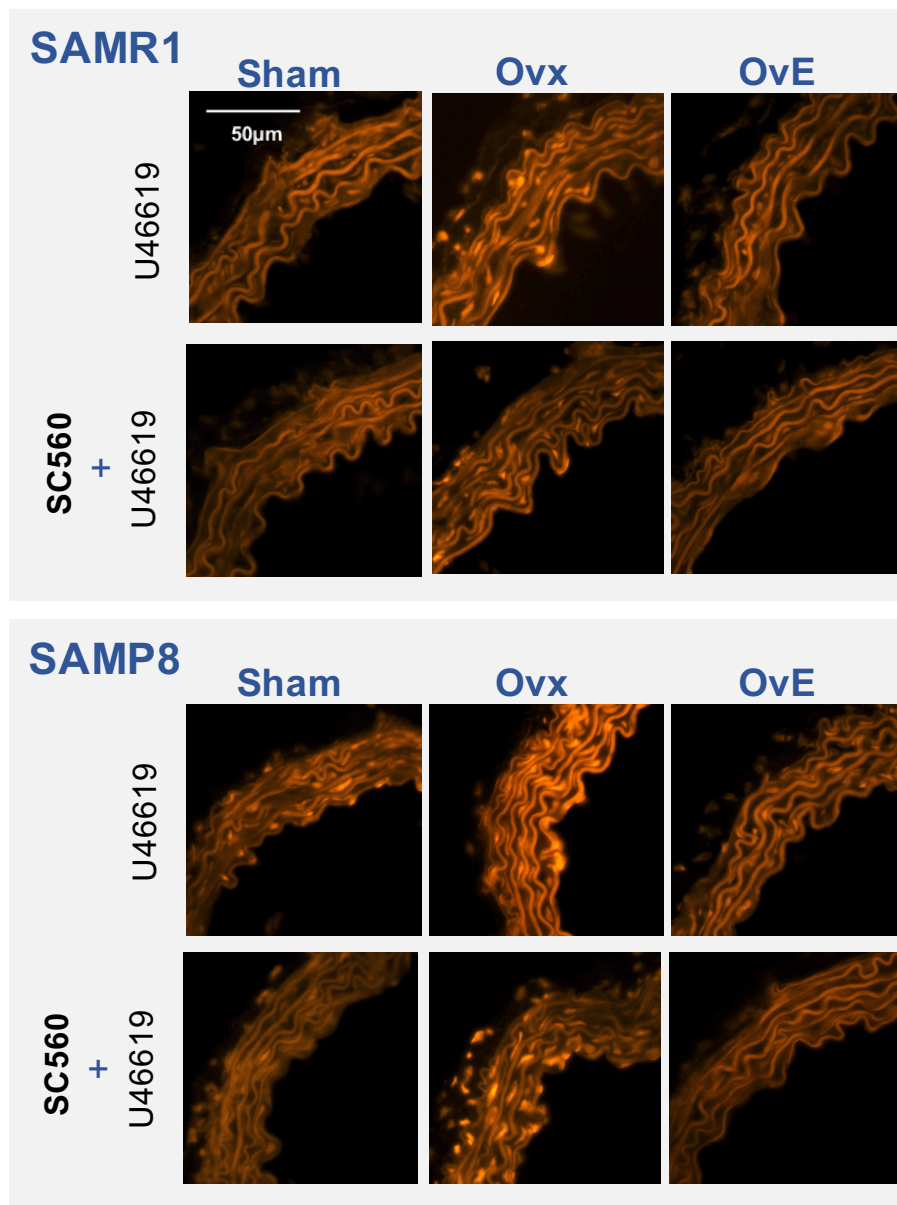


Figura 28A. Imágenes representativas de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10⁻⁸ M) en ausencia y en presencia del inhibidor específico de la COX-1, SC560 (10⁻⁷ M).

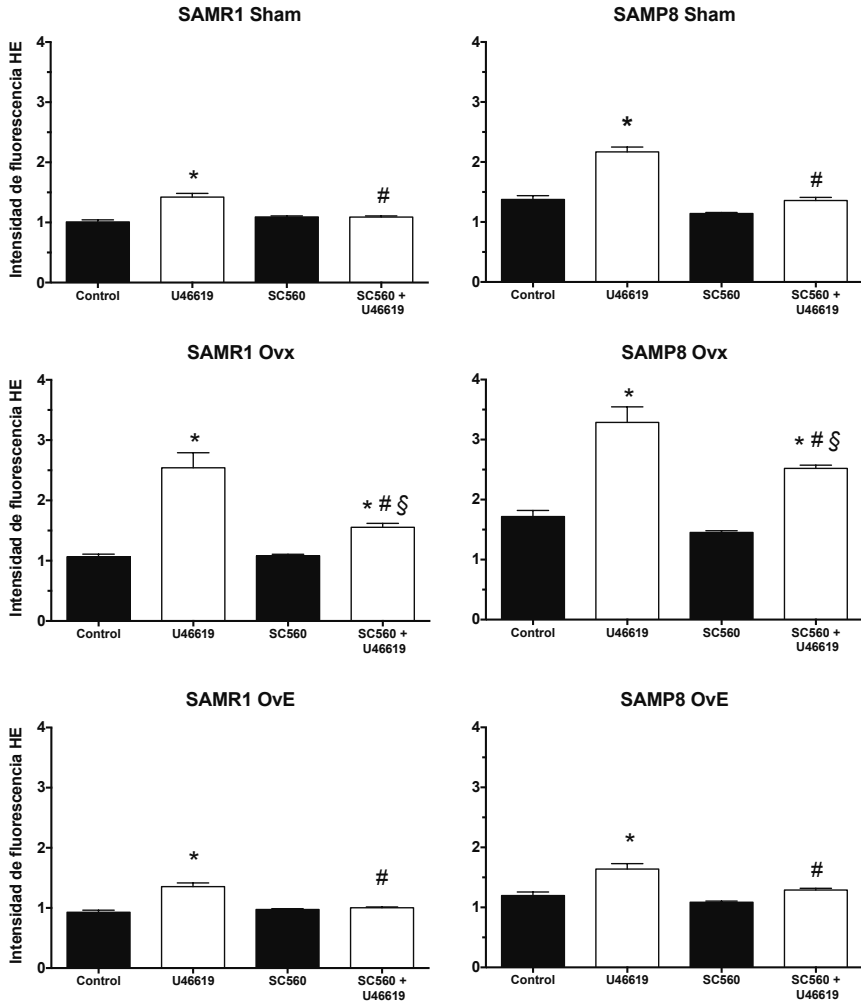


Figura 28B. Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y Ove), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia del inhibidor específico de la COX-1, SC560 (10^{-7} M). Las barras representan la media \pm SEM, como U.A. relativizadas a SAMR1 Sham (Control). $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. Control de la misma cepa y cirugía; # $p < 0,05$ vs. tratadas con U46619 de la misma cepa y cirugía; § $p < 0,05$ vs. tratadas con celecoxib de la misma cepa y cirugía.

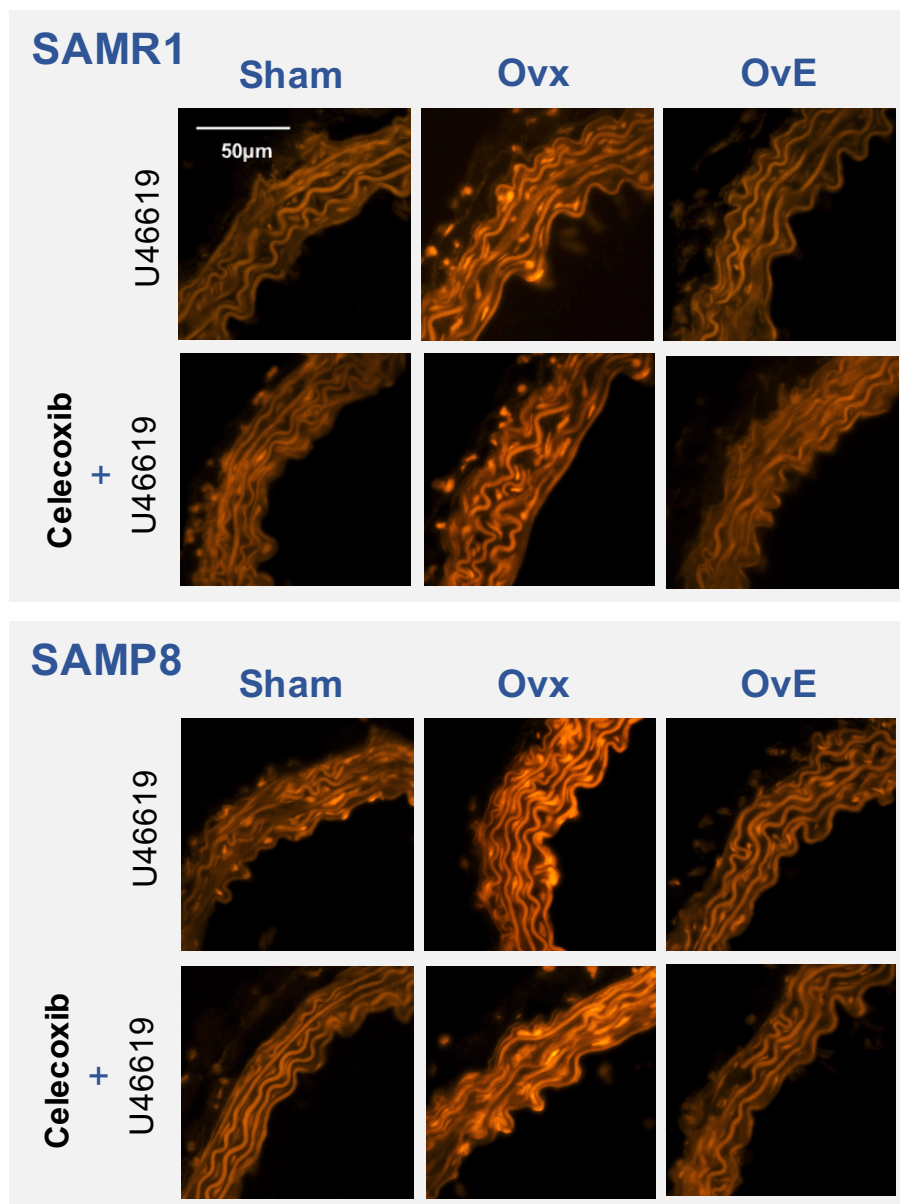


Figura 29A. Imágenes representativas de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia del inhibidor específico de la COX-2, celecoxib (10^{-5} M).

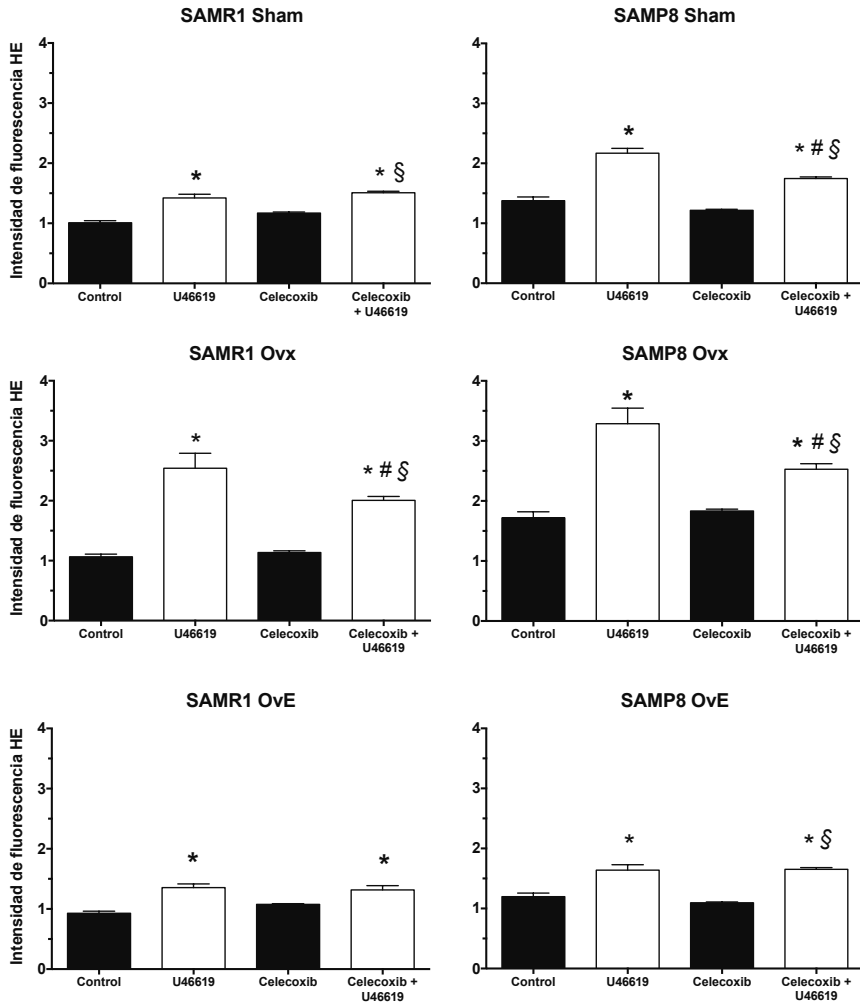


Figura 29B. Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia del inhibidor específico de la COX-2, celecoxib (10^{-5} M). Las barras representan la media \pm SEM, como U.A. relativizadas a SAMR1 Sham (Control). $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0,05$ vs. Control de la misma cepa y cirugía; # $p < 0,05$ vs. tratadas con U46619 de la misma cepa y cirugía; § $p < 0,05$ vs. tratadas con celecoxib de la misma cepa y cirugía.

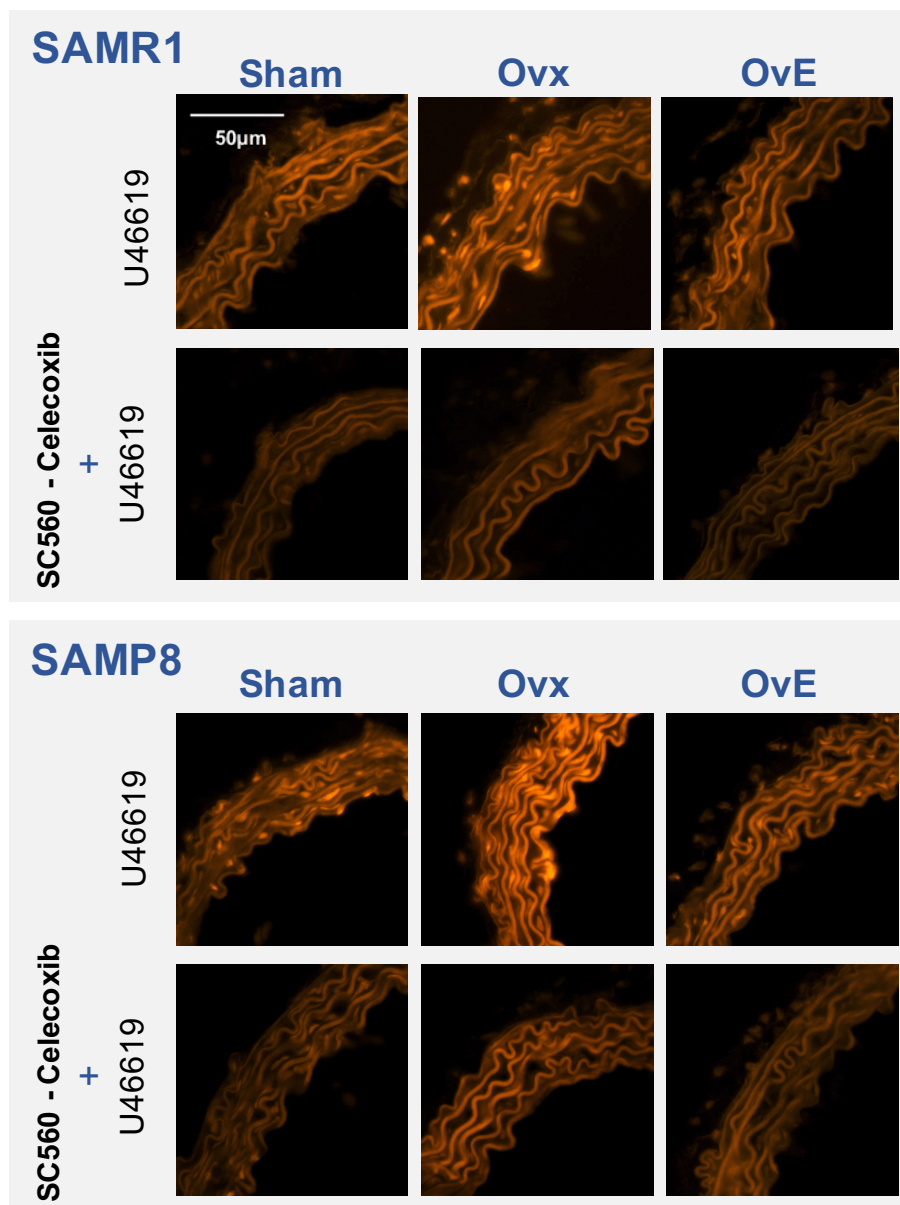


Figura 30A. Imágenes representativas de la producción de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE) tratadas con U46619 (10⁻⁸ M) en ausencia y en presencia de SC560 (10⁻⁷ M) más celecoxib (10⁻⁵ M).

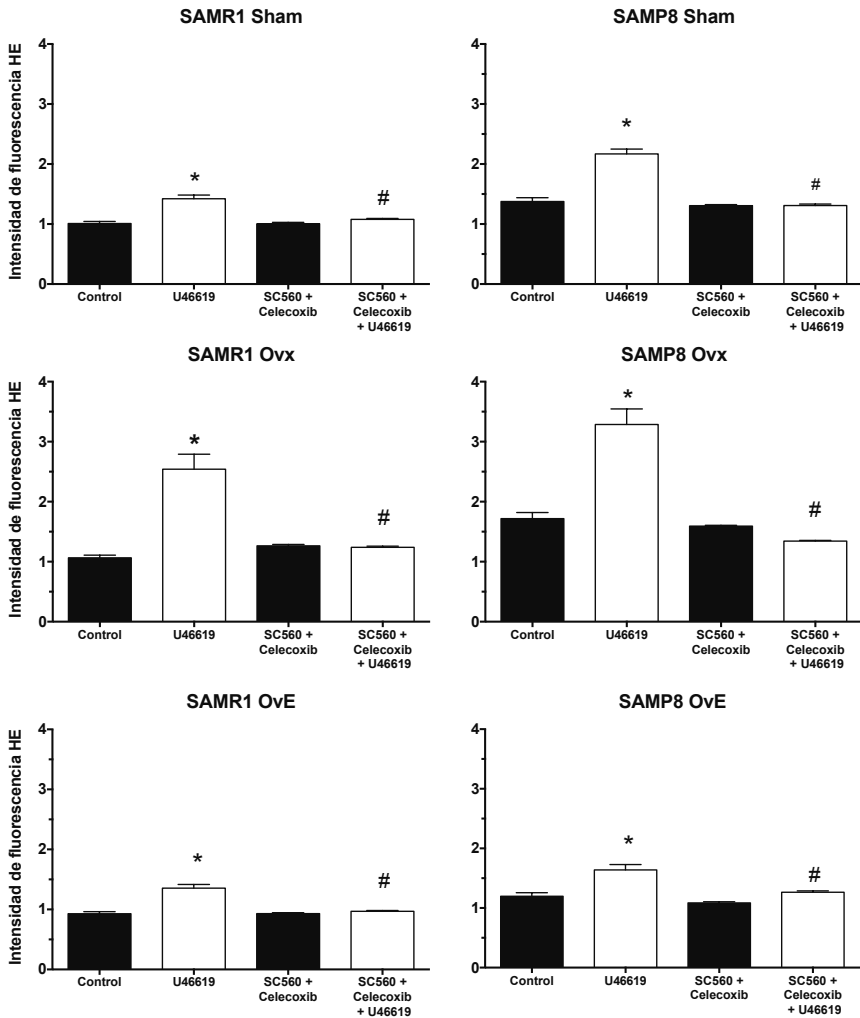


Figura 30B. Cuantificación de los niveles de anión superóxido en secciones transversales de aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y Ove), sin tratar (Control), tratadas con U46619 (10^{-8} M) en ausencia y en presencia de SC560 (10^{-7} M) más celecoxib (10^{-5} M). Las barras representan la media \pm SEM, como U.A. relativizadas a SAMR1 Sham (Control). $n=8$ ratonas por grupo de estudio. * $p<0,05$ vs. Control de la misma cepa y cirugía; # $p<0,05$ vs. tratadas con U46619 de la misma cepa y cirugía.

4.5. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO Y LA FALTA DE ESTROGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE NOS, COX-1 Y COX-2

En este grupo de experimentos se analizó la expresión génica mediante qPCR y proteica mediante inmunohistoquímica de la eNOS, COX-1 y COX-2, su localización en aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8, así como sus posibles variaciones inducidas por el envejecimiento y la falta de estrógenos.

La expresión génica y proteica de eNOS en el endotelio disminuyó en las ratonas SAMP8 (Figura 31). Además, la ovariectomía disminuyó los niveles de la eNOS en ambas cepas (Figura 31B-C). El tratamiento con E2 revirtió el efecto de la ovariectomía, pero no modificó las diferencias asociadas al envejecimiento (Figura 31A-B). Los resultados obtenidos demuestran una disminución de la expresión de la eNOS por el envejecimiento y por la falta de estrógenos.

La expresión proteica de COX-1 se localizó principalmente en el endotelio y no se observaron diferencias entre ratonas SAMR1 y SAMP8, descartando un posible efecto del envejecimiento (Figura 32A-B). La ovariectomía tampoco modificó los niveles de expresión proteica de la COX-1 en ratonas SAMR1 y SAMP8. En cambio, se observó una disminución de la expresión proteica de COX-1 en el endotelio de aorta de ratonas ovariectomizadas y tratadas con E2 (OvE) (Figura 32A-B). La expresión génica de la COX-1 no se modificó en ningún grupo de estudio (Figura 32C).

La expresión génica y proteica de COX-2 fue similar en ratonas SAMR1 y en los grupos Sham y OvE de ratonas SAMP8. Sin embargo, la ovariectomía en ratonas SAMP8 incrementó la expresión de la COX-2, efecto revertido por el tratamiento con E2 (Figura 33).

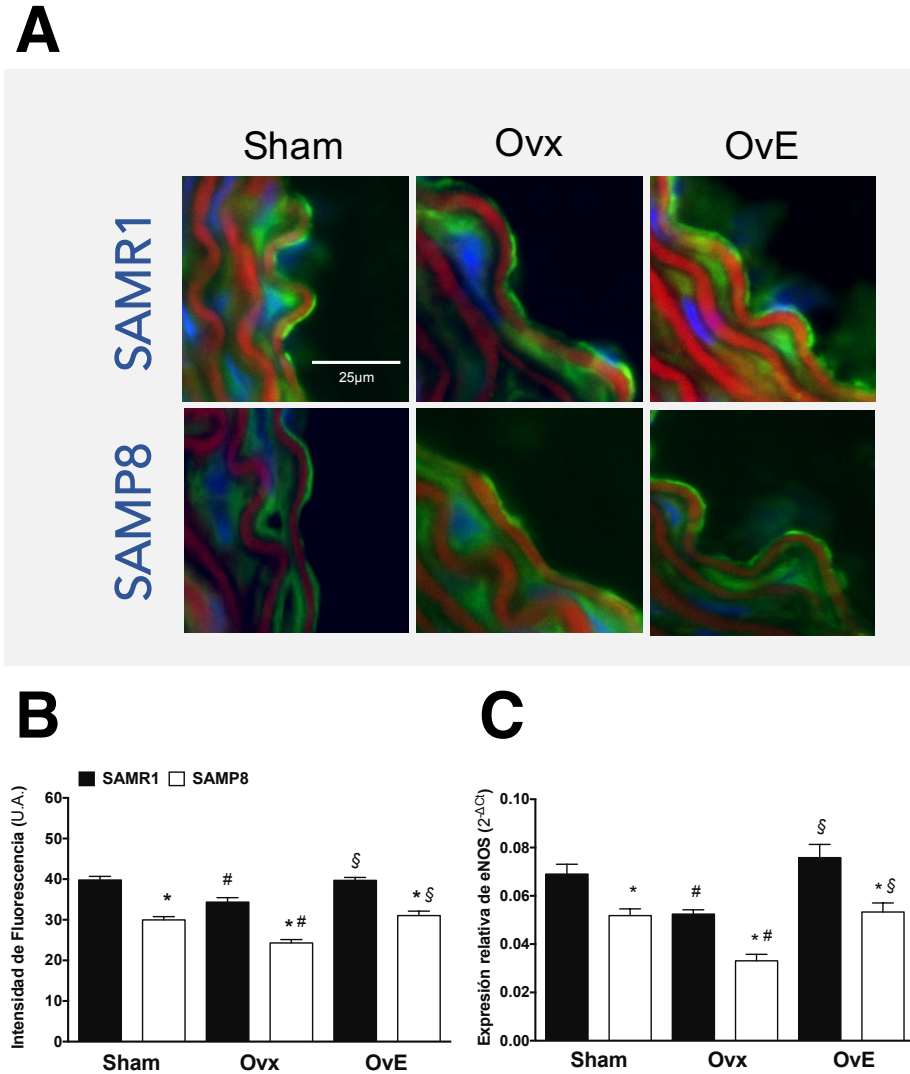


Figura 31. Expresión de eNOS en aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y Ove). (A) Imágenes representativas superpuestas de la inmunohistoquímica. La tinción muestra los núcleos (azul, DAPI), eNOS (verde) y autofluorescencia (rojo). (B) Análisis densitométrico de la expresión endotelial de eNOS. (C) Expresión génica mediante qPCR de eNOS relativizado frente GAPDH. Las barras representan la media \pm SEM. $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. * $p < 0.05$ vs. SAMR1 con la misma cirugía; # $p < 0.05$ vs. grupo Sham de la misma cepa; § $p < 0.05$ vs. grupo Ovx de la misma cepa.

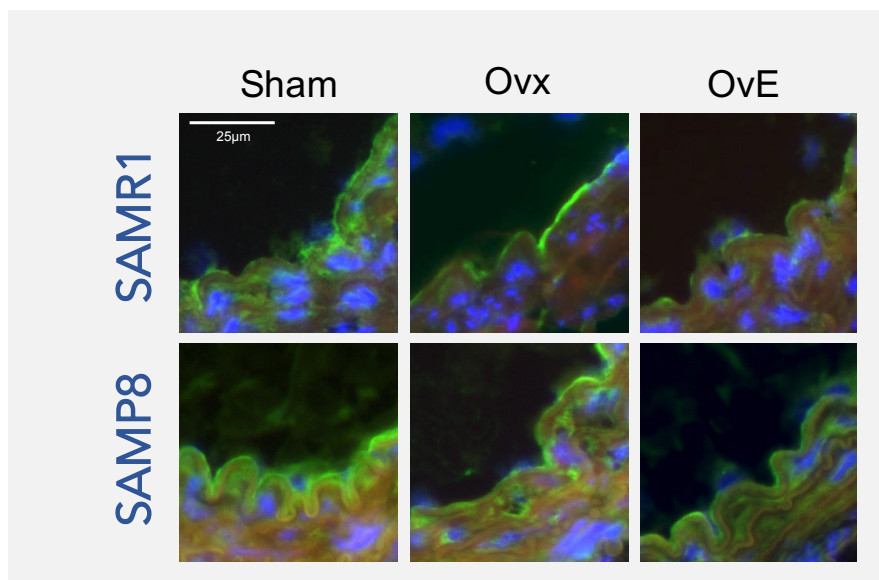
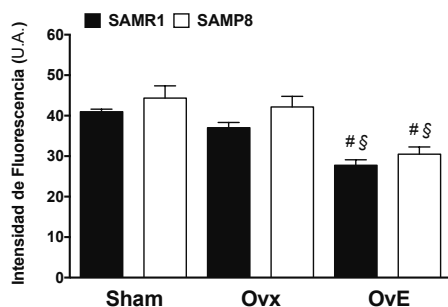
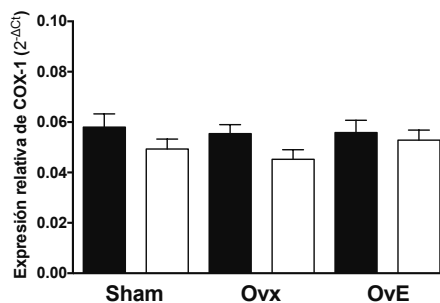
A**B****C**

Figura 32. Expresión de COX-1 en aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y OvE). (A) Imágenes representativas superpuestas de la inmunohistoquímica. La tinción muestra los núcleos (azul, DAPI), COX-1 (verde) y autofluorescencia (rojo). (B) Análisis densitométrico de la expresión endotelial de COX-2. (C) Expresión génica mediante qPCR de COX-1 relativizado frente GAPDH. Las barras representan la media \pm SEM. $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. [#] $p < 0.05$ vs. grupo Sham de la misma cepa; [§] $p < 0.05$ vs. grupo Ovx de la misma cepa.

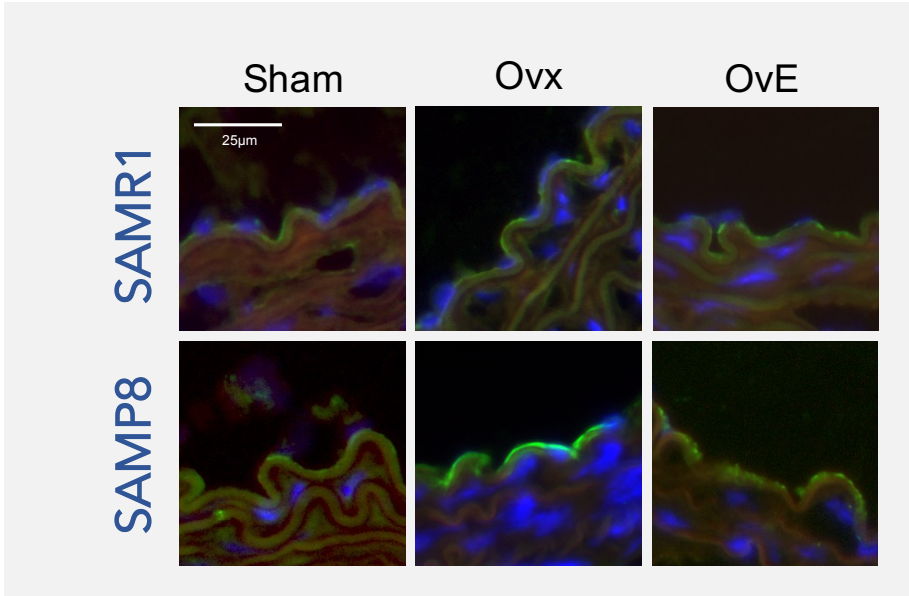
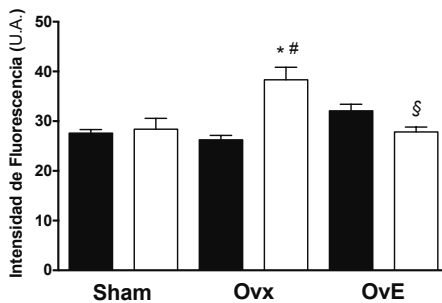
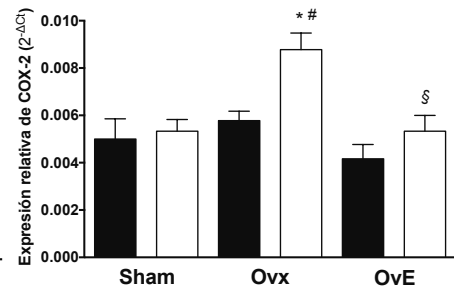
A**B****C**

Figura 33. Expresión de COX-2 en aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 de los diferentes grupos de estudio (Sham, Ovx y Ove). (A) Imágenes representativas superpuestas de la inmunohistoquímica. La tinción muestra los núcleos (azul, DAPI), COX-2 (verde) y autofluorescencia (rojo). (B) Análisis densitométrico de la expresión endotelial de COX-2. (C) Expresión génica mediante qPCR de COX-2 relativizado frente GAPDH. Las barras representan la media \pm SEM. $n = 8$ ratonas por grupo de estudio. $*p < 0.05$ vs. SAMR1 con la misma cirugía; $\#p < 0.05$ vs. grupo Sham de la misma cepa; $\$p < 0.05$ vs. grupo Ovx de la misma cepa.

5. DISCUSIÓN

En la presente tesis se ha demostrado que la respuesta contráctil vascular al TXA₂ aumenta con el envejecimiento en hembras y está potenciada por la falta de estrógenos. Los resultados muestran cómo el TXA₂ modifica la actividad de dos enzimas clave en el control del tono vascular, la NOS y la COX. Entre ambas enzimas se establece una interacción que se altera por el envejecimiento y la falta de estrógenos. Esta interacción implica una disminución en la biodisponibilidad del NO debido a un incremento de la actividad vascular de la COX-1 y COX-2, además de un aumento de la producción de O₂⁻. Por otra parte, tanto el envejecimiento como el E2 participan en la regulación génica y proteica de NOS y COX. Estos resultados demuestran el papel fundamental de los estrógenos sobre la función vascular, que se hace más evidente durante el envejecimiento.

5.1. SAMR1/SAMP8 COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO VASCULAR

En el envejecimiento se producen alteraciones en diferentes mecanismos que aumentan el riesgo cardiovascular (Ferrari y cols., 2003; Lakatta, 2015; Lakatta y Levy, 2003). Actualmente existen diversos modelos animales para el estudio de las alteraciones estructurales y funcionales que se producen durante el envejecimiento. Gran parte de los estudios realizados en este campo se llevan a cabo en roedores, especialmente en ratón. La posibilidad de manipular su genoma, un breve ciclo de crianza y antecedentes genéticos definidos, permiten abordar la patogénesis de muchas enfermedades que pueden verse exacerbadas con la edad (Niccoli y Partridge, 2012). A nivel de alteraciones cardiovasculares asociadas al envejecimiento, el ratón presenta similitudes con humanos (Vanhooren y Libert, 2013). El envejecimiento vascular está particularmente asociado a disfunción endotelial, rigidez arterial y remodelación, alteración de la angiogénesis, reparación vascular defectuosa y una mayor prevalencia de aterosclerosis (Erusalimsky, 2009; Lakatta y Levy, 2003; Novella y cols.,

2013). Si bien el corazón en ratones envejecidos es comparable al de humanos (Dai y Rabinovitch, 2009), para el estudio de la aterosclerosis se requiere la manipulación de los genes implicados en el metabolismo de lipoproteínas (Ishibashi y cols., 1993; Purcell-Huynh y cols., 1995) para generar ratones con hipercolesterolemia y aterosclerosis en los que estudiar la progresión de la lesión. Aunque han sido ampliamente utilizados, el rápido inicio de la aterosclerosis en estos modelos murinos comparados con humanos (semanas frente a años), limita su utilidad en el desarrollo de diversos tratamientos. A pesar de la importancia del envejecimiento vascular, pocos modelos integran el envejecimiento fisiológico como una característica básica. Por ello, se hace necesario disponer de un modelo que permita establecer una correcta cronología de las alteraciones vasculares asociadas al envejecimiento. En este sentido, el modelo murino con senescencia acelerada (SAM, Senescence Accelerated Mouse) ha sido muy utilizado para el estudio de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como el Alzheimer (Takeda, 2009). A nivel vascular, la ausencia de alteraciones a edades tempranas ha facilitado su uso para el estudio del envejecimiento (Butterfield y Poon, 2005). También han sido utilizados para estudiar la participación del NO en la respuesta vascular en aorta de ratones (Llorens y cols., 2007) y ratonas (Novella y cols., 2010; Novensa y cols., 2011).

Este trabajo determina, mediante curvas de supervivencia, la esperanza de vida y la longevidad media de las ratonas SAM de la colonia mantenida en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina. La cepa SAMP8 mostró menor longevidad media y máxima que la SAMR1. Estos resultados confirman el pedigrí de las ratonas SAM que mantienen el fenotipo senescente de la colonia de ratonas utilizadas en el estudio. Además, son similares a los obtenidos por otros autores en machos vírgenes (Carter y cols., 2005; Spangler y cols., 2002).

Estudios clínicos demuestran una relación entre el envejecimiento y el aumento de la presión arterial. Es bien sabido que la edad es un factor de

riesgo no modificable en el desarrollo de la hipertensión (Wang y cols., 2010). El aumento del riesgo es debido, en parte, a cambios que se producen en los vasos sanguíneos, entre los que se encuentran la disfunción endotelial, la remodelación vascular, el aumento de la rigidez vascular y la inflamación (Buford, 2016; Harvey y cols., 2015). Estos cambios funcionales y estructurales son características comunes en la hipertensión y en el envejecimiento (Barja, 2013), que incluyen daño de las células endoteliales, aumento del crecimiento de las células del músculo liso vascular, migración celular, inflamación, contracción, depósito de la matriz extracelular, fibrosis y calcificación (Bachschmid y cols., 2013).

Se ha descrito que los ratones SAMR1 y SAMP8 sufren cambios de presión arterial con la edad (Han y cols., 1998). Los ratones SAMP8 muestran una gradual disminución de la presión arterial a partir de los 5-7 meses (Han y cols., 1998), que se asociaron a cambios degenerativos en el bulbo raquídeo. Los ratones SAMR1, con envejecimiento normal, no presentan cambios en la presión arterial relacionados con la edad entre los 2 y 27 meses (Han y cols., 1998). En el presente trabajo se determinó la evolución temporal de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) en ratonas SAMR1 y SAMP8 desde los 3 a los 10 meses y se observó que ambas cepas mostraron valores normales. Las ratonas SAMP8 registraron un aumento de la PAS a los 6 meses y de la PAD a los 8 meses, lo que coincide con lo observado en humanos donde el incremento de los valores de PAS se produce con anterioridad al incremento de la PAD (Strait y Lakatta, 2012). Sin embargo, discrepan con los descritos previamente por Han y cols., probablemente debido a diferencias en los procedimientos metodológicos (Han y cols., 1998). El estudio de Han y cols. parte de un grupo mixto de machos y hembras que no están preacondicionados. Además, se realizaron 3 medidas consecutivas en 3 días, a diferencia del presente estudio en el que se realiza un acondicionamiento previo para evitar la influencia de estrés, y se hace un seguimiento de la presión arterial

en las mismas ratonas desde los 3 a los 10 meses, eliminando posibles variaciones interindividuales.

Una variable asociada al incremento de la prevalencia de la presión arterial con la edad es el sexo. La tasa de hipertensión en mujeres jóvenes es menor que en hombres de la misma edad, pero se iguala alrededor de los 55 años y aumenta a partir de los 65 (Kearney y cols., 2005; Wiinberg y cols., 1995). El aumento en la prevalencia de hipertensión en mujeres se debe, al menos en parte, a la disminución de hormonas sexuales que se produce en la menopausia y se mantiene en el climaterio (Maranon y Reckelhoff, 2013; Maric-Bilkan y cols., 2014; Staessen y cols., 1997).

El envejecimiento vascular está asociado a múltiples mecanismos que conducen a una disfunción endotelial, la mayoría de los cuales disminuyen la biodisponibilidad del NO (Erusalimsky, 2009; Hayashi y cols., 2008; Kim y cols., 2009; Santhanam y cols., 2008). Se ha descrito una reducción de la vasodilatación dependiente del endotelio en humanos y en modelos animales de envejecimiento (Kim y cols., 2009; Viridis y cols., 2010). Diversos estudios demuestran que la relajación dependiente de endotelio mediada por acetilcolina a través de sus receptores muscarínicos está alterada por el envejecimiento (Matz y Andriantsitohaina, 2003). Este efecto se ha descrito en vasos de conductancia y de resistencia de diferentes especies (Matz y cols., 2000). En el presente estudio, la respuesta a la acetilcolina en aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 esta mediada por el NO de origen endotelial, ya que la eliminación mecánica del endotelio o la inhibición de la NOS con L-NAME anulan su efecto relajante.

Estudios clínicos y experimentales han determinado que durante el envejecimiento disminuye la vasodilatación mediada por el NO (Matz y Andriantsitohaina, 2003). En el modelo de envejecimiento SAM, la relajación inducida por acetilcolina disminuyó en las ratonas SAMR1 a los 10 meses y en SAMP8 a los 6 meses. El estudio del envejecimiento en humanos es difícil porque suele estar asociado a diversas patologías como hipertensión,

aterosclerosis o diabetes. Además, la existencia de factores de riesgo son variables adicionales de difícil control. De ahí la importancia de modelos animales para el estudio del envejecimiento. En el modelo de envejecimiento SAM, los resultados corroboran estudios previos e indican que el envejecimiento y la senescencia afectan a la relajación dependiente del endotelio. Estas alteraciones vasculares no se observaron a los 3 meses de edad, lo que descarta la existencia de posibles diferencias debidas a la cepa. Estudios previos indican una progresiva reducción de la vasodilatación mediada por el NO con la edad, que podría ser debida a la deficiencia en la expresión y actividad de la eNOS en aorta de ratonas (Matz y Andriantsitohaina, 2003) y ratones (Llorens y cols., 2007). La disminución en la vasodilatación dependiente de endotelio también podría explicarse, al menos en parte, por una disminución en la sensibilidad del músculo al NO. Sin embargo, el mantenimiento de la respuesta vascular en aorta de ratonas al dador de NO, nitroprusiato sódico, descarta esta posibilidad, coincidiendo con otros estudios desarrollados en arterias de conductancia y de resistencia (Matz y Andriantsitohaina, 2003) y en estudios de función endotelial en humanos (DeSouza y cols., 2000; Donato y cols., 2007; Eskurza y cols., 2004).

El TXA₂ es un prostanoides derivado del ácido araquidónico que se sintetiza a través de la ruta de las COX. La mayor parte de los prostanooides son vasodilatadores, aunque la estimulación de células del músculo liso por el TXA₂ induce una potente vasoconstricción. Sus acciones están mediadas por el receptor TP, que está expresado en diferentes líneas celulares relevantes a nivel vascular, como las células del músculo liso (Pfister y cols., 1997). La activación del receptor del TXA₂ contribuye a la disfunción endotelial inducida por el envejecimiento (Heymes y cols., 2000). De hecho, se han observado elevados niveles plasmáticos de TXA₂ en pacientes con diversas enfermedades (Ogletree, 1987) y está implicado en diversas enfermedades cardiovasculares asociadas al envejecimiento como

isquémica miocárdica (Neri Serneri y cols., 1981), aterosclerosis (Mehta y cols., 1988), hipertensión (Francois y cols., 2004) e ictus (Chamorro, 2009).

En este trabajo, nuestro interés es definir la repuesta al TXA_2 en aorta de ratonas para evaluar la influencia del envejecimiento. En las ratonas SAM se observó un incremento progresivo en la contracción al U46619 con el envejecimiento que fue mayor en ratonas SAMP8. En estudios previos, se ha observado una mayor expresión de receptores TP en aorta de ratonas SAMP8 (Novella y cols., 2010) lo que podría explicar la mayor sensibilidad al U46619 con la senescencia. Sin embargo, el hecho de que las contracciones al KCl tengan un patrón de respuesta similar, indica que podría existir un mecanismo intrínseco no dependiente de receptor, que contribuiría al mayor efecto observado.

La contracción al KCl se produce por la entrada de Ca^{2+} extracelular mediada por canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Cav1.2). El aumento de sensibilidad al KCl podría indicar una modificación en la respuesta vascular al Ca^{2+} debido a una mayor participación de canales Cav1.2 y/o a una modificación de la sensibilidad al Ca^{2+} (Hall y cols., 2006). Es probable que el envejecimiento, especialmente en ratonas SAMP8, afecte a mecanismos relacionados con la entrada de Ca^{2+} . Por otra parte, nuestros resultados discrepan de los publicados por Shams y cols. en aorta de rata Fischer F-344 (Shams y cols., 1990) donde el envejecimiento no induce diferencias en la contracción al U46619 y el número de receptores TP en la pared vascular tampoco se modifica. Las diferencias con nuestros resultados podrían deberse al procedimiento experimental utilizado en su estudio, donde administran indometacina, sotalol (antagonista de los receptores β adrenérgicos) y fenoxibenzamina (antagonista de los receptores α_1 adrenérgicos) previamente a la realización de las curvas concentración respuesta al U46619, que podrían enmascarar los efectos del envejecimiento.

Por otra parte, los niveles plasmáticos de creatinina, glucosa o bilirrubina total fueron similares entre los 3 y 10 meses de edad, lo que descarta posibles desórdenes metabólicos, renales o hepáticos asociados a la edad y que pudieran afectar a la función vasomotora. En conjunto, estos resultados corroboran la idoneidad del modelo SAMR1/SAMP8 en estudios de envejecimiento vascular (Llorens y cols., 2007; Novella y cols., 2013a; Novella y cols., 2013b).

A nivel hormonal, las ratonas SAMR1 y SAMP8 no mostraron variaciones en los niveles plasmáticos de E2 ni en el peso uterino, al menos dentro de la franja de edad estudiada. Estos resultados indican un estatus hormonal o una función ovárica similar en ratonas SAMR1 a SAMP8 de 3 a 10 meses de edad, descartando al E2 como responsable de las diferencias en la respuesta contráctil observada. En general, la senescencia reproductiva y la pérdida de la función ovárica con la edad en los mamíferos son fenómenos comunes, aunque existen diferencias entre especies (Nelson y cols., 1989; Wu y cols., 2005). Entre las excepciones se encuentran los roedores, donde el comienzo de la decadencia de la función ovárica se caracteriza por períodos de estro constantes durante los cuales se mantienen elevados los niveles de estrógenos con ausencia de ovulación. Únicamente hacia las etapas más tardías de su ciclo vital, las ratonas SAMP8 manifiestan una bajada de los niveles de hormonas ováricas y pueden presentar pocos o ningún folículo ovárico (Yuan y cols., 2005). Esto coincidiría con la ausencia de variabilidad en los niveles plasmáticos de E2 mostrados por las ratonas SAMP8 utilizadas en este estudio.

5.2. ESTUDIO DEL E2 EN LA FUNCIÓN VASCULAR DEL MODELO SAMR1/SAMP8

En mujeres, la disminución de los niveles de estrógenos circulantes durante la menopausia se ha relacionado con el incremento del riesgo cardiovascular (Kannel, 2002). Tanto el envejecimiento como la disminución de estrógenos podrían estar relacionados con alteraciones de la función vascular descritas en el climaterio, especialmente con la pérdida de la capacidad de dilatación de los vasos sanguíneos (Moreau y Hildreth, 2014; Novella y cols., 2012).

Diferentes estudios experimentales realizados en modelos animales y en células vasculares, así como resultados de estudios epidemiológicos obtenidos en mujeres postmenopáusicas con y sin terapia hormonal sustitutiva (THS) han revelado el efecto protector del E2 a nivel cardiovascular. Sin embargo, a finales de los años 90 los estudios clínicos HERS (*Heart y Estrogen/progestin Replacement Study*) (Hulley y cols., 1998) y WHI (*Women's Health Initiative*) (Rossouw y cols., 2002) pusieron en duda este efecto beneficioso de la THS con estrógenos. El nuevo análisis de los datos obtenidos en el HERS y el WHI y la contribución de otros estudios clínicos como el KEEPS (*Kronos Early Estrogen Protection Study*) (Miller y cols., 2009) y el ELITE (*Early Versus Late Intervention Trial with Estradiol*) (Hodis y cols., 2016), confirmaron el efecto beneficioso de la THS con estrógenos cuando se utiliza en los 10 años posteriores al inicio de la menopausia, conociéndose como la hipótesis temporal. Durante este periodo sería posible revertir parte de los efectos derivados de la falta de estrógenos.

Actualmente se dispone de poca información que relacione la acción del envejecimiento sobre los efectos vasculares de los estrógenos. La mayoría de los estudios destinados a determinar los efectos de los estrógenos presentan el inconveniente de haberse realizado en hembras jóvenes ovariectomizadas, por lo que no representan un modelo de

menopausia. Por otra parte, se han descrito alteraciones vasculares en ratas ovariectomizadas a edades muy avanzadas (Berezan y cols., 2008; LeBlanc y cols., 2009; Lekontseva y cols., 2010; Moien-Afshari y cols., 2003). Otros autores han descrito una acción del envejecimiento sobre la respuesta vascular mediada por estrógenos en ratas de mediana edad, pero con hipertensión (Fortepiani y cols., 2003; Wynne y cols., 2004), dificultando la interpretación de los resultados. Estos modelos no serían adecuados para el estudio los efectos vasculares de la menopausia, donde confluyen un cierto grado de envejecimiento vascular y la ausencia de estrógenos.

La caracterización de las alteraciones vasculares asociadas a la ovariectomía en el modelo de ratonas SAM permitiría utilizarlas como modelo de envejecimiento vascular asociado a la menopausia. Este estudio se ha realizado en ratonas ovariectomizadas de 6 meses, edad en la que hemos comprobado diferencias en la función vascular entre SAMR1 y SAMP8, coincidiendo con otros trabajos (Fenton y cols., 2004; Llorens y cols., 2007). Además, hemos comprobado que el E2 era responsable de las alteraciones inducidas por la ovariectomía mediante el tratamiento subcutáneo con E2 a ratonas ovariectomizadas.

La eficacia de la cirugía y del tratamiento con E2 se comprobó mediante la medida de los niveles plasmáticos de E2 y el peso uterino, debido a que el E2 tiene efectos hipertróficos sobre útero y es un indicador indirecto de la presencia de estrógenos. En este sentido, ambas cepas mostraron una disminución de los niveles plasmáticos de E2 con la ovariectomía y una reducción del peso uterino por atrofia del mismo. En cambio, el tratamiento hormonal mantuvo los niveles plasmáticos de E2 similares a los de las ratonas Sham, así como la morfología y peso del útero, confirmando la efectividad de la cirugía y del tratamiento con E2.

Es bien conocido que el E2 desempeña un papel en la regulación de la obesidad y la acumulación de grasa tanto en humanos como en modelos animales. La prevalencia de la obesidad aumenta marcadamente

con la disminución de los niveles de E2 que se produce después de la menopausia (Carr, 2003). En modelos experimentales de menopausia se observa un aumento de peso corporal especialmente debido a la adiposidad (Ferrer y Osol, 1998; Minoves y cols., 2002). En las ratonas SAMR1 la ovariectomía aumentó el peso corporal, efecto mediado por el E2, ya que su administración revirtió este efecto. Este resultado concuerda con los obtenidos en ratas ovariectomizadas (Martorell y cols., 2009) y con la ganancia de peso que se produce en las mujeres durante la menopausia (Jull y cols., 2014). Esta ganancia de peso se ha relacionado con un aumento en la adiposidad, que puede ser relevante en la modulación de la función vascular, debido a que el tejido adiposo es una fuente de hormonas y citoquinas (Tanaka y Sata, 2018). Por el contrario, las ratonas SAMP8 no modificaron su peso ni con la ovariectomía ni con el tratamiento con E2, sugiriendo que la senescencia podría modificar mecanismos implicados en la ganancia de peso mediada por los estrógenos.

Es evidente que el E2 desempeña un papel importante en la homeostasis de la glucosa y la resistencia a la insulina (Barros y Gustafsson, 2011; Louet y cols., 2004). Algunos estudios apoyan los efectos beneficiosos del E2 en la regulación metabólica a través de una mayor sensibilidad a la insulina en mujeres premenopáusicas en comparación con hombres de la misma edad (Donahue y cols., 1997; Nuutila y cols., 1995). En las ratonas SAMR1 y SAMP8 no se observaron cambios en los niveles de glucosa, creatinina y bilirrubina total inducidos por la ovariectomía ni por el tratamiento con E2. Estos resultados descartan alteraciones en el metabolismo de la glucosa, daño renal o hepático que pudieran estar asociados a la ovariectomía y/o al envejecimiento, y que influirían en el mantenimiento de una función vasomotora normal.

La presencia de receptores de estrógenos en células endoteliales y células de músculo liso vascular sugiere que pueden actuar directamente sobre la pared arterial para inhibir su engrosamiento (Karas y cols., 1994). La infiltración de leucocitos, la lesión endotelial y la síntesis de la matriz

extracelular son etapas importantes en el engrosamiento de la íntima. Los estrógenos inhiben algunos de estos procesos como la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales (Beldekas y cols., 1981), por lo que cabría esperar un engrosamiento en ausencia de estrógenos. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron cambios significativos en el grosor de la pared aórtica. Probablemente la ausencia de estrógenos afecte antes a las arterias de resistencia que a las de conducción, coincidiendo con el engrosamiento observado en arteria femoral y carótida de ratonas ovariectomizadas de 3 meses de edad, pero no en la aorta (Guo y cols., 2006).

Diversos estudios demuestran que los estrógenos a través de la activación de sus receptores modulan el tono vascular influyendo en el mecanismo de acción de factores que inducen relajación o contracción del músculo liso vascular (para revisión ver Novella y cols., 2012). Entre los mecanismos implicados, los estrógenos pueden interferir con canales iónicos modificando la concentración intracelular de Ca^{2+} en las células del músculo liso. Se ha demostrado que los estrógenos impiden la entrada de Ca^{2+} extracelular (Crews y Khalil, 1999; Han y cols., 1995; Murphy y Khalil, 1999) al inhibir su paso a través de canales Cav1.2 (Crews y Khalil, 1999; Freay y cols., 1997; Hill y cols., 2017; Kitazawa y cols., 1997; Murphy y Khalil, 1999). Varios estudios utilizando animales ovariectomizados han explorado si los estrógenos modulan la función del canal Cav1.2 y han demostrado que la ausencia de estrógenos induce una mayor entrada de Ca^{2+} a través de canales Cav1.2 (Crews y Khalil, 1999; Tharp y cols., 2014), indicando que los niveles plasmáticos de estrógenos pueden reducir la contracción del músculo liso vascular. Con todo, el presente trabajo demuestra que ni la ovariectomía ni el posterior tratamiento con E2 modificaron la contracción al KCl en aorta de ratonas SAMR1. Sin embargo, las SAMP8 ovariectomizadas mostraron un aumento de la contracción inducida por la despolarización con altas concentraciones extracelulares de KCl. La ovariectomía afecta a la contracción de las aortas de ratonas

SAMP8 pero no la de las SAMR1, lo que sugiere que la ausencia de estrógenos incrementa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales Cav1.2 en los vasos que han sufrido senescencia acelerada, mientras que aquéllos en los que los efectos deletéreos del envejecimiento no se han manifestado disponen de mecanismos compensadores frente a la pérdida de estrógenos que normalizan la respuesta contráctil al KCl.

Los estrógenos promueven la síntesis endotelial de NO a través diversos mecanismos como el aumento de la expresión y actividad de la eNOS (Miller y Duckles, 2008). En mujeres durante la menopausia se ha observado una pérdida de la relajación en respuesta a la acetilcolina (Taddei y cols., 1996; Teede, 2007; Viridis y cols., 2000). Además, se ha demostrado que el tratamiento crónico de ratas ovariectomizadas con estrógenos aumenta la relajación dependiente del endotelio a la acetilcolina (Rahimian y cols., 1997). En el presente estudio, la relajación dependiente del endotelio inducida por la acetilcolina en aorta de ratonas SAMR1 no se modificó por la ovariectomía ni el tratamiento con E2. En cambio, en las ratonas SAMP8 la ovariectomía disminuyó la relajación y el tratamiento con E2 revirtió los efectos de la ovariectomía, pero no el del envejecimiento. En general, en las ratonas SAM el envejecimiento per se induce una disminución en la sensibilidad a la acetilcolina, un efecto que se potencia por la ovariectomía. El hecho de que esos efectos no fueran tan evidentes en el grupo SAMR1 ovariectomizado sugiere una interacción entre el envejecimiento y el estado hormonal en el control la función endotelial.

Diversos estudios han evaluado los efectos del envejecimiento sobre la expresión génica y proteica de eNOS. Los resultados han sido contradictorios habiéndose demostrado una ausencia de cambios (Smith y cols., 2006), una reducción (Csiszar y cols., 2002; Tanabe y cols., 2003; Wang y cols., 2011) o un aumento (Cernadas y cols., 1998; van der Loo y cols., 2005, 2000). Estas discrepancias se han atribuido a diferencias en la especie animal, cepa, edad, modelo experimental o al lecho vascular utilizado. En las ratonas SAM, de acuerdo con los datos obtenidos en el

estudio de reactividad vascular, se observó una disminución en la expresión de eNOS en aorta de ratonas SAMP8 Sham, indicando que la disminución en la respuesta a la acetilcolina estaría mediada por una disminución de la expresión de eNOS en lugar de cambios en la señalización de NO que podrían ser responsables del deterioro de las respuestas vasculares inducidas por el envejecimiento y la senescencia acelerada en hembras.

Los estrógenos poseen efectos potenciadores agudos y crónicos sobre la relajación dependiente del endotelio que involucran cambios en la expresión génica y proteica de enzimas clave en el control del tono vascular (Keung y cols., 2005; Miller y Duckles, 2008; Tostes y cols., 2003). Numerosos estudios muestran una disminución en la expresión de la eNOS con ovariectomía y un aumento con el tratamiento con E2 (Grohe y cols., 2004; Magness y cols., 2001; McNeill y cols., 1999; Stirone y cols., 2003; Wang y Abdel-Rahman, 2002; Widder y cols., 2003). De acuerdo con estos estudios, los resultados obtenidos en las ratonas SAM muestran que la ovariectomía induce una disminución en la expresión génica y proteica de la eNOS en ambas cepas, reducción que fue mayor en las ratonas SAMP8. El tratamiento con E2 de las ratonas ovariectomizadas restableció los niveles de expresión génica, lo que sugiere un efecto concomitante del envejecimiento y la ausencia de estrógenos en la reducción de la expresión de eNOS. Sin embargo, en otros estudios realizados en modelos animales, la ovariectomía per se no altera o aumenta la expresión de eNOS (Okano y cols., 2006; Wassmann y cols., 2001). Estas discrepancias entre estudios pueden representar diferencias en la duración de la ovariectomía, el análisis de homogeneizados tisulares, que contienen muchos tipos de células, en comparación a un único tipo celular o a diferencias en el origen anatómico del tejido o la especie estudiada.

5.2.1. PARTICIPACIÓN DE NO Y PROSTANOIDES EN LA RESPUESTA LA TXA₂

El U46619 es un vasoconstrictor que actúa a través de la activación del receptor TP. Diversos estudios han demostrado que los efectos de los estrógenos sobre la contracción al U46619 son complejos: en unos no modifican la respuesta contráctil (Darblade y cols., 2002; Miller y Vanhoutte, 1990; Zhang y Davidge, 1999), en otros la atenúan (Thompson y Weiner, 1997; Wang y cols., 2014) y en otros la potencian (Farhat y Ramwell, 1992; Martorell y cols., 2009; Song y cols., 2006; Vargas y cols., 1995). En nuestro estudio en aorta de ratonas SAMR1, la contracción inducida por el U46619 no se modificó por la ovariectomía ni por el tratamiento con E2. Sin embargo, en ratonas SAMP8, la ovariectomía incrementó la contracción al U46619, aumento que fue revertido por el E2. Estos resultados suponen un nuevo ejemplo de la compleja modulación de la contracción al U46619 por los estrógenos. En vasos en los que todavía no se han producido alteraciones vasculares inducidas por el envejecimiento (SAMR1), los estrógenos no modifican la contracción al U46619, mientras que en aquéllos en los que se ha producido disfunción vascular asociada al envejecimiento (SAMP8), la ausencia de estrógenos provoca un incremento de la contracción y el E2 revierte los efectos de la ovariectomía, pero no los del envejecimiento.

Las alteraciones en la contracción al U46619 inducidas por el envejecimiento o los estrógenos podrían estar mediadas por el NO. De hecho, la inhibición de la NOS incrementó la respuesta al U46619 en aorta de ratonas SAM, incremento que fue menor en las SAMP8, indicando que con la senescencia hay una menor biodisponibilidad de NO en respuesta al U46619. Estos resultados son consistentes con observaciones previas en las que el envejecimiento induce una menor biodisponibilidad de NO (Collins y Tzima, 2011; Taddei y cols., 1997, 1995). Por otra parte, la pérdida de los estrógenos abolió la participación del NO en la contracción al U46619 tanto en ratonas SAMR1 como en ratonas SAMP8. El tratamiento con E2

restableció los efectos de la ovariectomía sobre biodisponibilidad de NO, pero no los del envejecimiento. Estos resultados sugieren la existencia de alteraciones a nivel vascular inducidas por el envejecimiento que no serían revertidas por la presencia de los E2 (Sherwood y cols., 2007). Los resultados concuerdan con los obtenidos en arteria coronaria de cobayas ovariectomizadas donde la administración crónica de E2 disminuye la contractilidad de la arteria coronaria al U46619 a través de la síntesis de NO (Thompson y Weiner, 1997). Sin embargo, son contradictorios con los obtenidos en arteria mesentérica de ratas ovariectomizadas donde el E2 no modifica la síntesis de NO en respuesta al U46619 (Zhang y Davidge, 1999). De nuevo aparecen distintos resultados dependiendo de la especie y lecho vascular estudiado.

La disminución en la biodisponibilidad de NO explica muchas de las alteraciones vasculares asociadas al envejecimiento y a la falta de estrógenos, aunque en el control de la función vascular también podrían participar otras moléculas. En la regulación del tono vascular, los factores derivados de COX son particularmente importantes ya que pueden inducir tanto relajación (PGI₂) como contracción (TXA₂ y PGH₂) vascular. En vasos de individuos jóvenes y sanos hay una mayor producción de factores relajantes derivados de COX (Tang y Vanhoutte, 2008) y el tratamiento crónico con estrógenos aumenta la síntesis de PGI₂ en arterias cerebrales de pequeño calibre y en células endoteliales de arterial pulmonar (Jun y cols., 1998; Ospina y cols., 2002; Sherman y cols., 2002). Además, los estrógenos provocan cambios en el funcionamiento de la COX, que pasa de producir sustancias vasoconstrictoras a vasodilatadoras (Ospina y cols., 2003).

Para determinar el potencial efecto de los productos de la COX sobre la contracción al U46619 se inhibió la vía con indometacina. En aorta de ratonas SAM, la indometacina disminuyó la contracción al U46619 en todos los grupos, indicando que la activación del receptor TP induce la liberación de sustancias contráctiles derivadas de la COX. En arterias

mesentéricas de resistencia de rata se ha demostrado que la contracción inducida por el U46619 depende casi exclusivamente de derivados contráctiles de la COX (Bolla y cols., 2004). Además, estas sustancias contráctiles derivadas de la COX también participan de forma importante en la contracción inducida por diferentes estímulos como la angiotensina II (Silldorff y cols., 2002), la endotelina-1 (White y cols., 2002), y la fenilefrina (Bolla y cols., 2002).

La participación de las sustancias contráctiles derivadas de la COX se incrementó con la senescencia, puesto que en ratonas SAMP8 la indometacina produjo una mayor inhibición de la contracción al U46619. Es bien conocido que el envejecimiento induce un incremento en la producción de sustancias vasoconstrictoras dependientes de COX, que lleva a un aumento de la contracción vascular (Davidge, 2001; Davidge y cols., 1996; Rodríguez-Mañas y cols., 2009; Taddei y cols., 1997).

A nivel vascular, los estrógenos modifican la producción de sustancias vasoactivas derivadas de la COX (Davidge, 2001). En aorta de ratonas SAM, la ovariectomía indujo una mayor participación de sustancias contráctiles inducida por la COX en respuesta a la activación del receptor TP con U46619, aumento que fue mayor en las ratonas SAMP8. El efecto de la ovariectomía en la modulación de la síntesis y liberación de prostanoideos revirtió con el tratamiento con E2 en ambas cepas, pero no afectó al efecto del envejecimiento.

En ratonas SAM la inhibición conjunta de la NOS y la COX mediante el tratamiento con L-NAME e indometacina no modificó la contracción al U46619. Estos resultados sugieren una compleja modulación de la respuesta vascular al TXA₂ por el NO y los prostanoideos. Dicha modulación se mostró influenciada tanto por el envejecimiento como por la falta de estrógenos. La relación entre ambas rutas se ha observado en diferentes lechos vasculares que demuestran una estrecha interacción entre el NO y los prostanoideos (Cuzzocrea y Salvemini, 2007; Farb y cols., 2014; Mollace

y cols., 2005; Rosado y cols., 2012; Taddei y cols., 1997). Los resultados obtenidos en las ratonas Sham y ovariectomizadas tratadas con E2 sugieren la existencia de un balance entre la vasodilatación inducida por el NO derivado de la NOS y las prostaglandinas contráctiles derivadas de la COX, que regulan la contracción al U46619. En ratonas ovariectomizadas el balance se desplaza hacia una menor biodisponibilidad de NO y/o una mayor participación de prostaglandinas contráctiles. La participación del NO sólo se observa en presencia de indometacina, indicando que la función ovárica regula la biodisponibilidad del NO a través de la actividad de la COX.

En ratonas ovariectomizadas, el incremento observado de la actividad de la NOS cuando la COX está inhibida es un resultado que ilustra la compleja relación entre las dos vías. En diversas situaciones patológicas se ha demostrado que la actividad de la COX produce una menor biodisponibilidad de NO. La inhibición de la COX incrementa la relajación mediada por el NO en pacientes hipertensos (Taddei y cols., 1997), con insuficiencia renal crónica (Annuk y cols., 2002) y en sujetos obesos (Farb y cols., 2014). Además, se ha demostrado que la activación del receptor TP disminuye la actividad de la eNOS y la síntesis de NO (Ashton y Ware, 2004; Liu y cols., 2009).

Por otra parte, la COX también está implicada en la producción endotelial de especies reactivas de oxígeno durante su actividad, los cuales son un factor clave en la generación de contracciones dependientes de endotelio (Tang y cols., 2007; Tang y Vanhoutte, 2009; Yang y cols., 2002) y en la disminución de la biodisponibilidad de NO (Rubanyi y Vanhoutte, 1986).

5.2.2. GENERACIÓN DE O₂⁻ VASCULAR

Durante el envejecimiento se produce un incremento en los niveles de moléculas con carácter oxidativo implicadas en una gran cantidad de procesos fisiopatológicos. A nivel vascular, el aumento de moléculas

oxidantes en el endotelio altera procesos de gran importancia como la regulación del tono vascular, la permeabilidad vascular e infiltración de células inflamatorias hacia el interior de la pared vascular (Bachschmid y cols., 2013; Bottino y cols., 2015; Ritchie y cols., 2017; Wadley y cols., 2013). Entre las sustancias oxidantes, el O_2^- es una molécula oxidante de gran interés a nivel vascular.

Diversos estudios establecen un papel prioritario del estrés oxidativo en la disfunción endotelial asociada al envejecimiento (Eskurza y cols., 2004; Taddei y cols., 2001) y han proporcionado evidencias directas de una relación entre los marcadores oxidativos en células endoteliales y la disminución de la dilatación vascular dependiente del flujo asociada al envejecimiento (Donato y cols., 2007). Está ampliamente aceptado que el aumento de estrés oxidativo, particularmente el O_2^- , reduce la biodisponibilidad del NO e inhibe su principal diana, la guanilato ciclasa soluble (Feletou y Vanhoutte, 2006).

En las ratonas SAM, los niveles de O_2^- en secciones arteriales mostró la existencia de un aumento significativo de los niveles basales de O_2^- con la senescencia acelerada. Estos resultados concuerdan con los descritos en arterias mesentéricas humanas aisladas de sujetos ancianos que tenían niveles elevados de O_2^- (Rodríguez-Mañas y cols., 2009).

En ratonas SAMR1 ni la ovariectomía ni el tratamiento con E2 modificaron la producción basal de O_2^- . Por el contrario, en ratonas SAMP8 la ovariectomía incrementó los niveles basales de O_2^- , incremento que fue revertido por el tratamiento con E2. De forma similar, la ovariectomía en ratas hipertensas causa un aumento de los niveles de ROS que revierte con el tratamiento con E2 (Wassmann y cols., 2001). Diferentes estudios han demostrado la influencia del sexo sobre los niveles de ROS a nivel fisiológico, siendo estos inferiores en las hembras (Brandes y Mugge, 1997; Miller y cols., 2007). Además, se ha relacionado la presencia de elevados

niveles de ROS en mujeres postmenopáusicas, cuando es patente un descenso de los niveles de hormonas sexuales, concretamente de los estrógenos (Kander y cols., 2017; Vassalle y cols., 2012).

Estos resultados corroboran el papel antioxidante de los estrógenos tanto in vivo como in vitro a través de un efecto inhibitor en la producción y/o eliminación de ROS (Hermenegildo y cols., 2002; Sudoh y cols., 2001). Además, el tratamiento con estrógenos en animales ovariectomizados protege al NO de su oxidación por las ROS (Keaney Jr. y cols., 1994; Sudoh y cols., 2001). Existen evidencias que indican una contribución directa del estrés oxidativo en la disfunción endotelial asociada a la deficiencia de estrógenos en mujeres postmenopáusicas (Moreau y cols., 2013; Virdis y cols., 2000).

El TXA₂ induce la formación endógena de O₂⁻ que puede tener una importante repercusión en la fisiología vascular. La incubación de células endoteliales humanas y porcinas con U46619 aumenta la formación de O₂⁻ a través de la NADPH oxidasa (NOX) (Muzaffar y cols., 2011, 2004). En células de músculo liso vascular, el U46619 aumenta la expresión de NOX-1 y NOX-2 (Haba y cols., 2009; Koupparis y cols., 2005). Por lo tanto, el TXA₂ además de actuar como un factor contráctil derivado del endotelio, también puede ser un factor etiológico de la disfunción endotelial "clásica", es decir, disminuye la biodisponibilidad y/o las acciones del NO. De hecho, en las arterias pulmonares porcinas, la relajación a la acetilcolina y al nitroprusiato sódico, un dador de NO, se reducen en arterias contraídas con U46619 en comparación con las contraídas con noradrenalina o endotelina-1 (Perez-Vizcaino y cols., 1997). En conjunto, estos hallazgos indican que el TXA₂ induce un ciclo de retroalimentación positiva a través del cual se mantiene la formación de ROS y la vasoconstricción.

El U46619 incrementó los niveles de O₂⁻ en aorta de todos los grupos de estudio. En los grupos Sham, este incremento fue mayor en las SAMP8, sugiriendo que la senescencia favorece la generación de O₂⁻. El

mayor incremento de los niveles de O_2^- en respuesta al U46619 de las ratonas senescentes sugiere que el envejecimiento podría generar un entorno prooxidante que induciría disfunción endotelial. Estudios previos han demostrado que el TXA_2 incrementa los niveles de O_2^- y disminuye la biodisponibilidad de NO (Zhang y cols., 2011). Además, este incremento de O_2^- inducido por el U46619 estaría modulado por los estrógenos ya que, con la ovariectomía, ambas cepas SAM registraron un aumento de O_2^- que fue mayor en las ratonas SAMP8. El tratamiento con E2 revirtió el incremento del O_2^- inducido por el U46619, manteniendo las diferencias asociadas al envejecimiento.

Mediante la utilización del antioxidante tempol, un mímico de la superóxido dismutasa que elimina el O_2^- (Offer y cols., 2000; Simonsen y cols., 2009), se comprobó que la fluorescencia detectada en la pared vascular era debida al O_2^- . El tratamiento con tempol permitió confirmar la especificidad de la tinción con DHE y descartar posibles interferencias derivadas de la autofluorescencia del tejido vascular. La incubación con tempol disminuyó los niveles de fluorescencia en todos los grupos de estudio, así como el incremento inducido por el U46619, confirmando que las medidas realizadas eran debidas a la producción de O_2^- por la pared vascular.

La participación del receptor TP en el incremento de la producción de O_2^- se confirmó farmacológicamente con el antagonista del receptor TP GR32191B (Lumley y cols., 1989). El bloqueo del receptor TP abolió el incremento de O_2^- inducido por el U46619 en todos los grupos de estudio, indicando que la activación del receptor TP la que desencadena el incremento de O_2^- . Estudios previos en células endoteliales en cultivo y en aorta de ratón muestran que a través del receptor TP se aumenta la producción de O_2^- siendo éste un potente promotor de disfunción endotelial (Zhang y cols., 2011).

Experimentos previos realizados por el grupo de investigación demuestran que la senescencia acelerada y la ovariectomía incrementan la expresión proteica de receptores TP en aorta de ratonas SAMP8 (Novella y cols., 2010). Este incremento en la densidad de receptores TP en la senescencia podría estar relacionado con cambios en los niveles de O_2^- y con el aumento de la respuesta contráctil al U46619.

Diferentes enzimas están implicadas en el incremento de ROS a nivel celular. En condiciones fisiológicas, una de las principales enzimas oxidantes en la pared vascular es la NOX. También participan las mitocondrias y otros enzimas como la xantina oxidasa y la NOS desacoplada (Donato y cols., 2015; Landmesser y cols., 2003; Ray y cols., 2012). Además, la COX está implicada en la producción endotelial de O_2^- , que es un factor clave en la contracción dependiente de endotelio (Tang y cols., 2007; Tang y Vanhoutte, 2009; Yang y cols., 2002) y la disminución de la biodisponibilidad de NO (Rubanyi y Vanhoutte, 1986).

Para profundizar en las vías activadas por el receptor TP que incrementan los niveles de O_2^- durante el envejecimiento y la ausencia de estrógenos, se analizó la posible participación de la NOX. La apocinina no modificó los niveles basales de O_2^- en ningún grupo de estudio. Estudios previos en ratonas SAM realizados por el grupo de investigación demuestran un descenso de la actividad de la NOX inducida por los estrógenos en ratonas SAMR1 y un aumento en las SAMP8 (Novensa y cols., 2011), sin embargo, estos cambios no se traducen en los niveles basales de O_2^- observados en nuestro estudio.

La apocinina es un inhibidor de NOX particularmente interesante. El compuesto en sí no es un inhibidor de la NOX, sino más bien un profármaco con acciones antioxidantes (Heumuller y cols., 2008). En su activación por peroxidasas, la apocinina forma un radical que forma aductos con p47^{phox} (Ximenes y cols., 2007) y también forma polímeros de apocinina, que actúan como inhibidores de la NOX a través de un mecanismo de acción

desconocido (Mora-Pale y cols., 2012). Es importante destacar que la activación de la apocinina da como resultado la formación de un radical y, por lo tanto, puede inducir estrés oxidativo (Riganti y cols., 2006). Por lo tanto, los datos obtenidos con apocinina se deben interpretar con mucha cautela (Brandes y cols., 2014).

En células endoteliales aórticas el TXA_2 a través de su receptor TP activa a la NOX (Zhang y cols., 2011). En ratonas SAMR1 la apocinina no modificó el incremento de O_2^- inducido por U46619, mientras que en las SAMP8 Sham y ovariectomizadas lo inhibió parcialmente (~ 20%), sugiriendo un papel del envejecimiento y la pérdida de estrógenos en la activación de la NOX. El tratamiento con E2 eliminó la participación de la NOX en la producción de O_2^- . Aunque los efectos de la apocinina hay que interpretarlos con cautela, indican la presencia de otras fuentes distintas a la NOX que producirían O_2^- cuando son activadas por el U46619.

Entre las posibles vías que podrían participar en la producción de O_2^- se analizó la de la COX en el eje TXA_2 – TP – O_2^- . La COX puede ser una fuente de O_2^- durante la síntesis de prostaglandinas o el metabolismo de peróxidos debido a su capacidad de oxidar sustancias como la NADPH (Kukreja y cols., 1986; Wolin, 2000). De hecho, la activación de la COX es la principal fuente de O_2^- en la corteza cerebral tras un proceso de isquemia/reperfusión (Armstead y cols., 1988). Además, la COX tiene un mecanismo inusual de activación por peróxidos, que implica la oxidación de su grupo hemo a una forma que cataliza la generación de prostaglandinas y el peróxido producido (PGG_2) ayuda a mantener su propia producción (Wei y cols., 1995). La disponibilidad de peróxidos, incluido el H_2O_2 , estimula la actividad de la COX y es uno de los mecanismos más importantes que controlan la biosíntesis de las prostaglandinas por parte de los tejidos (Hemler y cols., 1979).

En aorta de ratonas SAM la indometacina no modificó los niveles basales de O_2^- en ningún grupo de estudio, pero inhibió el incremento de O_2^- inducido por el U46619. Estos resultados descartan a la COX como responsable de los niveles basales de O_2^- . Sin embargo, su actividad, bien por generar O_2^- o sustancias que favorezcan su producción, es responsable del incremento de los niveles de O_2^- inducido por el U46619 y de sus variaciones por el envejecimiento y la pérdida de estrógenos.

El eje TXA_2 -TP-COX a través de la formación de O_2^- se presenta como una vía que disminuye la biodisponibilidad de NO y cuya importancia aumenta durante el envejecimiento y la falta de estrógenos en el modelo de envejecimiento y menopausia en ratonas SAM. Los siguientes estudios se diseñaron con la intención de determinar la isoforma de la COX implicada en estos eventos.

5.2.3. CONTRIBUCIÓN DE COX-1 Y COX-2 EN LA RESPUESTA LA TXA_2

La COX-1 y COX-2 se expresan en las células endoteliales y de músculo liso vascular, y sus niveles de expresión son 20 veces más altos en las células endoteliales que en las de músculo liso (DeWitt y cols., 1983). En el endotelio, ambas isoformas se expresan constitutivamente (Doroudi y cols., 2000; Funk y FitzGerald, 2007). Sin embargo, también son inducibles por estímulos como el estrés de flujo (Doroudi y cols., 2000; Topper y cols., 1996). Las células endoteliales expresan COX-1 de forma preferente a COX-2 (Kawka y cols., 2007; Onodera y cols., 2000), aunque ambas están involucradas en las alteraciones de la respuesta vascular dependiente de endotelio (Heymes y cols., 2000). En la presente Tesis la participación de cada isoforma en la respuesta contráctil al U46619 se estudió farmacológicamente mediante el inhibidor específico de la COX-1, SC560 y el de la COX-2, celecoxib.

En aorta de ratonas SAM, el SC560 no modificó la contracción al U46619 en ningún grupo de estudio, descartando una posible participación de la COX-1 en el descenso de la vasoconstricción observada con la indometacina. Cuando se inhibió la COX-1 junto a la NOS, el U46619 causó un incremento de la contracción en todos los grupos. Este incremento fue similar al mostrado previamente con L-NAME a excepción de las ratonas ovariectomizadas, que aumentaron la contracción al U46619. El incremento de la contracción al U46619 en aorta de ratonas ovariectomizadas sugiere una contribución de la COX-1 en la disminución de la biodisponibilidad de NO inducida por la pérdida de estrógenos.

El análisis de la expresión génica y proteica de la COX-1 en aorta de ratonas SAMR1 y SAMP8 demostró que los niveles de mRNA de COX-1 no se modificaron por el envejecimiento ni por los estrógenos. Sin embargo, la expresión proteica de COX-1 disminuyó en los grupos ovariectomizados y tratados con E2. Estos resultados contrastan con estudios moleculares realizados en células endoteliales de ratas envejecidas que muestran un aumento en los niveles de mRNA de COX-1 (Tang y Vanhoutte, 2008). Además, el E2 incrementa la expresión de la COX-1 en células endoteliales (Gibson y cols., 2005; Jun y cols., 1998; Ospina y cols., 2002). También se ha demostrado una elevada expresión proteica de COX-1 en arterias (Matz y cols., 2000) y en células vasculares (Tang y Vanhoutte, 2008) obtenidas de ratas envejecidas.

Por el contrario, los resultados concuerdan con los obtenidos en aorta de ratas ovariectomizadas, en las que la ovariectomía no modifica la expresión de COX-1 (Martorell y cols., 2009), aunque otros estudios han descrito una disminución de su expresión (Korita y cols., 2004). Estas discrepancias podrían ser debidas a las diferentes condiciones experimentales, ovariectomía frente a administración aguda de estrógenos en células en cultivo, edad a la que se realizó el estudio, tiempo de la ovariectomía, etc. En el modelo descrito en la presente Tesis se han comparado ratonas de 6 meses de edad con un mes de evolución tras la

ovariectomía con ratonas con el ciclo intacto, en las que los ovarios liberan diferentes hormonas o factores ováricos que podrían estar involucrados en la regulación vascular (Arias-Loza y cols., 2006). Sin embargo, las ratonas ovariectomizadas únicamente se trataron con E2.

La inhibición de la COX-2 disminuyó la contracción al U46619 en todos los grupos de estudio. Esta disminución fue mayor en ratonas SAMP8 indicando una mayor participación de sustancias contráctiles derivadas de la COX-2 en ratonas senescentes. La COX-2 parece ser la isoforma predominante implicada en el incremento de la respuesta contráctil asociada al envejecimiento (Stewart y cols., 2000). En ratonas SAMR1 la contribución de las sustancias contráctiles derivadas de la COX-2 no fue afectada por los estrógenos. Por el contrario, en ratonas SAMP8 la ovariectomía aumentó las sustancias contráctiles derivadas de la COX-2, incremento que fue revertido por el tratamiento con E2.

El estudio de la interacción de la COX-2 con la NOS se realizó mediante la inhibición con celecoxib y L-NAME. En ratonas SAMR1, la inhibición de ambas rutas no modificó la contracción al U46619 en ningún grupo. Los resultados obtenidos en las ratonas SAMR1 Sham y ovariectomizadas tratadas con E2 sugieren la existencia de un balance entre la vasodilatación inducida por el NO derivado de la NOS y las prostaglandinas contráctiles derivadas de la COX-2, que regulan la contracción al U46619. En ratonas SAMR1 ovariectomizadas el balance se desplaza hacia una menor biodisponibilidad de NO y/o una mayor participación de prostaglandinas contráctiles. La participación del NO sólo se observa en presencia de celecoxib, indicando que la función ovárica regula la biodisponibilidad del NO a través de la actividad de la COX-2.

En las ratonas SAMP8, la incubación conjunta de celecoxib y L-NAME disminuyó la contracción al U46619. Al igual que en SAMR1 se observa una disminución en la biodisponibilidad del NO y un aumento de prostaglandinas contráctiles. En ratonas ovariectomizadas, cuando se

bloquean las dos rutas se observa un aumento en la biodisponibilidad del NO, lo que sugiere que en ausencia de la modulación mediada por NOS y COX-2 las diferencias observadas entre ratonas SAMR1 y SAMP8 son debidas a mecanismos dependientes del envejecimiento.

La COX-2 desempeña un importante papel en la regulación del tono vascular de aorta de hámsteres jóvenes que muestran contracciones dependientes del endotelio mediadas por el receptor TP que aumentan en hámsteres viejos (Wong y cols., 2009). Asimismo, una inhibición de la COX-2 restablece la relajación dependiente del endotelio a valores normales y anula las contracciones inducidas por la acetilcolina en pequeñas arterias mesentéricas de ratas viejas (Álvarez de Sotomayor y cols., 2007). Se ha descrito que el envejecimiento vascular se acompaña de un fenotipo proinflamatorio (El Assar y cols., 2013), que podría conducir a una mayor expresión de COX-2, lo que ha sido confirmado por varios estudios llevados a cabo en diferentes modelos de envejecimiento (Heymes y cols., 2000; Matz y cols., 2000). La expresión de COX-2 aumenta en muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, así como en tejidos humanos y de ratones viejos. Por este motivo se ha involucrado a la COX-2 en el proceso de envejecimiento y se la ha propuesto junto a sus vías de señalización como posibles dianas terapéuticas para prevenir el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad (Kim y cols., 2016).

En aorta de ratonas SAM no se modificó la expresión génica y proteica de la COX-2, excepto en el grupo de ratonas SAMP8 ovariectomizadas, donde confluyen los efectos del envejecimiento y la falta de estrógenos. La aparición de diferencias en este grupo sugiere que el envejecimiento y la ausencia de estrógenos tienen efectos sinérgicos que inducen la expresión de COX-2. Probablemente a edades más avanzadas se podría observar un incremento en la expresión de COX-2, como ha sido descrito en células endoteliales de ratas viejas (Tang y Vanhoutte, 2008). El

tratamiento con E2 revirtió los efectos de la ovariectomía, pero no los del envejecimiento.

Por otra parte, se ha descrito que la ovariectomía aumenta la expresión de la COX-2 en aorta de ratas (Martorell y cols., 2009) así como un aumento de la formación de O_2^- (Sagredo y cols., 2007), lo que podría inducir a su vez una mayor expresión de COX-2 (Feng y cols., 1995).

Los resultados funcionales obtenidos en aorta de ratonas SAM muestran una participación conjunta de COX-1 y COX-2 en la respuesta contráctil al U46619. Mientras la actividad de la COX-1 inducida por el U46619 se pone de manifiesto por una menor biodisponibilidad de NO cuando hay una pérdida de estrógenos, la COX-2 muestra una mayor activación durante el envejecimiento que se incrementa con la ausencia de estrógenos.

Por otra parte, se determinó la contribución de COX-1 y COX-2 en la producción de O_2^- basal e inducida por el U46619 en secciones arteriales en presencia de SC560, celecoxib y ambos inhibidores conjuntamente. La inhibición de la COX-1 no modificó los niveles basales de O_2^- pero anuló el incremento de O_2^- inducido por el U46619 en las ratonas SAM de los grupos Sham y ovariectomizadas tratadas con E2. En cambio, en los grupos de ratonas ovariectomizadas, revirtió parcialmente el incremento inducido por el U46619.

La inhibición de COX-2 no alteró la producción basal de O_2^- en ningún grupo de estudio. El incremento de O_2^- inducido por el U46619 tampoco se modificó con la inhibición con celecoxib en ratonas Sham y ovariectomizadas tratadas con E2 de ambas cepas, indicando que la COX-2 no altera los niveles de O_2^- inducidos por la activación del receptor TP. Sin embargo, en las ratonas ovariectomizadas el celecoxib disminuyó parcialmente el O_2^- inducido por el U46619, lo que sugiere una participación de la COX-2 en la generación de O_2^- en ausencia de estrógenos. La COX-2

es la isoforma que contribuye activamente a la producción de O_2^- vascular en la hipertensión esencial (Viridis y cols., 2013). Diversos datos experimentales identifican a esta isoforma como una importante fuente vascular de ROS (Leopold y Loscalzo, 2005; O'Banion, 1999). De hecho, datos clínicos indican que la inhibición de la COX-2 reduce la concentración plasmática de LDL oxidada, un marcador de peroxidación lipídica (Gay y cols., 2001).

El tratamiento conjunto con ambos inhibidores, SC560 y celecoxib, inhibió el aumento de los niveles de O_2^- vascular en respuesta al U46619 en todos los grupos de estudio, coincidiendo con los resultados previos obtenidos con el tratamiento con indometacina. En conjunto, los resultados sugieren que el aumento de los niveles de O_2^- inducido por el U46619 procedería de COX-1 en presencia de estrógenos y de COX-1 y COX-2 en ausencia de estrógenos.

5.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Para una adecuada interpretación de los resultados mostrados en la presente Tesis hay que tener en cuenta que se ha utilizado un modelo murino de envejecimiento que presenta un patrón de senescencia acelerada, pudiendo manifestar alteraciones moleculares diferentes a las del envejecimiento en humanos o otros modelos murinos con un envejecimiento normal. Por otra parte, se ha inducido una menopausia experimental mediante ovariectomía con el objetivo de obtener un modelo de estudio que permita simular las alteraciones vasculares que se suceden en las mujeres a partir de la menopausia. La cirugía se realizó debido a que, a diferencia de los humanos, los roedores no muestran una senescencia reproductiva hasta las etapas finales de su vida, manteniendo elevadas concentraciones de E2 en sangre.

En la realización de los experimentos se han utilizado preparaciones arteriales aisladas con el objetivo de estudiar alteraciones asociadas al

envejecimiento y a los estrógenos. La extrapolación de los resultados obtenidos en ratones a humanos no siempre es directa a pesar de existir grandes similitudes, pero podrían haber diferencias en la regulación vascular entre las dos especies. Además, cualquier experimento in vitro relacionado con la respuesta vascular debe ser valorado con cautela cuando se intenta extrapolar a la situación in vivo, debido especialmente a la ausencia de la regulación neurohumoral y del flujo sanguíneo, que están presentes en el organismo vivo. La existencia de mecanismos compensatorios a una respuesta que puedan suceder in vivo sólo puede observarse en el vaso aislado como manifestaciones limitadas al propio órgano efector, en nuestro caso la pared vascular. A pesar de ello, su estudio sigue siendo necesario para poder conocer los mecanismos moleculares implicados en las alteraciones vasculares inducidos de forma individualizada por fármacos. En este sentido, la presencia de reflejos y otras adaptaciones cardiovasculares in vivo constituye casi siempre una limitación cuando se quiere valorar la respuesta del órgano efector, más aún cuando se pretende estudiar los efectos de fármacos o sustancias que afectan diversos órganos de forma simultánea y coordinada.

5.4. IMPLICACIONES CLÍNICAS

El envejecimiento y las enfermedades cardiovasculares se asocian con múltiples alteraciones vasculares que conducen a disfunción endotelial, que a menudo implican la activación de la COX y el estímulo del receptor TP. En general, la producción de EDCF no influye significativamente en la presión arterial sistémica, pero la activación de TP amplifica la disfunción endotelial (Feletou y cols., 2009). Dado que en la mayoría de los casos la activación de los receptores TP es el efector, los antagonistas selectivos de este receptor podrían ser de interés terapéutico en el tratamiento de los trastornos cardiovasculares. En pacientes con enfermedad coronaria, la disminución en la vasodilatación del antebrazo inducida por acetilcolina y flujo se restablece mediante la administración de un antagonista del

receptor TP (Belhassen y cols., 2003). En pacientes con enfermedad coronaria severa, la inhibición de COX-2 también mejoró la dilatación mediada por flujo (Chenevard y cols., 2003). Estos resultados indican que la COX-1, COX-2 o ambas isoformas pueden contribuir a la disfunción endotelial, como se ha observado en modelos animales.

Los resultados en ratonas SAM mostrados en la presente Tesis aportan conocimientos de los mecanismos subyacentes al fenotipo vasoconstrictor asociados al envejecimiento y la pérdida de estrógenos.

6. CONCLUSIONES/*CONCLUSIONS*

6.1. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis se puede concluir que:

1. La cepa de ratonas SAMP8 presenta características fenotípicas y alteraciones funcionales similares a las observadas en humanos durante el envejecimiento, mostrando un incremento de la contracción vascular asociada a la disfunción endotelial antes que la cepa control SAMR1.
2. La ovariectomía causa una disminución en la biodisponibilidad de NO en ambas cepas de ratonas que se restablece con el tratamiento con 17 β -estradiol. Parte de esta disminución podría ser causada por una disminución de la expresión de la eNOS con el envejecimiento y la falta de estrógenos.
3. El tratamiento con indometacina muestra la participación de la COX en el mecanismo de contracción mediado por el receptor TP e indica la existencia de una modulación de la biodisponibilidad de NO vascular a través de la producción de O₂⁻.
4. La COX-1 disminuye la biodisponibilidad del NO mediante la producción de O₂⁻ en ausencia de estrógenos tanto en ratonas SAMR1 como en ratonas SAMP8.
5. La COX-2 participa en la contracción al TXA₂ a través de la producción de sustancias vasoconstrictoras que incrementan con el envejecimiento y la falta de estrógenos. En ausencia de estrógenos, la activación del receptor TP induce la producción de O₂⁻ derivados de la COX-2. Además, la expresión del enzima aumenta en ausencia de estrógenos en ratonas SAMP8.
6. En conjunto, los resultados implican al receptor TP en la disminución de la biodisponibilidad de NO endotelial inducida por el envejecimiento, efecto que está potenciado por la falta de estrógenos. Por ello, se propone al

receptor TP como una posible diana terapéutica para la mejora de la función vascular en mujeres a partir de la menopausia.

6.2. CONCLUSIONS

From the results shown in this thesis it might be concluded that:

1. The SAMP8 mouse strain presents phenotypic characteristics and functional alterations similar to those observed in humans during ageing, showing an increase in vascular contraction associated with endothelial dysfunction that are manifested earlier than in the control strain SAMR1.
2. Ovariectomy decreases NO bioavailability in both mice strains, which is restored with 17β -estradiol treatment. This decrease, at least in part, could be due to the decreased eNOS expression observed in ageing and the lack of estrogen.
3. Indomethacin treatment shows the COX participation in the mechanism of contraction mediated by the TP receptor activation, and reveals a decreased NO bioavailability probably mediated through the increased production of O_2^- .
4. COX-1 decreases NO bioavailability through the production of O_2^- during estrogen withdrawal in both SAMR1 and SAMP8 mice.
5. COX-2 participates in the contraction of TXA_2 through the production of vasoconstrictor substances that are increased by ageing and estrogen withdrawal. TP receptor activation induces COX-2 derived O_2^- production in the absence of estrogens. Furthermore, COX-2 expression is increased in the absence of estrogens in SAMP8 mice.
6. Overall the results indicate a TP receptor involvement in the decreased endothelial NO bioavailability during ageing, an effect that is enhanced by the lack of estrogen. Therefore, TP receptor is proposed as a possible therapeutic target for the improvement of vascular function in menopausal women.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aird, W.C., 2012. Endothelial Cell Heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006429.
- Aird, W.C., 2008. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep* 60, 139–143.
- Aird, W.C., 2007a. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100, 158–173.
- Aird, W.C., 2007b. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 100, 174–190.
- Aird, W.C., 2004. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med* 32, S271-9.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593–615.
- Alfranca, A., Iñiguez, M.A., Fresno, M., Redondo, J.M., 2006. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: Role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 70, 446–456.
- Álvarez de Sotomayor, M., Mingorance, C., Andriantsitohaina, R., 2007. Fenofibrate improves age-related endothelial dysfunction in rat resistance arteries. *Atherosclerosis* 193, 112–120.
- Andrew, P.J., Mayer, B., 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43, 521–531.
- Angulo, J., Vallejo, S., El Assar, M., García-Septiem, J., Sánchez-Ferrer, C.F., Rodríguez-Mañas, L., 2012. Age-related differences in the effects of α and γ peroxisome proliferator-activated receptor subtype agonists on endothelial vasodilation in human microvessels. *Exp Gerontol* 47, 734–740.
- Annuk, M., Fellstrom, B., Lind, L., 2002. Cyclooxygenase inhibition improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant* 17, 2159–2163.
- Arevalo, M.A., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., 2015. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci* 16, 17–29.
- Arias-Loza, P.A., Hu, K., Schafer, A., Bauersachs, J., Quaschnig, T., Galle, J., Jazbutyte, V., Neyses, L., Ertl, G., Fritzemeier, K.-H., Hegele-Hartung, C., Pelzer, T., 2006. Medroxyprogesterone acetate but not drospirenone ablates

- the protective function of 17 beta-estradiol in aldosterone salt-treated rats. *Hypertens.* (Dallas, Tex. 1979) 48, 994–1001.
- Armstead, W.M., Mirro, R., Busija, D.W., Leffler, C.W., 1988. Postischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain. *Am. J. Physiol.* 255, H403.
- Amal, J.F., Fontaine, C., Billon-Gales, A., Favre, J., Laurell, H., Lenfant, F., Gourdy, P., 2010. Estrogen receptors and endothelium. *Arter. Thromb Vasc Biol* 30, 1506–1512.
- Ashton, A.W., Ware, J.A., 2004. Thromboxane A2 receptor signaling inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation and migration. *Circ Res* 95, 372–379.
- Augustin, H.G., Kozian, D.H., Johnson, R.C., 1994. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 16, 901–906.
- Bachschmid, M.M., Schildknecht, S., Matsui, R., Zee, R., Haeussler, D., Cohen, R.A., Pimental, D., Loo, B., 2013. Vascular aging: chronic oxidative stress and impairment of redox signaling-consequences for vascular homeostasis and disease. *Ann Med* 45, 17–36.
- Badimon, L., Martinez-Gonzalez, J., 2002. Endothelium and vascular protection: an update. *Rev Esp Cardiol* 55 Suppl 1, 17–26.
- Bairey Merz, C.N., Shaw, L.J., Reis, S.E., Bittner, V., Kelsey, S.F., Olson, M., Johnson, B.D., Pepine, C.J., Mankad, S., Sharaf, B.L., Rogers, W.J., Pohost, G.M., Lerman, A., Quyyumi, A.A., Sopko, G., 2006. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part II: gender differences in presentation, diagnosis, and outcome with regard to gender-based pathophysiology of atherosclerosis and macrovascular and microvascular cor. *J Am Coll Cardiol* 47, S21-9.
- Balsinde, J., Winstead, M. V, Dennis, E.A., 2002. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* 531, 2–6.
- Baquedano, M.S., Saraco, N., Berenzstein, E., Pepe, C., Bianchini, M., Levy, E., Goni, J., Rivarola, M.A., Belgorosky, A., 2007. Identification and

- developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2215–2222.
- Barja, G., 2013. Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts. *Antioxid Redox Signal* 19, 1420–1445.
- Barnes, J.N., Hart, E.C., Curry, T.B., Nicholson, W.T., Eisenach, J.H., Wallin, B.G., Charkoudian, N., Joyner, M.J., 2014. Aging enhances autonomic support of blood pressure in women. *Hypertension* 63, 303–308.
- Barros, R.P., Gustafsson, J.A., 2011. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab* 14, 289–299.
- Bauer, J., Ripperger, A., Frantz, S., Ergun, S., Schwedhelm, E., Benndorf, R.A., 2014. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A2 receptor activation. *Br J Pharmacol* 171, 3115–3131.
- Beldekas, J.C., Smith, B., Gerstenfeld, L.C., Sonenshein, G.E., Franzblau, C., 1981. Effects of 17 beta-estradiol on the biosynthesis of collagen in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Biochemistry* 20, 2162–2167.
- Belhassen, L., Pelle, G., Dubois-Rande, J.L., Adnot, S., 2003. Improved endothelial function by the thromboxane A2 receptor antagonist S 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *J Am Coll Cardiol* 41, 1198–1204.
- Berezan, D.J., Xu, Y., Falck, J.R., Kundu, A.P., Davidge, S.T., 2008. Ovariectomy, but not estrogen deficiency, increases CYP4A modulation of alpha(1)-adrenergic vasoconstriction in aging female rats. *Am J Hypertens* 21, 685–690.
- Bermudez, V., Bermudez, F., Acosta, G., Acosta, A., Anez, J., Andara, C., Leal, E., Cano, C., Manuel, V., Hernandez, R., Israili, Z., 2008. Molecular mechanisms of endothelial dysfunction: from nitric oxide synthesis to ADMA inhibition. *Am J Ther* 15, 326–333.
- Bittner, V., 2009. Postmenopausal hormone therapy and the risk of cardiovascular disease. *Expert Opin Pharmacother* 10, 2041–2053.

- Black, S.M., Mata-Greenwood, E., Dettman, R.W., Ovadia, B., Fitzgerald, R.K., Reinhartz, O., Thelitz, S., Steinhorn, R.H., Gerrets, R., Hendricks-Munoz, K., Ross, G.A., Bekker, J.M., Johengen, M.J., Fineman, J.R., 2003. Emergence of smooth muscle cell endothelin B-mediated vasoconstriction in lambs with experimental congenital heart disease and increased pulmonary blood flow. *Circulation* 108, 1646–1654.
- Boardman, H.M., Hartley, L., Eisinga, A., Main, C., Roque i Figuls, M., Bonfill Cosp, X., Gabriel Sanchez, R., Knight, B., 2015. Hormone therapy for preventing cardiovascular disease in post-menopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* Cd002229.
- Bode-Boger, S.M., Muke, J., Surdacki, A., Brabant, G., Boger, R.H., Frolich, J.C., 2003. Oral L-arginine improves endothelial function in healthy individuals older than 70 years. *Vasc Med* 8, 77–81.
- Bogatcheva, N. V, Sergeeva, M.G., Dudek, S.M., Verin, A.D., 2005. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc. Res.* 69, 107–127.
- Bolla, M., Matrougui, K., Loufrani, L., Maclouf, J., Levy, B., Levy-Toledano, S., Habib, A., Henrion, D., 2002. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane-induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. *J. Vasc. Res.* 39, 353–360.
- Bolla, M., You, D., Loufrani, L., Levy, B.I., Levy-Toledano, S., Habib, A., Henrion, D., 2004. Cyclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 43, 1264–1269.
- Botting, R.M., 2006. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 5, 113–124.
- Bottino, D.A., Lopes, F.G., de Oliveira, F.J., Mecnas Ade, S., Clapauch, R., Bouskela, E., 2015. Relationship between biomarkers of inflammation, oxidative stress and endothelial/microcirculatory function in successful aging versus healthy youth: a transversal study. *BMC Geriatr* 15, 41.
- Brandes, R.P., Mugge, A., 1997. Gender differences in the generation of superoxide anions in the rat aorta. *Life Sci* 60, 391–396.

- Brandes, R.P., Weissmann, N., Schroder, K., 2014. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic. Biol. Med.* 76, 208–226.
- Briones, A.M., Montoya, N., Giraldo, J., Vila, E., 2005. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Aut. Autacoid Pharmacol* 25, 155–162.
- Brunner, H., Cockcroft, J.R., Deanfield, J., Donald, A., Ferrannini, E., Halcox, J., Kiowski, W., Luscher, T.F., Mancina, G., Natali, A., Oliver, J.J., Pessina, A.C., Rizzoni, D., Rossi, G.P., Salvetti, A., Spieker, L.E., Taddei, S., Webb, D.J., 2005. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 23, 233–246.
- Burford, T.W., 2016. Hypertension and aging. *Ageing Res Rev* 26, 96–111.
- Buñag, R.D., 1973. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J. Appl. Physiol.* 34, 279–282.
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A(2) structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50, S237–S242.
- Burns, K.A., Korach, K.S., 2012. Estrogen receptors and human disease: an update. *Arch Toxicol* 86, 1491–1504.
- Butterfield, D.A., Poon, H.F., 2005. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 40, 774–783.
- Camici, G.G., Savarese, G., Akhmedov, A., Luscher, T.F., 2015. Molecular mechanism of endothelial and vascular aging: implications for cardiovascular disease. *Eur Hear. J* 36, 3392–3403.
- Capel, I.D., Jenner, M., Williams, D.C., Donaldson, D., Nath, A., 1981. The effect of prolonged oral contraceptive steroid use on erythrocyte glutathione peroxidase activity. *J Steroid Biochem* 14, 729–732.

- Capper, E.A., Marshall, L.A., 2001. Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Prog Lipid Res* 40, 167–197.
- Carr, M.C., 2003. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2404–2411.
- Carrasquilla, G.D., Frumento, P., Berglund, A., Borgfeldt, C., Bottai, M., Chiavenna, C., Eliasson, M., Engstrom, G., Hallmans, G., Jansson, J.H., Magnusson, P.K., Nilsson, P.M., Pedersen, N.L., Wolk, A., Leander, K., 2017. Postmenopausal hormone therapy and risk of stroke: A pooled analysis of data from population-based cohort studies. *PLoS Med* 14, e1002445.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., 2012. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Adv Med Sci* 57, 31–36.
- Carter, T.A., Greenhall, J.A., Yoshida, S., Fuchs, S., Helton, R., Swaroop, A., Lockhart, D.J., Barlow, C., 2005. Mechanisms of aging in senescence-accelerated mice. *Genome Biol* 6, R48.
- Cemadas, M.R., Sanchez de Miguel, L., Garcia-Duran, M., Gonzalez-Fernandez, F., Millas, I., Monton, M., Rodrigo, J., Rico, L., Fernandez, P., de Frutos, T., Rodríguez-Feo, J.A., Guerra, J., Caramelo, C., Casado, S., Lopez, F., 1998. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res* 83, 279–286.
- Chambliss, K.L., Shaul, P.W., 2002. Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. *Steroids* 67, 413–419.
- Chamorro, A., 2009. TP receptor antagonism: a new concept in atherothrombosis and stroke prevention. *Cerebrovasc Dis* 27 Suppl 3, 20–27.
- Chandra, S., Romero, M.J., Shatanawi, A., Alkilany, A.M., Caldwell, R.B., Caldwell, R.W., 2012. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol* 165, 506–519.
- Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., Shaul, P.W., 1999. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103, 401–406.

- Chenevard, R., Hurlimann, D., Bechir, M., Enseleit, F., Spieker, L., Hermann, M., Riesen, W., Gay, S., Gay, R.E., Neidhart, M., Michel, B., Luscher, T.F., Noll, G., Ruschitzka, F., 2003. Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation* 107, 405–409.
- Collins, C., Tzima, E., 2011. Hemodynamic forces in endothelial dysfunction and vascular aging. *Exp Gerontol* 46, 185–188.
- Costa, G., Garabito, M., Jimenez-Altayo, F., Onetti, Y., Sabate, M., Vila, E., Dantas, A.P., 2016. Sex differences in angiotensin II responses contribute to a differential regulation of cox-mediated vascular dysfunction during aging. *Exp Gerontol* 85, 71–80.
- Crews, J.K., Khalil, R.A., 1999. Gender-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 707–715.
- Crofford, L.J., 1997. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl* 49, 15–19.
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J.G., Kaminski, P., Wolin, M.S., Koller, A., Kaley, G., 2002. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res* 90, 1159–1166.
- Cui, J., Shen, Y., Li, R., 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med* 19, 197–209.
- Cui, J.G., Kuroda, H., Chandrasekharan, N. V., Pelaez, R.P., Simmons, D.L., Bazan, N.G., Lukiw, W.J., 2004. Cyclooxygenase-3 gene expression in Alzheimer hippocampus and in stressed human neural cells. *Neurochem Res* 29, 1731–1737.
- Cuzzocrea, S., Salvemini, D., 2007. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. *Kidney Int* 71, 290–297.
- D'Agostino Sr., R.B., Pencina, M.J., Massaro, J.M., Coady, S., 2013. Cardiovascular Disease Risk Assessment: Insights from Framingham. *Glob Hear.* 8, 11–23.

- da Cunha, V., Rossoni, L. V., Oliveira, P.A., Poton, S., Pretti, S.C., Vassallo, D. V., Stefanon, I., 2000. Cyclooxygenase inhibition reduces blood pressure elevation and vascular reactivity dysfunction caused by inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Clin Exp Hypertens* 22, 203–215.
- Dai, D.F., Rabinovitch, P.S., 2009. Cardiac aging in mice and humans: the role of mitochondrial oxidative stress. *Trends Cardiovasc Med* 19, 213–220.
- Dantas, A.P., Franco Mdo, C., Silva-Antonialli, M.M., Tostes, R.C., Fortes, Z.B., Nigro, D., Carvalho, M.H., 2004. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovasc Res* 61, 22–29.
- Dantas, A.P., Scivoletto, R., Fortes, Z.B., Nigro, D., Carvalho, M.H., 1999. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34, 914–919.
- Dantas, A.P., Tostes, R.C., Fortes, Z.B., Costa, S.G., Nigro, D., Carvalho, M.H., 2002. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 39, 405–411.
- Darblade, B., Pendaries, C., Krust, A., Dupont, S., Fouque, M.-J., Rami, J., Chambon, P., Bayard, F., Arnal, J.-F., 2002. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ. Res.* 90, 413–419.
- Davidge, S.T., 2001. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res* 89, 650–660.
- Davidge, S.T., Hubel, C.A., McLaughlin, M.K., 1996. Impairment of vascular function is associated with an age-related increase of lipid peroxidation in rats. *Am J Physiol* 271, R1625-31.
- Davidge, S.T., Zhang, Y., 1998. Estrogen replacement suppresses a prostaglandin H synthase-dependent vasoconstrictor in rat mesenteric arteries. *Circ Res* 83, 388–395.

- Davies, N.M., McLachlan, A.J., Day, R.O., Williams, K.M., 2000. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet* 38, 225–242.
- de Belchior, A.C., Angeli, J.K., Faria Tde, O., Siman, F.D., Silveira, E.A., Meira, E.F., da Costa, C.P., Vassallo, D. V, Padilha, A.S., 2012. Post-weaning protein malnutrition increases blood pressure and induces endothelial dysfunctions in rats. *PLoS One* 7, e34876.
- de Sotomayor, M.A., Perez-Guerrero, C., Herrera, M.D., Jimenez, L., Marin, R., Marhuenda, E., Andriantsitohaina, R., 2005. Improvement of age-related endothelial dysfunction by simvastatin: effect on NO and COX pathways. *Br J Pharmacol* 146, 1130–1138.
- del Campo, L., Sagredo, A., Aras-Lopez, R., Balfagon, G., Ferrer, M., 2008. Orchidectomy increases the formation of non-endothelial thromboxane A2 and modulates its role in the electrical field stimulation-induced response in rat mesenteric artery. *J Endocrinol* 197, 371–379.
- DeSouza, C.A., Shapiro, L.F., Clevenger, C.M., Dinunno, F.A., Monahan, K.D., Tanaka, H., Seals, D.R., 2000. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation* 102, 1351–1357.
- Devillier, P., Bessard, G., 1997. Thromboxane A2 and related prostaglandins in airways. *Fundam Clin Pharmacol* 11, 2–18.
- DeWitt, D.L., Day, J.S., Sonnenburg, W.K., Smith, W.L., 1983. Concentrations of prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin I2 synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta. *J. Clin. Invest.* 72, 1882–1888.
- Dikalova, A.E., Bikineyeva, A.T., Budzyn, K., Nazarewicz, R.R., McCann, L., Lewis, W., Harrison, D.G., Dikalov, S.I., 2010. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ Res* 107, 106–116.
- Donahue, R.P., Bean, J.A., Donahue, R.A., Goldberg, R.B., Prineas, R.J., 1997. Insulin response in a triethnic population: effects of sex, ethnic origin, and body fat. *Miami Community Health Study. Diabetes Care* 20, 1670–1676.

- Donato, A.J., Eskurza, I., Silver, A.E., Levy, A.S., Pierce, G.L., Gates, P.E., Seals, D.R., 2007. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res* 100, 1659–1666.
- Donato, A.J., Morgan, R.G., Walker, A.E., Lesniewski, L.A., 2015. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 89, 122–135.
- Doroudi, R., Gan, L.M., Selin Sjogren, L., Jern, S., 2000. Effects of shear stress on eicosanoid gene expression and metabolite production in vascular endothelium as studied in a novel biomechanical perfusion model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 257–264.
- Doughan, A.K., Harrison, D.G., Dikalov, S.I., 2008. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 102, 488–496.
- Drummond, G.R., Sobey, C.G., 2014. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol Metab* 25, 452–463.
- Eckers, A., Haendeler, J., 2015. Endothelial cells in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 22, 1209–1211.
- Edwards, D.P., 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67, 335–376.
- El Assar, M., Angulo, J., Rodríguez-Mañas, L., 2013. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic Biol Med* 65, 380–401.
- El Assar, M., Angulo, J., Vallejo, S., Peiro, C., Sanchez-Ferrer, C.F., Rodríguez-Mañas, L., 2012. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol* 3, 132.
- Erusalimsky, J.D., 2009. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol* 106, 326–332.
- Eskurza, I., Monahan, K.D., Robinson, J.A., Seals, D.R., 2004. Effect of acute and chronic ascorbic acid on flow-mediated dilatation with sedentary and physically active human ageing. *J Physiol* 556, 315–324.

- Farb, M.G., Tiwari, S., Karki, S., Ngo, D.T.M., Carmine, B., Hess, D.T., Zuriaga, M.A., Walsh, K., Fetterman, J.L., Hamburg, N.M., Vita, J.A., Apovian, C.M., Gokce, N., 2014. Cyclooxygenase inhibition improves endothelial vasomotor dysfunction of visceral adipose arterioles in human obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 22, 349–355.
- Farhat, M.Y., Ramwell, P.W., 1992. Estradiol potentiates the vasopressor response of the isolated perfused rat lung to the thromboxane mimic U-46619. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 686–691.
- Feletou, M., Huang, Y., Vanhoutte, P.M., 2011. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 164, 894–912.
- Feletou, M., Vanhoutte, P.M., 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* 291, H985-1002.
- Feletou, M., Vanhoutte, P.M., 2006. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1215–1225.
- Feletou, M., Verbeuren, T.J., Vanhoutte, P.M., 2009. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol* 156, 563–574.
- Feng, L., Xia, Y., Garcia, G.E., Hwang, D., Wilson, C.B., 1995. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 95, 1669–1675.
- Fenton, M., Huang, H.L., Hong, Y., Hawe, E., Kurz, D.J., Erusalimsky, J.D., 2004. Early atherogenesis in senescence-accelerated mice. *Exp Gerontol* 39, 115–122.
- Ferrari, A.U., Radaelli, A., Centola, M., 2003. Invited review: aging and the cardiovascular system. *J Appl Physiol* 95, 2591–2597.
- Ferrer, M., Osol, G., 1998. Estrogen replacement modulates resistance artery smooth muscle and endothelial alpha2-adrenoceptor reactivity. *Endothelium* 6, 133–141.

- Filardo, E., Quinn, J., Pang, Y., Graeber, C., Shaw, S., Dong, J., Thomas, P., 2007. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148, 3236–3245.
- FitzGerald, G.A., 2003. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 2, 879–890. <https://doi.org/10.1038/nrd1225>
- Flammer, A.J., Anderson, T., Celermajer, D.S., Creager, M.A., Deanfield, J., Ganz, P., Hamburg, N.M., Luscher, T.F., Shechter, M., Taddei, S., Vita, J.A., Lerman, A., 2012. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* 126, 753–767.
- Flammer, A.J., Luscher, T.F., 2010. Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly* 140, w13122.
- Forstermann, U., Munzel, T., 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113, 1708–1714.
- Forstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Hear. J* 33, 829–37, 837a–837d.
- Forstermann, U., Xia, N., Li, H., 2017. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res* 120, 713–735.
- Fortepiani, L.A., Zhang, H., Racusen, L., Roberts 2nd, L.J., Reckelhoff, J.F., 2003. Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 41, 640–645.
- Francois, H., Athirakul, K., Mao, L., Rockman, H., Coffman, T.M., 2004. Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension. *Hypertension* 43, 364–369.
- Freay, A.D., Curtis, S.W., Korach, K.S., Rubanyi, G.M., 1997. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta. Role of nuclear estrogen receptor and Ca²⁺ uptake. *Circ Res* 81, 242–248.

- Fu, X.D., Simoncini, T., 2008. Extra-nuclear signaling of estrogen receptors. *IUBMB Life* 60, 502–510.
- Funk, C.D., FitzGerald, G.A., 2007. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 470–479.
- Furchgott, R.F., 1988. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide.
- Furchgott, R.F., Cherry, P.D., Zawadzki, J. V, Jothianandan, D., 1984. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 2, S336-43.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J. V, 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.
- Galley, H.F., Webster, N.R., 2004. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 93, 105–113.
- Gambacciani, M., Rosano, G.M., Monteleone, P., Fini, M., Genazzani, A.R., 2002. Clinical relevance of the HERS trial. *Lancet* 360, 641.
- Gao, Y., 2010. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch* 459, 829–839.
- Garavito, R.M., Mulichak, A.M., 2003. The structure of mammalian cyclooxygenases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32, 183–206.
- Garcia-Redondo, A.B., Briones, A.M., Martinez-Revelles, S., Palao, T., Vila, L., Alonso, M.J., Salaices, M., 2015. c-Src, ERK1/2 and Rho kinase mediate hydrogen peroxide-induced vascular contraction in hypertension: role of TXA2, NAD(P)H oxidase and mitochondria. *J Hypertens* 33, 77–87.
- Gay, R.E., Neidhart, M., Pataky, F., Tries, S., Laufer, S., Gay, S., 2001. Dual inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenases 1 and 2 by ML3000 reduces joint destruction in adjuvant arthritis. *J. Rheumatol.* 28, 2060–2065.
- Geisler, J., 2003. Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86, 245–253.

- George, M.J., Kharbanda, R., MacAllister, R.J., 2012. The role of the endothelium in the pathogenesis of atherosclerosis and its therapeutic implications. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* 12, 279–288. 1
- Ghazal, S., Pal, L., 2013. Perspective on hormone therapy 10 years after the WHI. *Maturitas* 76, 208–212.
- Gibson, L.L., Hahner, L., Osborne-Lawrence, S., German, Z., Wu, K.K., Chambliss, K.L., Shaul, P.W., 2005. Molecular basis of estrogen-induced cyclooxygenase type 1 upregulation in endothelial cells. *Circ. Res.* 96, 518–525.
- Gisclard, V., Flavahan, N.A., Vanhoutte, P.M., 1987. Alpha adrenergic responses of blood vessels of rabbits after ovariectomy and administration of 17 beta-estradiol. *J Pharmacol Exp Ther* 240, 466–470.
- Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Franco, S., Fullerton, H.J., Gillespie, C., Hailpern, S.M., Heit, J.A., Howard, V.J., Huffman, M.D., Kissela, B.M., Kittner, S.J., Lackland, D.T., Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Magid, D., Marcus, G.M., Marelli, A., Matchar, D.B., McGuire, D.K., Mohler, E.R., Moy, C.S., Mussolino, M.E., Nichol, G., Paynter, N.P., Schreiner, P.J., Sorlie, P.D., Stein, J., Turan, T.N., Virani, S.S., Wong, N.D., Woo, D., Turner, M.B., 2013. Heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127, e6–e245.
- Grady, D., Applegate, W., Bush, T., Furberg, C., Riggs, B., Hulley, S.B., 1998. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics. *Control Clin Trials* 19, 314–335.
- Grady, D., Herrington, D., Bittner, V., Blumenthal, R., Davidson, M., Hlatky, M., Hsia, J., Hulley, S., Herd, A., Khan, S., Newby, L.K., Waters, D., Vittinghoff, E., Wenger, N., 2002. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama* 288, 49–57.
- Grodstein, F., Manson, J.E., Stampfer, M.J., 2006. Hormone therapy and coronary heart disease: the role of time since menopause and age at hormone initiation. *J Womens Heal.* 15, 35–44.

- Grohe, C., Kann, S., Fink, L., Djoufack, P.C., Paehr, M., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R., Fink, K.B., 2004. 17 Beta-estradiol regulates nNOS and eNOS activity in the hippocampus. *Neuroreport* 15, 89–93.
- Guo, X., Lu, X., Ren, H., Levin, E.R., Kassab, G.S., 2006. Estrogen modulates the mechanical homeostasis of mouse arterial vessels through nitric oxide. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 290, H1788–H1797.
- Gurney, E.P., Nachtigall, M.J., Nachtigall, L.E., Naftolin, F., 2014. The Women's Health Initiative trial and related studies: 10 years later: a clinician's view. *J Steroid Biochem Mol Biol* 142, 4–11.
- Haba, M., Kinoshita, H., Matsuda, N., Azma, T., Hama-Tomioka, K., Hatakeyama, N., Yamazaki, M., Hatano, Y., 2009. Beneficial effect of propofol on arterial adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel function impaired by thromboxane. *Anesthesiology* 111, 279–286.
- Hall, J., Jones, T.H., Channer, K.S., Jones, R.D., 2006. Mechanisms of agonist-induced constriction in isolated human mesenteric arteries. *Vasc. Pharmacol* 44, 427–433.
- Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B., 1975. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2994–2998.
- Hammes, S.R., Levin, E.R., 2007. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 28, 726–741.
- Han, J., Hosokawa, M., Umezawa, M., Yagi, H., Matsushita, T., Higuchi, K., Takeda, T., 1998. Age-related changes in blood pressure in the senescence-accelerated mouse (SAM): aged SAMP1 mice manifest hypertensive vascular disease. *Lab Anim Sci* 48, 256–263.
- Han, S.Z., Karaki, H., Ouchi, Y., Akishita, M., Orimo, H., 1995. 17 beta-Estradiol inhibits Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release induced by thromboxane A₂ in porcine coronary artery. *Circulation* 91, 2619–2626.
- Harvey, A., Montezano, A.C., Touyz, R.M., 2015. Vascular biology of ageing—Implications in hypertension. *J Mol Cell Cardiol* 83, 112–121.

- Hayashi, T., Yano, K., Matsui-Hirai, H., Yokoo, H., Hattori, Y., Iguchi, A., 2008. Nitric oxide and endothelial cellular senescence. *Pharmacol Ther* 120, 333–339.
- He, G.W., Yang, C.Q., 1999. Inhibition of vasoconstriction by the thromboxane A2 antagonist GR32191B in the human radial artery. *Br J Clin Pharmacol* 48, 207–215.
- Hemler, M.E., Cook, H.W., Lands, W.E., 1979. Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 193, 340–345.
- Hermenegildo, C., Garcia-Martinez, M.C., Tarin, J.J., Cano, A., 2002a. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by the pure antiestrogens ICI 182780 and EM-652 (SCH 57068). *Menopause* 9, 430–435.
- Hermenegildo, C., Medina, P., Peiro, M., Segarra, G., Vila, J.M., Ortega, J., Lluch, S., 2002b. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5636–5640.
- Heumuller, S., Wind, S., Barbosa-Sicard, E., Schmidt, H.H.H.W., Busse, R., Schroder, K., Brandes, R.P., 2008. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 51, 211–217.
- Heymes, C., Habib, A., Yang, D., Mathieu, E., Marotte, F., Samuel, J., Boulanger, C.M., 2000. Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing. *Br J Pharmacol* 131, 804–810.
- Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Kimura, M., Noma, K., Hara, K., Jitsuiki, D., Goto, C., Oshima, T., Chayama, K., Yoshizumi, M., 2006. Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production. *Atherosclerosis* 186, 390–395.
- Hill, B.J.F., Dalton, R.J., Joseph, B.K., Thakali, K.M., Rusch, N.J., 2017. 17beta-estradiol reduces Cav1.2 channel abundance and attenuates Ca(2+) - dependent contractions in coronary arteries. *Pharmacol Res Perspect* 5.
- Hirata, T., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Okuma, M., Narumiya, S., 1996. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to

- adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest* 97, 949–956.
- Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Hayakawa, J., Kanda, Y., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Miyoshi, E., Fujiwara, N., Taniguchi, N., Murata, Y., 2001. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 3459–3467.
- Hla, T., 1996. Molecular characterization of the 5.2 KB isoform of the human cyclooxygenase-1 transcript. *Prostaglandins* 51, 81–85.
- Hodis, H.N., Mack, W.J., Henderson, V.W., Shoupe, D., Budoff, M.J., Hwang-Levine, J., Li, Y., Feng, M., Dustin, L., Kono, N., Stanczyk, F.Z., Selzer, R.H., Azen, S.P., 2016. Vascular Effects of Early versus Late Postmenopausal Treatment with Estradiol. *N Engl J Med* 374, 1221–1231.
- Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B., Vittinghoff, E., 1998. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama* 280, 605–613.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9265–9269.
- INE, 2017. Informe de Defunciones por causa de Muerte. Año 2015. Instituto Nacional de Estadística.
- Inoue, T., Miki, Y., Abe, K., Hatori, M., Hosaka, M., Kariya, Y., Kakuo, S., Fujimura, T., Hachiya, A., Honma, S., Aiba, S., Sasano, H., 2012. Sex steroid synthesis in human skin in situ: the roles of aromatase and steroidogenic acute regulatory protein in the homeostasis of human skin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 362, 19–28.
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., Herz, J., 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92, 883–893.
- Jull, J., Stacey, D., Beach, S., Dumas, A., Strychar, I., Uffholz, L.A., Prince, S., Abdulnour, J., Prud'homme, D., 2014. Lifestyle interventions targeting body

- weight changes during the menopause transition: a systematic review. *J Obes* 2014, 824310.
- Jun, S.S., Chen, Z., Pace, M.C., Shaul, P.W., 1998. Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *J. Clin. Invest.* 102, 176–183.
- Kam, P.C.A., So, A., 2009. COX-3: Uncertainties and controversies. *Curr. Anaesth. Crit. Care* 20, 50–53.
- Kander, M.C., Cui, Y., Liu, Z., 2017. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med* 21, 1024–1032.
- Kannel, W.B., 2002. The Framingham Study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women. *J Gend Specif Med* 5, 27–37.
- Karas, R.H., Patterson, B.L., Mendelsohn, M.E., 1994. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 89, 1943–1950.
- Kawka, D.W., Ouellet, M., Hetu, P.-O., Singer, I.I., Riendeau, D., 2007. Double-label expression studies of prostacyclin synthase, thromboxane synthase and COX isoforms in normal aortic endothelium. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 45–54.
- Keaney Jr., J.F., Shwaery, G.T., Xu, A., Nicolosi, R.J., Loscalzo, J., Foxall, T.L., Vita, J.A., 1994. 17 beta-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation* 89, 2251–2259.
- Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K., He, J., 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365, 217–223.
- Keung, W., Vanhoutte, P.M., Man, R.Y., 2005. Nongenomic responses to 17beta-estradiol in male rat mesenteric arteries abolish intrinsic gender differences in vascular responses. *Br J Pharmacol* 146, 1148–1155.
- Kim, J., Vaish, V., Feng, M., Field, K., Chatzistamou, I., Shim, M., 2016. Transgenic expression of cyclooxygenase-2 (COX2) causes premature aging phenotypes in mice. *Aging (Albany, NY)*. 8, 2392–2406.

- Kim, J.H., Bugaj, L.J., Oh, Y.J., Bivalacqua, T.J., Ryoo, S., Soucy, K.G., Santhanam, L., Webb, A., Camara, A., Sikka, G., Nyhan, D., Shoukas, A.A., Ilies, M., Christianson, D.W., Champion, H.C., Berkowitz, D.E., 2009. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J Appl Physiol* 107, 1249–1257.
- Kitazawa, T., Hamada, E., Kitazawa, K., Gaznabi, A.K., 1997. Non-genomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *J Physiol* 499 (Pt 2, 497–511.
- Kobayashi, T., Tahara, Y., Matsumoto, M., Iguchi, M., Sano, H., Murayama, T., Arai, H., Oida, H., Yurugi-Kobayashi, T., Yamashita, J.K., Katagiri, H., Majima, M., Yokode, M., Kita, T., Narumiya, S., 2004. Roles of thromboxane A₂ and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 114, 784–794.
- Korita, D., Itoh, H., Sagawa, N., Yura, S., Yoshida, M., Kakui, K., Takemura, M., Fujii, S., 2004. 17beta-estradiol up-regulates prostacyclin production in cultured human uterine myometrial cells via augmentation of both cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase expression. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 11, 457–464.
- Koupparis, A.J., Jeremy, J.Y., Muzaffar, S., Persad, R., Shukla, N., 2005. Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47 NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A₂ mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. *BJU Int.* 96, 423–427.
- Kraehling, J.R., Sessa, W.C., 2017. Contemporary Approaches to Modulating the Nitric Oxide-cGMP Pathway in Cardiovascular Disease. *Circ Res* 120, 1174–1182.
- Kroller-Schon, S., Steven, S., Kossmann, S., Scholz, A., Daub, S., Oelze, M., Xia, N., Hausding, M., Mikhed, Y., Zinssius, E., Mader, M., Stamm, P., Treiber, N., Scharffetter-Kochanek, K., Li, H., Schulz, E., Wenzel, P., Munzel, T., Daiber, A., 2014. Molecular mechanisms of the crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase through reactive oxygen species-studies in white blood cells and in animal models. *Antioxid Redox Signal* 20, 247–266.

- Kukreja, R.C., Kontos, H.A., Hess, M.L., Ellis, E.F., 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ. Res.* 59, 612–619.
- Lacey Jr., J. V, 2014. The WHI ten year's later: an epidemiologist's view. *J Steroid Biochem Mol Biol* 142, 12–15.
- Lakatta, E.G., 2015. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J Mol Cell Cardiol* 83, 1–13.
- Lakatta, E.G., Levy, D., 2003. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation* 107, 139–146.
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S.R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S.M., Mitch, W.E., Harrison, D.G., 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111, 1201–1209.
- Landmesser, U., Homig, B., Drexler, H., 2004. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 109, li27-33.
- Landmesser, U., Spiekermann, S., Preuss, C., Sorrentino, S., Fischer, D., Manes, C., Mueller, M., Drexler, H., 2007. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arter. Thromb Vasc Biol* 27, 943–948.
- Lassègue, B., Griendling, K.K., 2010. NADPH oxidases: Functions and pathologies in the vasculature. *Arter. Thromb Vasc Biol* 30.
- Laubichler, M.D., Aird, W.C., Maienschein, J., 2007. The Endothelium in History, in: Aird, W.C. (Ed.), *Endothelial Biomedicine*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 3–20.
- LeBlanc, A.J., Reyes, R., Kang, L.S., Dailey, R.A., Stallone, J.N., Moninga, N.C., Muller-Delp, J.M., 2009. Estrogen replacement restores flow-induced vasodilation in coronary arterioles of aged and ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297, R1713-23.

- LeBlanc, A.J., Shipley, R.D., Kang, L.S., Muller-Delp, J.M., 2008. Age impairs Flk-1 signaling and NO-mediated vasodilation in coronary arterioles. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* 295, H2280-8.
- Lekontseva, O.N., Rueda-Clausen, C.F., Morton, J.S., Davidge, S.T., 2010. Ovariectomy in aged versus young rats augments matrix metalloproteinase-mediated vasoconstriction in mesenteric arteries. *Menopause* 17, 516–523.
- Leopold, J.A., Loscalzo, J., 2005. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1332–1340.
- Leslie, C.C., 2015. Cytosolic phospholipase A(2): physiological function and role in disease. *J Lipid Res* 56, 1386–1402.
- Levin, E.R., 2009. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 20, 477–482.
- Li, H., Wallerath, T., Forstermann, U., 2002. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7, 132–147.
- Lisabeth, L.D., Beiser, A.S., Brown, D.L., Murabito, J.M., Kelly-Hayes, M., Wolf, P.A., 2009. Age at natural menopause and risk of ischemic stroke: the Framingham heart study. *Stroke* 40, 1044–1049.
- Liu, B., Zhang, Y., Zhu, N., Li, H., Luo, W., Zhou, Y., 2013. A vasoconstrictor role for cyclooxygenase-1-mediated prostacyclin synthesis in mouse renal arteries. *Am J Physiol Ren. Physiol* 305, F1315-22.
- Liu, C.Q., Leung, F.P., Wong, S.L., Wong, W.T., Lau, C.W., Lu, L., Yao, X., Yao, T., Huang, Y., 2009. Thromboxane prostanoid receptor activation impairs endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxations: the role of Rho kinase. *Biochem Pharmacol* 78, 374–381.
- Llorens, S., de Mera, R.M., Pascual, A., Prieto-Martin, A., Mendizabal, Y., de Cabo, C., Nava, E., Jordan, J., 2007. The senescence-accelerated mouse (SAM-P8) as a model for the study of vascular functional alterations during aging. *Biogerontology* 8, 663–672.
- Lluch, P., Segarra, G., Medina, P., 2015. Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 21, 9466–9475.

- Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217.
- Louet, J.F., LeMay, C., Mauvais-Jarvis, F., 2004. Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Curr Atheroscler Rep* 6, 180–185.
- Lumley, P., White, B.P., Humphrey, P.P., 1989. GR32191, a highly potent and specific thromboxane A2 receptor blocking drug on platelets and vascular and airways smooth muscle in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 97, 783–794.
- Magness, R.R., Sullivan, J.A., Li, Y., Phernetton, T.M., Bird, I.M., 2001. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VI. Ovarian and pregnancy effects on eNOS and NO(x). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H1692-8.
- Manson, J.E., Chlebowski, R.T., Stefanick, M.L., Aragaki, A.K., Rossouw, J.E., Prentice, R.L., Anderson, G., Howard, B. V, Thomson, C.A., LaCroix, A.Z., Wactawski-Wende, J., Jackson, R.D., Limacher, M., Margolis, K.L., Wassertheil-Smoller, S., Beresford, S.A., Cauley, J.A., Eaton, C.B., Gass, M., Hsia, J., Johnson, K.C., Kooperberg, C., Kuller, L.H., Lewis, C.E., Liu, S., Martin, L.W., Ockene, J.K., O'Sullivan, M.J., Powell, L.H., Simon, M.S., Van Horn, L., Vitolins, M.Z., Wallace, R.B., 2013. Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials. *JAMA* 310, 1353–1368.
- Maranon, R., Reckelhoff, J.F., 2013. Sex and gender differences in control of blood pressure. *Clin Sci* 125, 311–318.
- Maric-Bilkan, C., Gilbert, E.L., Ryan, M.J., 2014. Impact of ovarian function on cardiovascular health in women: focus on hypertension. *Int J Womens Heal.* 6, 131–139.
- Martinez-Revelles, S., Avendano, M.S., Garcia-Redondo, A.B., Álvarez, Y., Aguado, A., Perez-Giron, J. V, Garcia-Redondo, L., Esteban, V., Redondo, J.M., Alonso, M.J., Briones, A.M., Salaces, M., 2013. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 18, 51–65.

- Martorell, A., Sagredo, A., Aras-Lopez, R., Balfagon, G., Ferrer, M., 2009. Ovariectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in acetylcholine-induced relaxation and nitric oxide release in the rat aorta. *Cardiovasc Res* 84, 300–308.
- Matz, R.L., Andriantsitohaina, R., 2003. Age-related endothelial dysfunction : potential implications for pharmacotherapy. *Drugs Aging* 20, 527–550.
- Matz, R.L., de Sotomayor, M.A., Schott, C., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R., 2000a. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br J Pharmacol* 131, 303–311.
- Matz, R.L., Schott, C., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R., 2000b. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res* 49, 11–18.
- McCormick, S.M., Whitson, P.A., Wu, K.K., McIntire, L. V, 2000. Shear stress differentially regulates PGHS-1 and PGHS-2 protein levels in human endothelial cells. *Ann Biomed Eng* 28, 824–833.
- McNally, J.S., Davis, M.E., Giddens, D.P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., Jo, H., Harrison, D.G., 2003. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* 285, H2290-7.
- McNeill, A.M., Kim, N., Duckles, S.P., Krause, D.N., Kontos, H.A., 1999. Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke* 30, 2186–2190.
- Mehta, J.L., Lawson, D., Mehta, P., Saldeen, T., 1988. Increased prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4511–4515.
- Meyer, M.R., Prossnitz, E.R., Barton, M., 2011. The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vasc. Pharmacol* 55, 17–25.
- Michel, F.S., Man, R.Y., Vanhoutte, P.M., 2007. Increased spontaneous tone in renal arteries of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* 293, H1673-81.

- Miggin, S.M., Kinsella, B.T., 1998. Expression and tissue distribution of the mRNAs encoding the human thromboxane A2 receptor (TP) alpha and beta isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1425, 543–559.
- Mikkola, T.S., Clarkson, T.B., 2002. Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res* 53, 605–619.
- Miller, A.A., De Silva, T.M., Jackman, K.A., Sobey, C.G., 2007. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 1037–1043.
- Miller, V.M., Black, D.M., Brinton, E.A., Budoff, M.J., Cedars, M.I., Hodis, H.N., Lobo, R.A., Manson, J.E., Merriam, G.R., Naftolin, F., Santoro, N., Taylor, H.S., Harman, S.M., 2009. Using Basic Science to Design a Clinical Trial: Baseline Characteristics of Women Enrolled in the Kronos Early Estrogen Prevention Study (KEEPS). *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2, 228–239.
- Miller, V.M., Duckles, S.P., 2008. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev* 60, 210–241.
- Miller, V.M., Vanhoutte, P.M., 1990. 17 beta-Estradiol augments endothelium-dependent contractions to arachidonic acid in rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* 258, R1502-7.
- Minoves, N., Balfagon, G., Ferrer, M., 2002. Role of female sex hormones in neuronal nitric oxide release and metabolism in rat mesenteric arteries. *Clin Sci* 103, 239–247.
- Miyosawa, K., Sasaki, M., Ohkubo, S., Nakahata, N., 2006. Different pathways for activation of extracellular signal-regulated kinase through thromboxane A2 receptor isoforms. *Biol Pharm Bull* 29, 719–724.
- Moers, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Wettschureck, N., Gruner, S., Konrad, I., Schulte, V., Aktas, B., Gratacap, M.P., Simon, M.I., Gawaz, M., Offermanns, S., 2003. G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nat Med* 9, 1418–1422.
- Moiens-Afshari, F., Kenyon, E., Choy, J.C., Battistini, B., McManus, B.M., Laher, I., 2003. Long-term effects of ovariectomy and estrogen replacement treatment on endothelial function in mature rats. *Maturitas* 45, 213–223.

- Mollace, V., Muscoli, C., Masini, E., Cuzzocrea, S., Salvemini, D., 2005. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 57, 217–252.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002–2012.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38, 1709–1715.
- Monsalve, E., Oviedo, P.J., Garcia-Perez, M.A., Tarin, J.J., Cano, A., Hermenegildo, C., 2007. Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 73, 66–72.
- Mora-Pale, M., Kwon, S.J., Linhardt, R.J., Dordick, J.S., 2012. Trimer hydroxylated quinone derived from apocynin targets cysteine residues of p47phox preventing the activation of human vascular NADPH oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 962–969.
- Moreau, K.L., Hildreth, K.L., 2014. Vascular Aging across the Menopause Transition in Healthy Women. *Adv Vasc Med* 2014.
- Moreau, K.L., Stauffer, B.L., Kohrt, W.M., Seals, D.R., 2013. Essential role of estrogen for improvements in vascular endothelial function with endurance exercise in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 98, 4507–4515.
- Morinelli, T.A., Zhang, L.M., Newman, W.H., Meier, K.E., 1994. Thromboxane A₂/prostaglandin H₂-stimulated mitogenesis of coronary artery smooth muscle cells involves activation of mitogen-activated protein kinase and S6 kinase. *J Biol Chem* 269, 5693–5698.
- Morita, I., 2002. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68–69, 165–175.
- Muller, K.A., Chatterjee, M., Rath, D., Geisler, T., 2015. Platelets, inflammation and anti-inflammatory effects of antiplatelet drugs in ACS and CAD. *Thromb Haemost* 114, 498–518.

- Murphy, J.G., Khalil, R.A., 1999. Decreased $[Ca^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther* 291, 44–52.
- Muzaffar, S., Shukla, N., Lobo, C., Angelini, G.D., Jeremy, J.Y., 2004. Iloprost inhibits superoxide formation and gp91phox expression induced by the thromboxane A₂ analogue U46619, 8-isoprostane F₂ α , prostaglandin F₂ α , cytokines and endotoxin in the pig pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* 141, 488–496.
- Muzaffar, S., Shukla, N., Massey, Y., Angelini, G.D., Jeremy, J.Y., 2011. NADPH oxidase 1 mediates upregulation of thromboxane A₂ synthase in human vascular smooth muscle cells: inhibition with iloprost. *Eur. J. Pharmacol.* 658, 187–192.
- Nakahata, N., 2008. Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* 118, 18–35.
- Needleman, P., Moncada, S., Bunting, S., Vane, J.R., Hamberg, M., Samuelsson, B., 1976. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature* 261, 558–560.
- Nelson, J.F., Goodrick, G., Karelus, K., Felicio, L.S., 1989. Longitudinal studies of estrous cyclicity in C57BL/6J mice: III. Dietary modulation declines during aging. *Mech Ageing Dev* 48, 73–84.
- Neri Semeri, G.G., Gensini, G.F., Abbate, R., Mugnaini, C., Favilla, S., Brunelli, C., Chierchia, S., Parodi, O., 1981. Increased fibrinopeptide A formation and thromboxane A₂ production in patients with ischemic heart disease: relationships to coronary pathoanatomy, risk factors, and clinical manifestations. *Am Hear. J* 101, 185–194.
- Niccoli, T., Partridge, L., 2012. Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol* 22, R741-52.
- Niu, C., Wang, X., Zhao, M., Cai, T., Liu, P., Li, J., Willard, B., Zu, L., Zhou, E., Li, Y., Pan, B., Yang, F., Zheng, L., 2016. Macrophage Foam Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Adhesion. *J Am Hear. Assoc* 5.

- Novella, S., Dantas, A.P., Segarra, G., Novensa, L., Bueno, C., Heras, M., Hermenegildo, C., Medina, P., 2010. Gathering of aging and estrogen withdrawal in vascular dysfunction of senescent accelerated mice. *Exp Gerontol* 45, 868–874.
- Novella, S., Dantas, A.P., Segarra, G., Novensa, L., Heras, M., Hermenegildo, C., Medina, P., 2013. Aging enhances contraction to thromboxane A2 in aorta from female senescence-accelerated mice. *Age* 35, 117–128.
- Novella, S., Dantas, A.P., Segarra, G., Vidal-Gómez, X., Mompeón, A., Garabito, M., Hermenegildo, C., Medina, P., 2013. Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression. *Exp. Gerontol.* 48.
- Novella, S., Heras, M., Hermenegildo, C., Dantas, A.P., 2012. Effects of estrogen on vascular inflammation: a matter of timing. *Arter. Thromb Vasc Biol* 32, 2035–2042.
- Novensa, L., Novella, S., Medina, P., Segarra, G., Castillo, N., Heras, M., Hermenegildo, C., Dantas, A.P., 2011. Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ERalpha/ERbeta balance in female mice. *PLoS One* 6, e25335.
- Nurmi, J.T., Puolakkainen, P.A., Rautonen, N.E., 2005. Intron 1 retaining cyclooxygenase 1 splice variant is induced by osmotic stress in human intestinal epithelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fat. Acids* 73, 343–350.
- Nuutila, P., Knuuti, M.J., Maki, M., Laine, H., Ruotsalainen, U., Teras, M., Haaparanta, M., Solin, O., Yki-Jarvinen, H., 1995. Gender and insulin sensitivity in the heart and in skeletal muscles. Studies using positron emission tomography. *Diabetes* 44, 31–36.
- O'Banion, M.K., 1999. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit. Rev. Neurobiol.* 13, 45–82.
- O'Donnell, C.J., Elosua, R., 2008. [Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study]. *Rev Esp Cardiol* 61, 299–310.

- O'Rourke, M.F., Hashimoto, J., 2007. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol* 50, 1–13.
- Offer, T., Russo, A., Samuni, A., 2000. The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 1215–1223.
- Offermanns, S., Laugwitz, K.L., Spicher, K., Schultz, G., 1994. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 504–508.
- Ogletree, M.L., 1987. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A2. *Fed Proc* 46, 133–138.
- Okano, H., Jayachandran, M., Yoshikawa, A., Miller, V.M., 2006. Differential effects of chronic treatment with estrogen receptor ligands on regulation of nitric oxide synthase in porcine aortic endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47, 621–628.
- Onodera, M., Morita, Mano, Y., Murota, S., 2000. Differential effects of nitric oxide on the activity of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 in vascular endothelial cells. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 62, 161–167.
- Ospina, J.A., Duckles, S.P., Krause, D.N., 2003. 17beta-estradiol decreases vascular tone in cerebral arteries by shifting COX-dependent vasoconstriction to vasodilation. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* 285, H241-50.
- Ospina, J.A., Krause, D.N., Duckles, S.P., 2002. 17beta-estradiol increases rat cerebrovascular prostacyclin synthesis by elevating cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase. *Stroke* 33, 600–605.
- Palea, S., Toson, G., Pietra, C., Trist, D.G., Artibani, W., Romano, O., Corsi, M., 1998. Pharmacological characterization of thromboxane and prostanoid receptors in human isolated urinary bladder. *Br J Pharmacol* 124, 865–872.
- Palmer, M.A., Piper, P.J., Vane, J.R., 1970. The release of rabbit aorta contracting substance (RCS) from chopped lung and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* 40, 581p–582p.
- Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988. Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664–666.

- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526.
- Paneni, F., Diaz Canestro, C., Libby, P., Luscher, T.F., Camici, G.G., 2017. The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. *J Am Coll Cardiol* 69, 1952–1967.
- Paravicini, T.M., Touyz, R.M., 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31 Suppl 2, S170-80.
- Perez-Vizcaino, F., Villamor, E., Duarte, J., Tamargo, J., 1997. Involvement of protein kinase C in reduced relaxant responses to the NO/cyclic GMP pathway in piglet pulmonary arteries contracted by the thromboxane A₂-mimetic U46619. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1323–1333.
- Petronio, M.S., Zeraik, M.L., Fonseca, L.M., Ximenes, V.F., 2013. Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. *Molecules* 18, 2821–2839.
- Pfister, S.L., Kotulock, D.A., Campbell, W.B., 1997. Vascular smooth muscle thromboxane A₂ receptors mediate arachidonic acid-induced sudden death in rabbits. *Hypertension* 29, 303–309.
- Plant, M.H., Laneuville, O., 1999. Characterization of a novel transcript of prostaglandin endoperoxide H synthase 1 with a tissue-specific profile of expression. *Biochem J* 344 Pt 3, 677–685.
- Potter, C.M., Lundberg, M.H., Harrington, L.S., Warboys, C.M., Warner, T.D., Berson, R.E., Moshkov, A. V, Gorelik, J., Weinberg, P.D., Mitchell, J.A., 2011. Role of shear stress in endothelial cell morphology and expression of cyclooxygenase isoforms. *Arter. Thromb Vasc Biol* 31, 384–391.
- Pries, A.R., Secomb, T.W., Gaehtgens, P., 2000. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 440, 653–666.
- Prossnitz, E.R., Oprea, T.I., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., 2008. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109, 350–353.

- Purcell-Huynh, D.A., Farese Jr., R. V, Johnson, D.F., Flynn, L.M., Pierotti, V., Newland, D.L., Linton, M.F., Sanan, D.A., Young, S.G., 1995. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet. *J Clin Invest* 95, 2246–2257.
- Qin, N., Zhang, S.P., Reitz, T.L., Mei, J.M., Flores, C.M., 2005. Cloning, expression, and functional characterization of human cyclooxygenase-1 splicing variants: evidence for intron 1 retention. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 1298–1305.
- Rafikov, R., Fonseca, F. V, Kumar, S., Pardo, D., Darragh, C., Elms, S., Fulton, D., Black, S.M., 2011. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol* 210, 271–284.
- Rahimian, R., Laher, I., Dube, G., van Breemen, C., 1997. Estrogen and selective estrogen receptor modulator LY117018 enhance release of nitric oxide in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 283, 116–122.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., Nishigaki, I., 2013. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 9, 1057–1069.
- Rath, G., Dessy, C., Feron, O., 2009. Caveolae, caveolin and control of vascular tone: nitric oxide (NO) and endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) regulation. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 4, 105–109.
- Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24, 981–990.
- Ray, R., Shah, A.M., 2005. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci* 109.
- Rees, D.D., Palmer, R.M., Schulz, R., Hodson, H.F., Moncada, S., 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101, 746–752.

- Reinauer, C., Censarek, P., Kaber, G., Weber, A.A., Steger, G., Klamp, T., Schror, K., 2013. Expression and translation of the COX-1b gene in human cells—no evidence of generation of COX-1b protein. *Biol Chem* 394, 753–760.
- Retailleau, K., Belin de Chantemele, E.J., Chanoine, S., Guihot, A.L., Vessieres, E., Toutain, B., Faure, S., Bagi, Z., Loufrani, L., Henrion, D., 2010. Reactive oxygen species and cyclooxygenase 2-derived thromboxane A2 reduce angiotensin II type 2 receptor vasorelaxation in diabetic rat resistance arteries. *Hypertension* 55, 339–344.
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* (80-). 307, 1625–1630.
- Riganti, C., Costamagna, C., Bosia, A., Ghigo, D., 2006. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212, 179–187.
- Ritchie, R.H., Drummond, G.R., Sobey, C.G., De Silva, T.M., Kemp-Harper, B.K., 2017. The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 116, 57–69.
- Rodríguez-Mañas, L., El-Assar, M., Vallejo, S., Lopez-Doriga, P., Solis, J., Petidier, R., Montes, M., Nevado, J., Castro, M., Gomez-Guerrero, C., Peiro, C., Sanchez-Ferrer, C.F., 2009. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell* 8, 226–238.
- Rosado, E., Rodríguez-Vilarrupla, A., Gracia-Sancho, J., Monclus, M., Bosch, J., Garcia-Pagan, J.C., 2012. Interaction between NO and COX pathways modulating hepatic endothelial cells from control and cirrhotic rats. *J Cell Mol Med* 16, 2461–2470.
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B. V, Johnson, K.C., Kotchen, J.M., Ockene, J., 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288, 321–333.
- Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M., 1986. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 250, H815-21.

- Rubio-Gayosso, I., Sierra-Ramirez, A., Garcia-Vazquez, A., Martinez-Martinez, A., Munoz-Garcia, O., Morato, T., Ceballos-Reyes, G., 2000. 17Beta-estradiol increases intracellular calcium concentration through a short-term and nongenomic mechanism in rat vascular endothelium in culture. *J Cardiovasc Pharmacol* 36, 196–202.
- Sagredo A, Martorell A, Blanco-Rivero J, Balfagón G, F.M., 2007. Involvement of Ca²⁺-dependent potassium channels in the acetylcholine-response: effect of female sex hormones. *Calcium Bind. Proteins* 2:79.
- Samuelsson, B., Goldyne, M., Granstrom, E., Hamberg, M., Hammarstrom, S., Malmsten, C., 1978. Prostaglandins and thromboxanes. *Annu Rev Biochem* 47, 997–1029.
- Santhanam, L., Christianson, D.W., Nyhan, D., Berkowitz, D.E., 2008. Arginase and vascular aging. *J Appl Physiol* 105, 1632–1642.
- Schmidt, H.H., Klein, M.M., Niroomand, F., Bohme, E., 1988. Is arginine a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide? *Eur J Pharmacol* 148, 293–295.
- Schultheiss, G., Diener, M., 1999. Inhibition of spontaneous smooth muscle contractions in rat and rabbit intestine by blockers of the thromboxane A₂ pathway. *Zentralbl Vet. A* 46, 123–131.
- Schultz-Norton, J.R., Ziegler, Y.S., Nardulli, A.M., 2011. ERalpha-associated protein networks. *Trends Endocrinol Metab* 22, 124–129.
- Seals, D.R., Jablonski, K.L., Donato, A.J., 2011. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci* 120, 357–375.
- Segarra, G., Cortina, B., Mauricio, M.D., Novella, S., Lluch, P., Navarrete-Navarro, J., Noguera, I., Medina, P., 2016. Effects of asymmetric dimethylarginine on renal arteries in portal hypertension and cirrhosis. *World J Gastroenterol* 22, 10545–10556.
- Sepulveda, C., Palomo, I., Fuentes, E., 2017. Mechanisms of endothelial dysfunction during aging: Predisposition to thrombosis. *Mech Ageing Dev* 164, 91–99.

- Serna, E., Mauricio, M.D., Lluch, P., Segarra, G., Cortina, B., Lluch, S., Medina, P., 2013. Basal release of nitric oxide in the mesenteric artery in portal hypertension and cirrhosis: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Gastroenterol Hepatol* 28, 880–886.
- Sessa, W.C., 2004. eNOS at a glance. *J Cell Sci* 117, 2427–2429.
- Shams, G., Wallace, L.J., Miller, D.D., Feller, D.R., 1990. Effects of thromboxane A2 on thoracic aorta of young and old rats: use of selective thromboxane receptor antagonists. *Pharmacology* 40, 27–32.
- Shaw, L.J., Bairey Merz, C.N., Pepine, C.J., Reis, S.E., Bittner, V., Kelsey, S.F., Olson, M., Johnson, B.D., Mankad, S., Sharaf, B.L., Rogers, W.J., Wessel, T.R., Arant, C.B., Pohost, G.M., Lerman, A., Quyyumi, A.A., Sopko, G., 2006. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part I: gender differences in traditional and novel risk factors, symptom evaluation, and gender-optimized diagnostic strategies. *J Am Coll Cardiol* 47, S4-s20.
- Shenker, A., Goldsmith, P., Unson, C.G., Spiegel, A.M., 1991. The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family. *J Biol Chem* 266, 9309–9313.
- Sherman, T.S., Chambliss, K.L., Gibson, L.L., Pace, M.C., Mendelsohn, M.E., Pfister, S.L., Shaul, P.W., 2002. Estrogen acutely activates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 610–616.
- Sherwood, A., Bower, J.K., McFetridge-Durdle, J., Blumenthal, J.A., Newby, L.K., Hinderliter, A.L., 2007. Age moderates the short-term effects of transdermal 17beta-estradiol on endothelium-dependent vascular function in postmenopausal women. *Arter. Thromb Vasc Biol* 27, 1782–1787.
- Silldorff, E.P., Hilbun, L.R., Pallone, T.L., 2002. Angiotensin II constriction of rat vasa recta is partially thromboxane dependent. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 40, 541–546.
- Simoncini, T., 2009. Mechanisms of action of estrogen receptors in vascular cells: relevance for menopause and aging. *Climacteric* 12 Suppl 1, 6–11.

- Simonsen, U., Christensen, F.H., Buus, N.H., 2009. The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure. *Pharmacol. Ther.* 122, 109–124.
- Sivritas, D., Becher, M.U., Ebrahimian, T., Arfa, O., Rapp, S., Bohner, A., Mueller, C.F., Umemura, T., Wassmann, S., Nickenig, G., Wassmann, K., 2011. Antiproliferative effect of estrogen in vascular smooth muscle cells is mediated by Kruppel-like factor-4 and manganese superoxide dismutase. *Basic Res Cardiol* 106, 563–575.
- Smith, A.R., Visioli, F., Hagen, T.M., 2006. Plasma membrane-associated endothelial nitric oxide synthase and activity in aging rat aortic vascular endothelia markedly decline with age. *Arch Biochem Biophys* 454, 100–105.
- Smith, C.J., Zhang, Y., Koboldt, C.M., Muhammad, J., Zweifel, B.S., Shaffer, A., Talley, J.J., Masferrer, J.L., Seibert, K., Isakson, P.C., 1998. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13313–13318.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., Garavito, R.M., 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69, 145–182.
- Sobrinho, A., Mata, M., Laguna-Fernandez, A., Novella, S., Oviedo, P.J., Garcia-Perez, M.A., Tarin, J.J., Cano, A., Hermenegildo, C., 2009. Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells. *PLoS One* 4, e8242.
- Sobrinho, A., Oviedo, P.J., Novella, S., Laguna-Fernandez, A., Bueno, C., Garcia-Perez, M.A., Tarin, J.J., Cano, A., Hermenegildo, C., 2010. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- α . *J Mol Endocrinol* 44, 237–246.
- Song, D., Yuen, V.G., Yao, L., McNeill, J.H., 2006. Chronic estrogen treatment reduces vaso-constrictor responses in insulin resistant rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84, 1139–1143.
- Spangler, E.L., Patel, N., Speer, D., Hyman, M., Hengemihle, J., Markowska, A., Ingram, D.K., 2002. Passive avoidance and complex maze learning in the senescence accelerated mouse (SAM): age and strain comparisons of SAM P8 and R1. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, B61-8.

- Staessen, J.A., Ginocchio, G., Thijs, L., Fagard, R., 1997. Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. *J Hum Hypertens* 11, 507–514.
- Stewart, K.G., Zhang, Y., Davidge, S.T., 2000. Aging increases PGHS-2-dependent vasoconstriction in rat mesenteric arteries. *Hypertension* 35, 1242–1247.
- Stirone, C., Chu, Y., Sunday, L., Duckles, S.P., Krause, D.N., 2003. 17 Beta-estradiol increases endothelial nitric oxide synthase mRNA copy number in cerebral blood vessels: quantification by real-time polymerase chain reaction. *Eur. J. Pharmacol.* 478, 35–38.
- Strait, J.B., Lakatta, E.G., 2012. Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail. Clin.* 8, 143–164.
- Stricker, R., Eberhart, R., Chevailler, M.C., Quinn, F.A., Bischof, P., Stricker, R., 2006. Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer. *Clin Chem Lab Med* 44, 883–887.
- Sudoh, N., Toba, K., Akishita, M., Ako, J., Hashimoto, M., Iijima, K., Kim, S., Liang, Y.Q., Ohike, Y., Watanabe, T., Yamazaki, I., Yoshizumi, M., Eto, M., Ouchi, Y., 2001. Estrogen prevents oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Circulation* 103, 724–729.
- Sumi, D., Ignarro, L.J., 2003. Estrogen-related receptor alpha 1 up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14451–14456.
- Sun, F.F., Chapman, J.P., McGuire, J.C., 1977. Metabolism of prostaglandin endoperoxide in animal tissues. *Prostaglandins* 14, 1055–1074.
- Suzuki, Y., Asano, K., Shiraiishi, Y., Oguma, T., Shiomi, T., Fukunaga, K., Nakajima, T., Niimi, K., Yamaguchi, K., Ishizaka, A., 2004. Human bronchial smooth muscle cell proliferation via thromboxane A2 receptor. *Prostaglandins Leukot Essent Fat. Acids* 71, 375–382.

- Taddei, S., Vanhoutte, P.M., 1993. Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A2. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8, S328-31.
- Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Magagna, A., Salvetti, A., 1997. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension* 29, 274–279.
- Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Mattei, P., Sudano, I., Bernini, G., Pinto, S., Salvetti, A., 1996. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women. *Hypertension* 28, 576–582.
- Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Salvetti, G., Bernini, G., Magagna, A., Salvetti, A., 2001. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension* 38, 274–279.
- Taddei, S., Virdis, A., Mattei, P., Ghiadoni, L., Gennari, A., Fasolo, C.B., Sudano, I., Salvetti, A., 1995. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 91, 1981–1987.
- Takeda, T., 2009. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* 34, 639–659.
- Takeda, T., 1999. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* 20, 105–110.
- Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M., Yamamuro, T., 1981. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 17, 183–194.
- Tanabe, T., Maeda, S., Miyauchi, T., Iemitsu, M., Takanashi, M., Irukayama-Tomobe, Y., Yokota, T., Ohmori, H., Matsuda, M., 2003. Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta. *Acta Physiol Scand* 178, 3–10.
- Tanaka, K., Sata, M., 2018. Roles of Perivascular Adipose Tissue in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Front Physiol* 9, 3.

- Tang, E.H., Leung, F.P., Huang, Y., Feletou, M., So, K.F., Man, R.Y., Vanhoutte, P.M., 2007. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. *Br J Pharmacol* 151, 15–23.
- Tang, E.H., Vanhoutte, P.M., 2009. Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol Ther* 122, 140–149.
- Tang, E.H., Vanhoutte, P.M., 2008. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics* 32, 409–418.
- Tarbell, J.M., Pahakis, M.Y., 2006. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med* 259, 339–350.
- Teede, H.J., 2007. Sex hormones and the cardiovascular system: effects on arterial function in women. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 672–676.
- Tharp, D.L., Ivey, J.R., Shaw, R.L., Bowles, D.K., 2014. Ovariectomy increases L-type Ca(2+) channel activity in porcine coronary smooth muscle. *Menopause* 21, 661–668.
- Thibodeau, P.A., Kachadourian, R., Lemay, R., Bisson, M., Day, B.J., Paquette, B., 2002. In vitro pro- and antioxidant properties of estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81, 227–236.
- Thompson, L.P., Weiner, C.P., 1997. Long-term estradiol replacement decreases contractility of guinea pig coronary arteries to the thromboxane mimetic U46619. *Circulation* 95, 709–714.
- Topper, J.N., Cai, J., Falb, D., Gimbrone, M.A.J., 1996. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10417–10422.

- Tostes, R.C., Nigro, D., Fortes, Z.B., Carvalho, M.H.C., 2003. Effects of estrogen on the vascular system. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas e Biol.* 36, 1143–1158.
- Touyz, R.M., 2004. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44, 248–252.
- Townsend, N., Wilson, L., Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Rayner, M., Nichols, M., 2016. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Hear. J* 37, 3232–3245.
- Ushikubi, F., Nakajima, M., Hirata, M., Okuma, M., Fujiwara, M., Narumiya, S., 1989. Purification of the thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor from human blood platelets. *J Biol Chem* 264, 16496–16501.
- Usselman, C.W., Stachenfeld, N.S., Bender, J.R., 2016. The molecular actions of oestrogen in the regulation of vascular health. *Exp Physiol* 101, 356–361.
- van der Loo, B., Bachschmid, M., Labugger, R., Schildknecht, S., Kilo, J., Hahn, R., Palacios-Callender, M., Luscher, T.F., 2005. Expression and activity patterns of nitric oxide synthases and antioxidant enzymes reveal a substantial heterogeneity between cardiac and vascular aging in the rat. *Biogerontology* 6, 325–334.
- van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J.N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J.M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J.D., Quaschnig, T., Malinski, T., Gygi, D., Ullrich, V., Luscher, T.F., 2000. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med* 192, 1731–1744.
- Vanhooren, V., Libert, C., 2013. The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev* 12, 8–21.
- Vanhoutte, P.M., 2009. COX-1 and vascular disease. *Clin Pharmacol Ther* 86, 212–215.
- Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H., Feletou, M., Tang, E.H., 2017. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol* 219, 22–96.

- Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H., Feletou, M., Tang, E.H., 2015. Endothelial Dysfunction and Vascular Disease - A Thirtieth Anniversary Update. *Acta Physiol.*
- Vanhoutte, P.M., Zhao, Y., Xu, A., Leung, S.W., 2016. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ Res* 119, 375–396.
- Vargas, R., Delaney, M., Farhat, M.Y., Wolfe, R., Rego, A., Ramwell, P.W., 1995. Effect of estradiol 17 beta on pressor responses of rat mesenteric bed to norepinephrine, K⁺, and U-46619. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 25, 200–206.
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., 2003. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res* 37, 121–127.
- Vassalle, C., Sciarrino, R., Bianchi, S., Battaglia, D., Mercuri, A., Maffei, S., 2012. Sex-related differences in association of oxidative stress status with coronary artery disease. *Fertil Steril* 97, 414–419.
- Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L., Taddei, S., 2009. The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man. *Exp Physiol* 94, 317–321.
- Vessieres, E., Belin de Chantemele, E.J., Toutain, B., Guihot, A.L., Jardel, A., Loufrani, L., Henrion, D., 2010. Cyclooxygenase-2 inhibition restored endothelium-mediated relaxation in old obese Zucker rat mesenteric arteries. *Front Physiol* 1, 145.
- Villar, I.C., Francis, S., Webb, A., Hobbs, A.J., Ahluwalia, A., 2006. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int* 70, 840–853.
- Viridis, A., Bacca, A., Colucci, R., Duranti, E., Fornai, M., Materazzi, G., Ippolito, C., Bernardini, N., Blandizzi, C., Bernini, G., Taddei, S., 2013. Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. *Hypertension* 62, 337–344.
- Viridis, A., Gesi, M., Taddei, S., 2016. Impact of apocynin on vascular disease in hypertension. *Vasc. Pharmacol.* 87:1-5

- Viridis, A., Ghiadoni, L., Giannarelli, C., Taddei, S., 2010a. Endothelial dysfunction and vascular disease in later life. *Maturitas* 67, 20–24.
- Viridis, A., Ghiadoni, L., Pinto, S., Lombardo, M., Petraglia, F., Gennazzani, A., Buralli, S., Taddei, S., Salvetti, A., 2000. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation* 101, 2258–2263.
- Viridis, A., Ghiadoni, L., Taddei, S., 2010b. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflugers Arch* 459, 1015–1023.
- Wadley, A.J., Veldhuijzen van Zanten, J.J., Aldred, S., 2013. The interactions of oxidative stress and inflammation with vascular dysfunction in ageing: the vascular health triad. *Age* 35, 705–718.
- Wang, D., Wang, C., Wu, X., Zheng, W., Sandberg, K., Ji, H., Welch, W.J., Wilcox, C.S., 2014. Endothelial dysfunction and enhanced contractility in microvessels from ovariectomized rats: roles of oxidative stress and perivascular adipose tissue. *Hypertension* 63, 1063–1069.
- Wang, J.S., Liu, X., Xue, Z.Y., Alderman, L., Tilan, J.U., Adenika, R., Epstein, S.E., Burnett, M.S., 2011. Effects of aging on time course of neovascularization-related gene expression following acute hindlimb ischemia in mice. *Chin Med J* 124, 1075–1081.
- Wang, M., Jiang, L., Monticone, R.E., Lakatta, E.G., 2014. Proinflammation: the key to arterial aging. *Trends Endocrinol Metab* 25, 72–79.
- Wang, M., Monticone, R.E., Lakatta, E.G., 2010. Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19, 201–207.
- Wang, X., Abdel-Rahman, A.A., 2002. Estrogen modulation of eNOS activity and its association with caveolin-3 and calmodulin in rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282, H2315.
- Warner, T.D., Mitchell, J.A., 2002. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13371–13373.
- Wassmann, K., Wassmann, S., Nickenig, G., 2005. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res* 97, 1046–1054.

- Wassmann, S., Baumer, A.T., Strehlow, K., van Eickels, M., Grohe, C., Ahlbory, K., Rosen, R., Bohm, M., Nickenig, G., 2001. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 103, 435–441.
- Watanabe, M., Noda, M., Nakajin, S., 2007. Aromatase expression in a human osteoblastic cell line increases in response to prostaglandin E(2) in a dexamethasone-dependent fashion. *Steroids* 72, 686–692.
- Watterson, K.R., Ratz, P.H., Spiegel, S., 2005. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. *Cell. Signal.* 17, 289–298.
- Webb, R.C., 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27, 201–206.
- Wei, C., Kulmacz, R.J., Tsai, A.L., 1995. Comparison of branched-chain and tightly coupled reaction mechanisms for prostaglandin H synthase. *Biochemistry* 34, 8499–8512.
- White, L.R., Juul, R., Cappelen, J., Aasly, J., 2002. Cyclooxygenase inhibitors attenuate endothelin ET(B) receptor-mediated contraction in human temporal artery. *Eur. J. Pharmacol.* 448, 51–57.
- WHO, W.H.O., 2017. Enfermedades Cardiovasculares. Definición, datos y cifras.
- Widder, J., Pelzer, T., von Poser-Klein, C., Hu, K., Jazbutyte, V., Fritzeimer, K.-H., Hegele-Hartung, C., Neyses, L., Bauersachs, J., 2003. Improvement of endothelial dysfunction by selective estrogen receptor-alpha stimulation in ovariectomized SHR. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 42, 991–996.
- Winberg, N., Hoegholm, A., Christensen, H.R., Bang, L.E., Mikkelsen, K.L., Nielsen, P.E., Svendsen, T.L., Kampmann, J.P., Madsen, N.H., Bentzon, M.W., 1995. 24-h ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. *Am J Hypertens* 8, 978–986.
- Wilhelmsson, L., Wikland, M., Wijkvist, N., 1981. PGH₂, TxA₂ and PGI₂ have potent and differentiated actions on human uterine contractility. *Prostaglandins* 21, 277–286.
- Wolin, M.S., 2000. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1430–1442.

- Wong, S.L., Leung, F.P., Lau, C.W., Au, C.L., Yung, L.M., Yao, X., Chen, Z.Y., Vanhoutte, P.M., Gollasch, M., Huang, Y., 2009. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F₂α mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circ Res* 104, 228–235.
- Wu, J.M., Zelinski, M.B., Ingram, D.K., Ottinger, M.A., 2005. Ovarian aging and menopause: current theories, hypotheses, and research models. *Exp Biol Med* 230, 818–828.
- Wynne, F.L., Payne, J.A., Cain, A.E., Reckelhoff, J.F., Khalil, R.A., 2004. Age-related reduction in estrogen receptor-mediated mechanisms of vascular relaxation in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 43, 405–412.
- Ximenes, V.F., Kanegae, M.P.P., Rissato, S.R., Galhiane, M.S., 2007. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 457, 134–141.
- Xu, X., Wang, B., Ren, C., Hu, J., Greenberg, D.A., Chen, T., Xie, L., Jin, K., 2017. Age-related Impairment of Vascular Structure and Functions. *Aging Dis.* 8, 590–610.
- Yang, D., Feletou, M., Boulanger, C.M., Wu, H.F., Levens, N., Zhang, J.N., Vanhoutte, P.M., 2002. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 136, 104–110.
- Yang, D., Gluais, P., Zhang, J.N., Vanhoutte, P.M., Feletou, M., 2004. Nitric oxide and inactivation of the endothelium-dependent contracting factor released by acetylcholine in spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 43, 815–820.
- Yang, X., Li, Y., Li, Y., Ren, X., Zhang, X., Hu, D., Gao, Y., Xing, Y., Shang, H., 2017. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front Physiol* 8, 600.
- Yuan, M., Wen-Xia, Z., Jun-Ping, C., Yong-Xiang, Z., 2005. Age-related changes in the oestrous cycle and reproductive hormones in senescence-accelerated mouse. *Reprod Fertil Dev* 17, 507–512.

- Zhang, M., Song, P., Xu, J., Zou, M.H., 2011. Activation of NAD(P)H oxidases by thromboxane A2 receptor uncouples endothelial nitric oxide synthase. *Arter. Thromb Vasc Biol* 31, 125–132.
- Zhang, Y., Davidge, S.T., 1999. Effect of estrogen replacement on vasoconstrictor responses in rat mesenteric arteries. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* 34, 1117–1122.
- Zhang, Y., Janssens, S.P., Wingler, K., Schmidt, H.H.H.W., Moens, A.L., 2011. Modulating endothelial nitric oxide synthase: a new cardiovascular therapeutic strategy. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 301, H634–H646.
- Zhao, Y., Vanhoutte, P.M., Leung, S.W., 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci* 129, 83–94.

8. PUBLICACIONES



Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression



Susana Novella^{a,b}, Ana Paula Dantas^{c,d}, Gloria Segarra^{a,b}, Xavier Vidal-Gómez^{a,b}, Ana Mompeón^{a,b}, Manel Garabito^{c,d}, Carlos Hermenegildo^{a,b}, Pascual Medina^{a,b,*}

^a Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain

^b INCLIVA Biomedical Research Institute, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

^c Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^d Institut Clinic de Tòrax, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2013

Received in revised form 19 July 2013

Accepted 6 August 2013

Available online 13 August 2013

Section Editor: Christiaan Leeuwenburgh

Keywords:

Aging

Endothelium-dependent relaxation

NO bioavailability

Vascular reactivity

Adrenergic

Female aging animal model

ABSTRACT

The present study investigated the time-course for aging-associated effects on contractile and relaxing vascular responses and nitric oxide (NO) production in the aorta from female senescence-accelerated resistant (SAMR1) and prone (SAMP8) mice. Both SAMR1 and SAMP8 were studied at three different ages: 3 (young), 6 (middle age) and 10 (old) months. Concentration–response curves to phenylephrine (10^{-8} to 10^{-5} M) or acetylcholine (10^{-9} to 10^{-5} M) were performed in the aortic rings in the absence or in the presence of NO synthase (NOS) inhibitor L-NAME (10^{-4} M). Protein and gene expression for endothelial NOS (eNOS) was determined by immunofluorescence, Western blot and real-time PCR. Although we have not seen any difference in vascular responses when comparing both strains at 3 months old, we found a significant aging-associated impairment of vascular reactivity that follows a distinct time-course in SAMR1 and SAMP8. In SAMR1, increases in phenylephrine contraction and decreases in acetylcholine relaxation were only seen at 10 months old, while SAMP8 displays altered responses at 6 months that are further impaired at 10 months old. L-NAME treatment enhanced phenylephrine contractions and completely inhibited acetylcholine relaxations in all age groups of SAMR1 and SAMP8. However, the magnitude of increase in phenylephrine contraction by L-NAME was markedly reduced by aging and followed a faster pace in SAMP8. Similar pattern of responses was observed in the time course for changes of eNOS expression, suggesting an earlier and more pronounced aging-associated decrease of NO production and eNOS expression in SAMP8. These results reveal that aging enhances contractile responses to phenylephrine and decreases endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in the aorta from female mice by a mechanism that involves a decrease of NO production. This process occurs earlier in the aorta from SAMP8 mice, establishing these mice as suitable model to study cardiovascular aging in a convenient and standard time course.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Aging is a physiological process associated with structural and functional alterations in vasculature that increase cardiovascular morbidity and mortality even in the absence of known cardiovascular risk factors (Lakatta and Levy, 2003). Vascular aging is associated with endothelial dysfunction, arterial stiffening and remodeling, impaired angiogenesis, defective vascular repair, and with an increasing prevalence of atherosclerosis (Erusalimsky, 2009; Lakatta and Levy, 2003).

Data from clinical and basic research have established that vascular aging in women does not follow the same chronology as in men (Pereira et al., 2010; Shaw et al., 2006; Takenouchi et al., 2009). At

young and middle ages women are at lower risk of cardiovascular disease as compared to their male peers. If known risk factors that influence cardiovascular aging are excluded (e.g. smoking, cholesterol, hypertension), males still display a pattern of progressive vascular aging at a faster pace than do females (Pereira et al., 2010; Takenouchi et al., 2009). Despite the great amount of studies to describe the pathophysiology of vascular aging, most studies were conducted in the male vasculature. Little information is available on the vascular effects of aging in females.

It is well established that vascular tone is shifted toward vasoconstriction and endothelial dysfunction, yielding a hypertensive state with aging (Schutzer and Mader, 2012). Large and growing segments of the general population are age 65 or older, most of them are women, and this percentage will continue to rise. Primary care of this specific population is becoming a priority for clinicians and a major public health issue. Hypertension, orthostatic hypotension, arterial insufficiency, and atherosclerosis are common disorders in the elderly

* Corresponding author at: Dept. of Physiology, Faculty of Medicine and Odontology, Av. Blasco Ibañez, 15, E 46010 Valencia, Spain. Tel.: +34 963864644; fax: +34 96 3864642. E-mail address: Pascual.Medina@uv.es (P. Medina).

that lead to significant morbidity and mortality. A fundamental understanding of why α -adrenergic receptor-mediated contraction is impaired with age will provide new insights and innovative strategies for the management of these disorders.

The senescence accelerated mouse prone strain (SAMP8) has been shown to be one of the most appropriate models to study aging and age-associated diseases (Takeda et al., 1997). It shows an age-related deterioration of learning and memory at an earlier age, compared with the senescence-accelerated resistant strain (SAMR1) (Butterfield and Poon, 2005; Miyamoto, 1997). Vascular studies using these models are not abundant, but few studies in male (Llorens et al., 2007) and female (Novella et al., 2010, 2013; Novensa et al., 2011) mice have shown morphological alterations and mechanical and endothelial dysfunction. To clarify the evolution of vascular dysfunction with chronological aging and accelerated senescence, we sought to determine the time-course dependent evolution of acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation and phenylephrine-induced contraction in mice at different ages. We further investigated a possible causal relationship between altered phenylephrine-induced contractions and the expression levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), a purported essential component of vascular function in aging aorta.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals

The SAM model is a murine model of aging widely used in experimental aging research (Takeda et al., 1997). Among the strains of SAM mice, senescence-accelerated mice-resistant 1 (SAMR1) serves as a control exhibiting a normal aging phenotype. Senescence-accelerated mice-prone 8 (SAMP8), on the other hand, exhibits an accelerated aging phenotype with atherogenesis (Fenton et al., 2004) and endothelial dysfunction (Llorens et al., 2007; Novella et al., 2010).

Female SAMR1 ($n = 48$) and SAMP8 ($n = 48$) were obtained from the breeding stock at Research Unit at School of Medicine, University of Valencia and housed according to institutional guidelines (constant room temperature 22 °C, 12 h light/dark cycle, 60% humidity, standard mice chow and water *ad libitum*). All protocols were approved by the Institutional Ethics Committee at the University of Valencia and conformed to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Both SAMR1 and SAMP8 mice at 3 ($n = 16$ of each strain), 6 ($n = 16$ of each strain), and 10 ($n = 16$ of each strain) months old were euthanized by anesthesia with isoflurane and the thoracic aorta was harvested from the aortic arch to the diaphragm.

2.2. Determination of nitrites and nitrates

In the anesthetized mice, blood samples (0.5 ml) were collected by cardiac puncture and plasma was separated by centrifugation at 1200 $\times g$ for 10 min. The levels of nitric oxide (NO) metabolites ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) were determined in the plasma by a commercial colorimetric assay kit (Cayman Chemical Company) following the supplier's instructions.

2.3. Isolated mouse aorta preparation

For functional studies, the thoracic aorta ($n = 10$ mice per group) was excised, placed immediately in iced-cold Krebs–Henseleit solution and cleaned of surrounding tissue. Rings (4-mm long) were cut for isometric recording of tension. Outside diameter of the rings was measured using an ocular micrometer within a Wild M8 zoom microscope (Heerbrugg, Switzerland) and ranged from 0.8 to 1 mm. Typically, four rings per mouse were studied.

Two stainless-steel holders (100 μm in diameter) were introduced through the arterial lumen and placed in a 4 ml tissue bath containing modified Krebs–Henseleit (in mM: NaCl 115; KCl 4.6; KH_2PO_4 1.2;

MgCl_2 1.2; CaCl_2 2.5; NaHCO_3 25; glucose 11.1; EDTA 0.01, pH 7.3–7.4) kept at 37 °C and aerated with 95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2 for isometric force measurements (Grass FT03, Grass Instruments Division Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, U.S.A.). Changes in isometric force were recorded by the use of the Chart v. 3.4/s software and a MacLab/8e data acquisition system (ADInstruments, Castle Hill, Australia). Once the optimal resting tension was reached (10 mN), the aortic rings were allowed to attain a steady level of tension during a 1-hour equilibration period before testing. Functional integrity of the endothelium was confirmed routinely by the presence of relaxation induced by acetylcholine (10^{-7} – 10^{-6} M) during contraction obtained with phenylephrine (10^{-6} M). Following the equilibration period, arterial segments were exposed to receptor-independent depolarizing agent KCl (60 mM) until the contraction reached a stable plateau (10 to 20 min). After washout and return to stable baseline, contractile responses were determined by cumulative concentration–response curves to phenylephrine (10^{-8} to 10^{-9} M). In some experiments, rings were incubated for 15 min with N^c -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} M) before starting concentration–response curves to phenylephrine.

To test the endothelium-dependent responses, the aortic rings were pre-contracted with phenylephrine (10^{-7} – 3×10^{-6} M). These concentrations of phenylephrine produced a stable contraction, corresponding to 75–90% of the response induced by 60 mM of KCl and cumulative relaxation curves to acetylcholine (10^{-9} to 10^{-5} M) were obtained in each ring. In another series of experiments, the preparations with endothelium were pre-incubated with L-NAME (10^{-4} M) 15 min prior to the concentration–response curves to acetylcholine. The effects of sodium nitroprusside (10^{-11} to 10^{-7} M), an endothelium-independent vasorelaxant and NO donor, were studied in vessels contracted with 3×10^{-6} M of phenylephrine. After a stable contraction was obtained, concentration–response curves were recorded. In all experiments the concentration of phenylephrine required to precontract the arteries was titrated to produce a similar level of precontraction.

2.4. Protein expression

In another set of animals ($n = 6$ mice in each experimental group) half of the thoracic aorta was gradually frozen in Tissue-Tek OCT compound (for protocols in the aortic section), and the other half was snap frozen into liquid nitrogen (for mRNA and protein expression analyses). Protein expression of eNOS was determined in the aortic sections from SAMR1 and SAMP8 mice by two semi-quantitative methods: immunofluorescence and Western blot as previously described (Novella et al., 2010). For immunofluorescence, the aortic sections (4 μm) were thaw-mounted onto polylysine covered slides, fixed in acetone (15 min) and blocked for 30 min with horse serum. Sections were incubated overnight at 4 °C with anti-eNOS (Abcam – ab5589). Following washes, sections were co-stained with 10 μM phalloidin (Sigma) and Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen). Coverslips were mounted on slides using the ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen), and sections were visualized through a confocal microscope (Axiovert 2000, Carl Zeiss Inc.) with a 40 \times objective lens (Zeiss). For each image, light was passed through a different excitation filter: 1) 350 nm (for DAPI); 2) 490 nm (for Alexa 488); and 3) 590 nm (for phalloidin). Each aorta was recorded in 3 different regions and results were expressed as an average of fluorescence elicited using Mac Biophotonic ImageJ software.

For Western blot analysis, equal amount of protein from each sample (50 μg) was resolved by SDS-PAGE on 4–12% gels and electroblotted onto nitrocellulose membranes. After 1 h blocking with 5% milk in phosphate-buffered saline with 0.1% (v/v) Tween 20 (PBST), membranes were incubated for 1 h in PBST containing 5% milk and the specified primary antibody: monoclonal anti-eNOS, 1:1000 (BD Transduction Laboratories). After 4 washes with PBST, the membranes were incubated for 1 h with a horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse at a 1:2000 dilution in PBST containing 1% milk. After 4 additional washes, the membranes were incubated with a

chemiluminescent reagent according to the manufacturer's protocols (SuperSignal West Pico, Pierce Chemical Co.), and chemiluminescent signal was visualized by LAS-3000 Imaging System (Fujifilm). Densitometric analyses of Western blots were performed using a Mac Biophotonic ImageJ software. All membranes were re-blotted using a monoclonal antibody anti-GAPDH (1:2500; Santa Cruz Biotechnology) as loading control. Data were normalized to corresponding values of GAPDH densitometry.

2.5. Gene expression by quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was isolated and reverse transcribed as previously described (Novensa et al., 2010). mRNA encoding eNOS was quantified by qRT-PCR based on SYBR® Green fluorescence, using the GAPDH mRNA as internal control. The specific primer sequences for mice were: eNOS (NM_0087134) 5'-TGT CAC TAT GGC AAC CAG CGT-3'; 5'-GCG CAA TGT GAG TCC GAA AA-3' and GAPDH (NM_008084.2) 5'-ACC CCA GCA AGG ACA CTG AGC AAG-3'; 5'-TGG GGG TCT GGG ATG GAA ATT GTG-3'. Real-time PCR reactions were set following the manufacturer's conditions (Applied Biosystems). Ct values obtained for each gene were normalized to Ct of housekeeping gene GAPDH (ΔCt) and converted to the linear form using the term $2^{-\Delta Ct}$, and expressed as $2^{-\Delta Ct}$.

2.6. Drugs

The following drugs were used: phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, sodium nitroprusside dehydrate, and N^c-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) were obtained from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). All drugs for vascular reactivity studies were dissolved in Krebs solution. Stock solutions of each drug were freshly prepared at the day of the experiment, and kept on ice throughout the experiment.

2.7. Data analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Contractions to phenylephrine are shown as absolute tension (mN). Relaxation is expressed as the percentage to the precontraction in response to phenylephrine (3×10^{-6} M). The pD₂ (negative logarithm of the molar concentration at which half-maximum contraction occurs) was determined from individual concentration–response curves by non-linear regression analysis. Differences in the vascular responses were compared by calculating the area under the concentration–response curve (AUC). NO bioavailability was evaluated by comparing the AUC for phenylephrine or acetylcholine

obtained in the absence and presence of L-NAME. In each experimental group *n* indicates the number of animals. Differences between mouse strains (i.e. SAMR1 vs. SAMP8) and by experimental groups (i.e., 3 vs. 6 vs. 10 month-old groups) were analyzed by two-way ANOVA, and then Bonferroni's test was performed. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$. The statistical analysis was carried out using the Prism 4 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Age-dependent increase of contraction in response to phenylephrine

Phenylephrine caused a concentration-dependent contraction in the isolated aortic rings from all groups (Fig. 1). The values for pD₂ were not significantly different between the SAMR1 and SAMP8 and in all aging groups (Table 1). When SAMR1 and SAMP8 were analyzed independently, we found a chronological aging-associated increase in contractile responses. In SAMR1, the maximal contraction to phenylephrine was significantly increased only when mice were 10 months old, while SAMP8 displays augmented responses at 6 months that are further increased at 10 months old (Table 1). Differences between strains were also observed. At 6 months, maximal contractions in response to phenylephrine were significantly enhanced in the aorta from SAMP8 compared to SAMR1. The difference between maximal responses of the SAMP8 and SAMR1 groups was greater at 10 months old. Interestingly, the magnitude of contractile responses in 10-month-old SAMR1 was comparable to that obtained from 6-month-old SAMP8 (Fig. 1 and Table 1).

3.2. Effects of NOS-inhibition on contractile responses to phenylephrine

In the aortic rings from all groups of both SAMR1 and SAMP8 mice, treatment with the NOS inhibitor L-NAME (10^{-4} M) markedly increased contractile responses to phenylephrine (Fig. 2A and Table 1), although it did not modify the sensitivity to phenylephrine (evidenced by pD₂ values). The indirect evaluation of NO contribution to phenylephrine-mediated contractions was evidenced by calculating the difference between the areas under the curves obtained in L-NAME-treated and untreated (control) curves (Fig. 2B). Both SAMR1 and SAMP8 mice presented an age-dependent reduction of the differences in the area under the curve, suggesting an attenuation of NO release by phenylephrine. This aging-associated reduction was faster in SAMP8, starting at 6 months and further increasing at 10 months old. Conversely, the

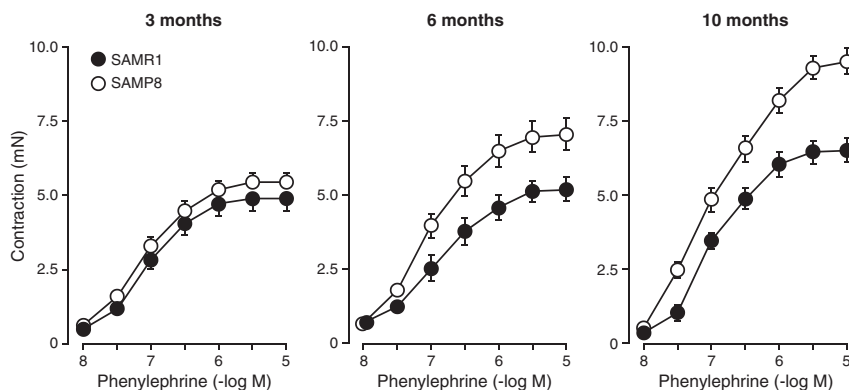


Fig. 1. Concentration–response curves to phenylephrine in the aortic rings of 3-, 6-, and 10-month-old SAMR1 and SAMP8 mice. Each data point shows the mean \pm SEM from $n = 10$ mice for each group.

Table 1

pD₂ values and maximal responses (Emax) to phenylephrine in the aortic rings of 3-, 6-, and 10-month-old SAMR1 and SAMP8 mice groups in the absence (control) and in the presence of L-NAME (10⁻⁴ M).

Phenylephrine	SAMR1		SAMP8	
	pD ₂	Emax (mN)	pD ₂	Emax (mN)
Control				
3 months	7.14 ± 0.15	4.9 ± 0.4	7.18 ± 0.12	5.4 ± 0.3
6 months	7.07 ± 0.16	5.2 ± 0.4	7.10 ± 0.14	7.1 ± 0.5 [#]
10 months	7.05 ± 0.10	6.5 ± 0.3 ^{#†}	7.04 ± 0.10	9.5 ± 0.4 ^{#†}
L-NAME 10 ⁻⁴ M				
3 months	7.07 ± 0.12	9.6 ± 0.6 [‡]	7.14 ± 0.13	10.8 ± 0.6 [‡]
6 months	7.02 ± 0.12	9.6 ± 0.5 [‡]	7.15 ± 0.10	11.1 ± 0.5 [‡]
10 months	7.08 ± 0.11	9.3 ± 0.6 [‡]	7.08 ± 0.09	11.4 ± 0.5 [‡]

Values are means ± SEM. Maximal contraction is expressed as mN, n = 10 animals per group. [#]P < 0.05 versus SAMR1 group with the same age, [†]P < 0.05 versus 3-month old group of the same strain and treated group, [‡]P < 0.05 versus 6-month old group of the same strain and treated group and [‡]P < 0.05 versus the same age and strain of control group.

aging-associated decrease in NO contribution in SAMR1 was only at 10 months old (Fig. 2B).

3.3. Time course of the endothelium-dependent and NO-mediated relaxation to acetylcholine

Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine did not differ between the SAMR1 and SAMP8 groups at 3 months old (Fig. 3A and Table 2). In SAMR1, decreases in acetylcholine-induced relaxation were observed only in 10-month-old group. On the other hand, SAMP8 displayed decreased endothelium-dependent responses at 6 months, which were further decreased at 10 months (Fig. 3A and Table 2). Differences between strains were observed at 6 and 10 months. In these aging groups, maximal relaxations and sensitivity (evidenced by pD₂ values) in response to acetylcholine were significantly reduced in the aorta from SAMP8 compared to SAMR1 (Table 2). Responses to acetylcholine in 10-month-old SAMR1 were comparable to those obtained in 6-month-old SAMP8 (Fig. 3A and Table 2). When the areas under the curve were analyzed, the NO-mediated relaxation was attenuated in 6-month-old group of SAMP8 mice and further reduced in 10-month-old group (Fig. 3B). In SAMR1, attenuation only was observed at 10 month-old group (Fig. 3B). In SAMP8 mice, the reduction of NO-mediated responses was faster in comparison to the respective SAMR1 groups (Fig. 3B), suggesting a more pronounced NO reduction in SAMP8 females with aging. The treatment with L-NAME completely blunted acetylcholine-induced relaxation providing evidence that the aging- and senescence-associated impairment of endothelial function is mostly dependent on changes of NO bioavailability.

Supporting the data on vascular reactivity, analysis of eNOS protein (Fig. 4A and B) and gene (Fig. 4C) expression revealed an earlier and more pronounced aging-associated decrease eNOS expression in SAMP8 when compared to SAMR1. Similar pattern of responses was observed when measurement of NO metabolites, NO₂⁻/NO₃⁻, was performed. Plasma samples of SAMR1 and SAMP8 mice reveal a progressive decrease on NO production in SAMP8, while SAMR1 mice show a significant decrease on NO production only at 10 months old (Fig. 4D).

3.4. Time course of the endothelium-independent and NO-mediated relaxation to sodium nitroprusside

Concentration–response curves to sodium nitroprusside were performed to evaluate smooth muscle sensitivity to NO in the aortic rings. In phenylephrine-contracted aortic rings from both SAMR1 and SAMP8, sodium nitroprusside induced a maximal relaxation of 100% in

all groups and the sensitivity was not altered by the age of mice or strain (Fig. 5).

4. Discussion

Several studies have examined vascular function associated with aging; however, most of these studies have not examined the progression of vascular dysfunction as aging develops. This is a time-course study that focuses on the female senescent-accelerated mouse model during development of aging. The present study brings new insights in the comprehension of the physiological role of adrenergic and endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine responses in the aorta from female mice with accelerated senescence. Our results indicate that both chronological aging and accelerated senescence induce 1) an increment in contractile responses to α₁ adrenergic receptor stimulation, 2) a decrease in endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and 3) a decrease of eNOS expression and NO production. Although aging-associated effects were obtained in both SAMR1 and SAMP8, they were accelerated in SAMP8, suggesting this strain as an appropriate model to study vascular effects of aging in a more convenient standard time. At 3 months old, both strains exhibited a similar, receptor-dependent contractile response induced by phenylephrine, thus discarding differences due to strain-specific changes. Nevertheless, contractile responses in SAMP8 mice were higher than those of SAMR1 at 6 months old, and further increased at 10 months.

Phenylephrine-induced constriction is mediated primarily via activation of α₁-adrenoceptors that play important roles in control of systemic blood pressure and are involved in age-related vasospasms in human subjects (Dinenno et al., 2001). The finding that female SAMP8 aorta is hyper-responsive to phenylephrine agrees with previous studies on catecholamine vascular reactivity in the aged animals (Eric et al., 2010; Kung and Luscher, 1995; Llorens et al., 2007). Such enhanced contractions may have important clinical implications. α₁-Adrenergic receptors are prime mediators of vasoconstriction in the human vasculature (Leech and Faber, 1996; Rudner et al., 1999) and thus affect arterial and venous vascular tone, peripheral resistance and blood pressure, and cardiac filling (Docherty, 2010). Thus, increased α₁-adrenergic-mediated contractions induced by aging may contribute to the enhanced cardiovascular responses in SAMP8 compared with SAMR1 mice.

Nonetheless, even though our results suggest a potential aging-associated modulation of sympathetic pathway, in a previous study we demonstrated an aging- and senescence-associated increased contraction to another non-sympathetic agonist, thromboxane A₂ (TXA₂) (Novella et al., 2010, 2013). In this regard, we can speculate that there is an aging- and senescence-associated modulation of key regulators of vascular contraction. It is well known that endothelial cells contribute to the regulation of vascular tone and modulate the response to different agonists by releasing several vasoactive factors (Deanfield et al., 2007). Therefore, the enhanced contractile responses to phenylephrine observed in the present study could be due to decrease of endothelial-derived vasodilators and/or increased of vasoconstrictors. We have previously reported that a lower NO release in response to TXA₂ receptor activation modulates the greater contractions to this agonist in SAMP8 (Novella et al., 2013). In the present study, the use of NOS inhibitor L-NAME augmented the contractile responses in the aorta from both strains at all aging groups studied, suggesting that NO is a key contributor to attenuate phenylephrine-induced contraction. However, the magnitude of L-NAME-induced potentiation in vasoconstriction was diminished by aging, suggesting an age-associated decrease in the contribution of NO to attenuate contractile responses by phenylephrine in female mice. Moreover, we observed that the reduction of NO contribution by aging was accelerated in SAMP8, starting at 6 months old, and parallels the changes in phenylephrine responses.

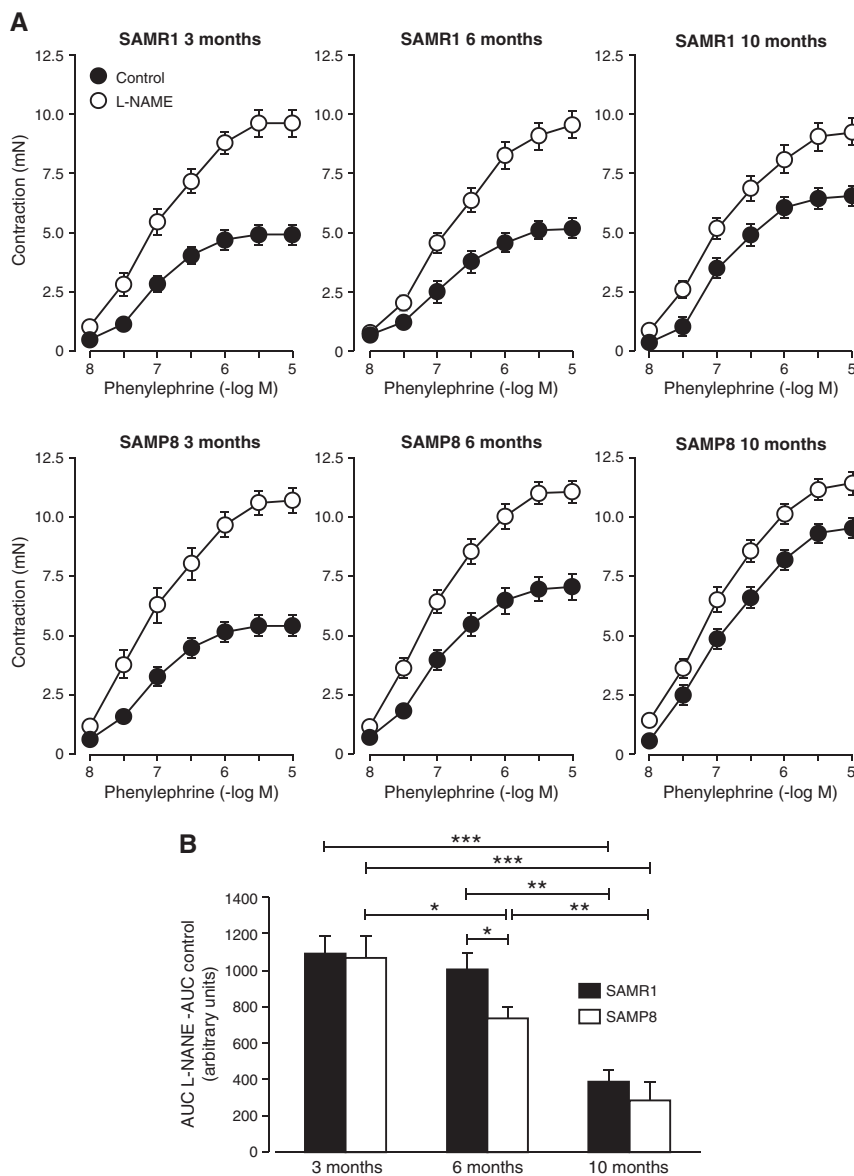


Fig. 2. (A) Concentration–response curves to phenylephrine (10^{-8} to 10^{-5} M) in the aortic rings from 3-, 6-, and 10-month-old SAMR1 and SAMP8 mice in the absence (control) and in the presence of NOS synthase inhibitor L-NAME (10^{-4} M). Each data point shows the mean \pm SEM from $n = 10$ mice for each group. (B) Area under curves (AUC) from concentration–response curves in the presence of L-NAME (10^{-4} M) minus AUC in untreated arteries (control). Each data point shows the mean \pm SEM from $n = 10$ mice for each group. $P < 0.05$; $**P < 0.01$; and $***P < 0.001$.

Accordingly, relaxations induced by acetylcholine were also reduced with aging in both SAMR1 and SAMP8, an effect that also happened faster in SAMP8 mice. Considering that the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine was completely inhibited by L-NAME at all ages, these results reinforce the theory that changes in NO-mediated responses are a major contributor to the aging- and senescence-associated impairment of vascular function in female aorta.

In our studies we have not found any difference in the vascular responses to sodium nitroprusside (NO donor), therefore the reduced vasodilator responses observed in older mice were not caused by a decreased sensitivity of vascular smooth muscle cells to NO, but rather to a reduced endothelium-dependent production or bioavailability of NO. Our results agree with findings of preserved vasorelaxant responses to sodium nitroprusside in humans despite age-associated impairments in acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation (DeSouza

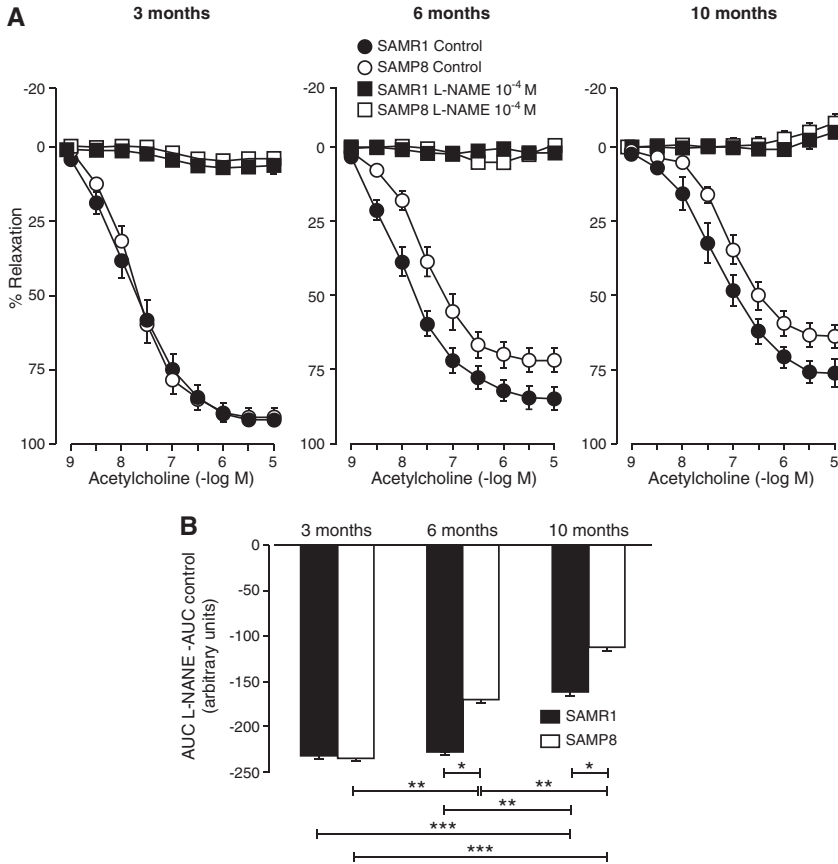


Fig. 3. (A) Concentration–response curves to acetylcholine (10⁻⁹ to 10⁻⁵ M) in the aortic rings from 3-, 6-, and 10-month-old SAMR1 and SAMP8 mice in the absence (control) and in the presence of NOS synthase inhibitor L-NAME (10⁻⁴ M). Each data point shows the mean ± SEM from n = 10 mice for each group. (B) Area under curves (AUC) from concentration–response curves in the presence of L-NAME (10⁻⁴ M) minus AUC in untreated arteries (control). Each data point shows the mean ± SEM from n = 10 mice for each group. *P < 0.05; **P < 0.01; and ***P < 0.001.

Table 2
pD₂ values and maximal responses (Emax) to acetylcholine in the aortic rings of 3-, 6-, and 10-month-old SAMR1 and SAMP8 mice groups in the absence (control) and in the presence of L-NAME (10⁻⁴ M).

Acetylcholine	SAMR1		SAMP8	
	pD ₂	Emax (%)	pD ₂	Emax (%)
Control				
3 months	7.80 ± 0.09	92 ± 3	7.81 ± 0.07	91 ± 3
6 months	7.96 ± 0.09	85 ± 4	7.57 ± 0.08*#	72 ± 4*#
10 months	7.16 ± 0.08#†	76 ± 4#†	7.01 ± 0.09#†	64 ± 4*#†
L-NAME 10⁻⁴ M				
3 months	^a	6 ± 2 [‡]	^a	4 ± 2 [‡]
6 months	^a	2 ± 1 [‡]	^a	5 ± 1 [‡]
10 months	^a	-5 ± 2 [‡]	^a	-8 ± 3 [‡]

Values are means ± SEM. Maximal relaxation is expressed as the percentage of relaxation from pre-contraction in response to phenylephrine. n = 10 animals per group. *P < 0.05 versus SAMR1 group with the same age, #P < 0.05 versus 3-month old group of the same strain and treated group, †P < 0.05 versus 6-month old group of the same strain and ‡P < 0.05 versus the same age and strain of control group. ^apD₂ value was not calculated as the maximum relaxation to acetylcholine was less than 10%.

et al., 2000; Donato et al., 2007; Eskurza et al., 2004). The fact that endothelium-independent dilation was preserved in the aorta from SAM older animals in the face of reduced endothelium-dependent relaxation represents an advantage of using the SAM mice as a model of vascular aging in humans.

Growing evidences have established that aging results in well-defined genetic and phenotypic changes, which turn the cardiovascular system prone to disease even in the absence of traditional risk factors (Ungvari et al., 2010). Among the genetic changes we can mention an age-related decline in eNOS expression (Tanabe et al., 2003; Wang et al., 2011). Consistent with vascular reactivity data, no significant differences on eNOS expression were observed when mice were 3 months old. However, when mice reach middle age (i.e. 6 months) a slight decrease of eNOS was observed in SAMR1, while SAMP8 exhibited a much higher reduction on its expression. The levels of eNOS observed in 6-month-old SAMP8 were only seen on SAMR1 when they were 10 months old. Moreover, we observed a decrease in markers of NO metabolism (NO₂⁻/NO₃⁻) that follow similar pattern of modification by aging and senescence observed in vascular reactivity and eNOS expression studies. Therefore, a decrease in NO production by diminished eNOS expression, rather than changes in NO signaling, may be responsible to the impairment of vascular responses by aging and accelerated senescence in female vasculature.

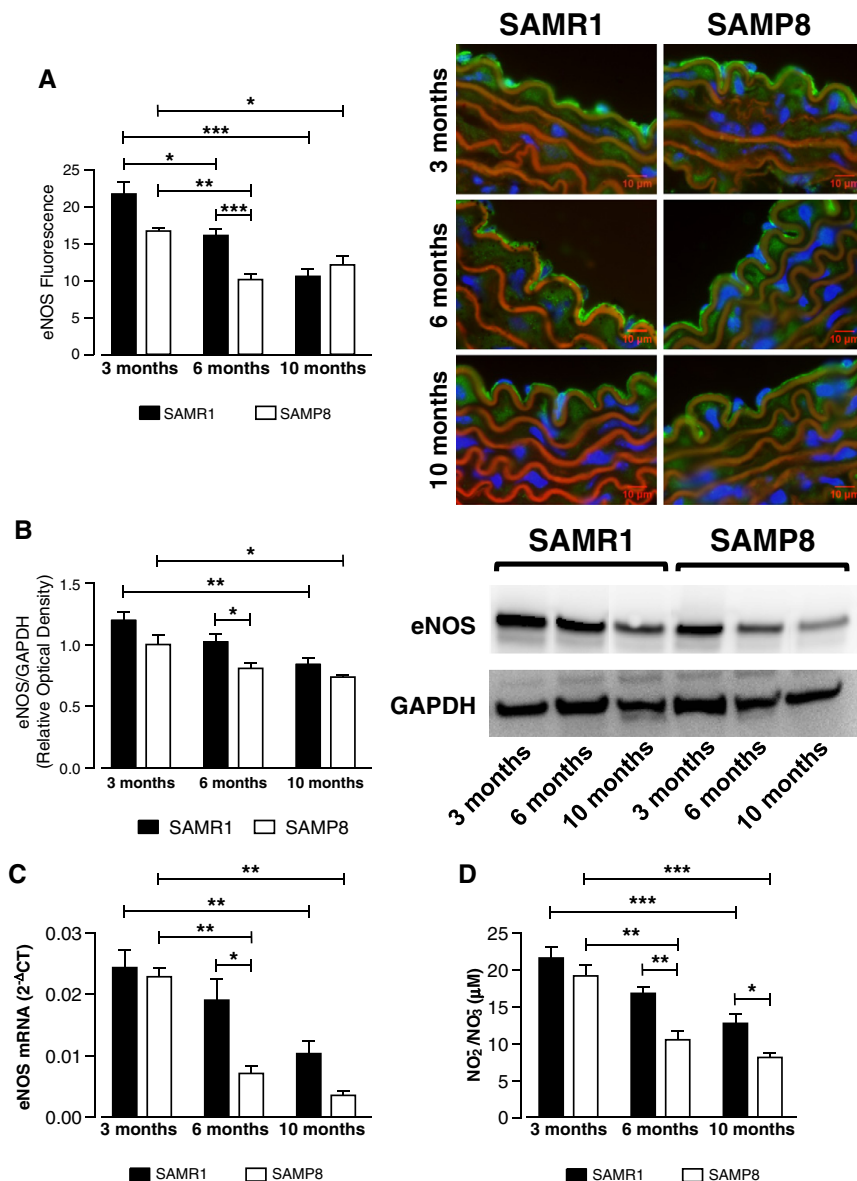


Fig. 4. NO production and eNOS expression in thoracic aorta from SAMR1 and SAMP8 female mice at different ages: (A) right: representative immunofluorescent merged images. Staining shows nucleus (blue, DAPI), actin fibers (red, phalloidin), and eNOS (green). Bar graphs (left) show the results of densitometric analyses from pooled data. (B) Right panel shows the results of immunoblots analyzed in mice aorta from SAMR1 and SAMP8 probed with antibodies against eNOS and GAPDH, as indicated. Bar graphs (left) show the results of densitometric analyses for eNOS normalized by the corresponding optical density for GAPDH. (C) eNOS mRNA expression in mice aorta normalized to the expression of GAPDH, which was used as an endogenous reference gene. (D) Nitrite/nitrate ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) concentration (μM) in the plasma from SAMR1 and SAMP8 mice. Data are plotted as the mean \pm SEM derived from 4 to 6 independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; and *** $P < 0.001$.

Despite a decreased bioavailability of NO in aged SAM mice, there is evidence that aging is associated with an increased inducible NOS (iNOS) expression in vascular tissues from aged rats (Cernadas et al., 1998; Csiszar et al., 2002) and humans (Rodríguez-Mañás et al., 2009). The induction of iNOS within the vascular wall would promote

oxidative stress through formation of peroxynitrite from the reaction of iNOS-derived NO with superoxide (Xia and Zweier, 1997) and through superoxide formation following uncoupling of NOS (Xia et al., 1998). Further studies are required to determine the role of the iNOS in vascular dysfunction in SAM mice.

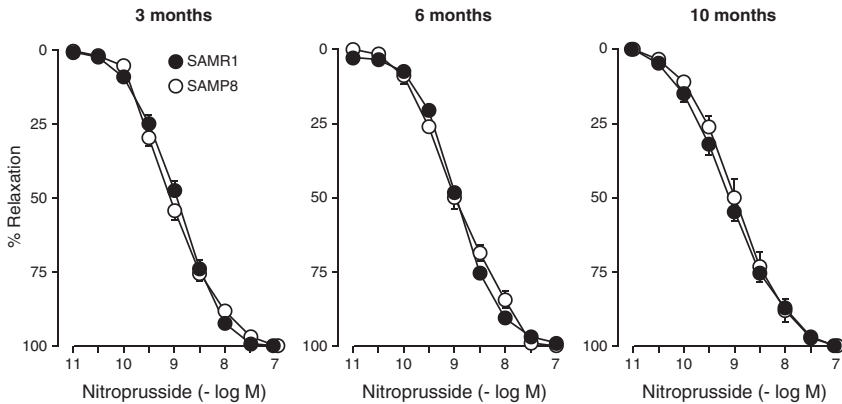


Fig. 5. Concentration–response curves to sodium nitroprusside (10^{-11} to 10^{-7} M) in the aortic rings from 3-, 6-, and 10-month old SAMR1 and SAMP8. Each data point shows the mean \pm SEM from $n = 10$ mice for each group.

5. Conclusions

This study provides evidence that contractile response to phenylephrine and the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine are modified by chronological aging in female mice by a mechanism involving the decreased of eNOS expression and NO production. These effects occur at earlier age in the aorta from female SAMP8 mice (6 months) and are comparable to the effects observed in SAMR1 mice at older age (10 months). Thus we suggest that 6-month-old female SAMP8 mice as a valuable model to study the mechanisms of vascular aging at a convenient standard time course.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interests.

Acknowledgments

We are indebted to Nadia Castillo for her exceptional technical assistance. Supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III – FEDER-ERDF (grants FIS PI08/0176, PI10/00518 and Red Cardiovascular RD12/0042/0052 and RD12/0042/0006), Universitat de Valencia (grant UV-INV-AE13-141529) and Conselleria de Educación, Generalitat Valenciana (grant ACOMP/2013/171).

References

Butterfield, D.A., Poon, H.F., 2005. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* 40, 774–783.

Cernadas, M.R., Sanchez de Miguel, M.L., Garcia-Duran, M., Gonzalez-Fernandez, F., Millas, I., Monton, M., Rodrigo, J., Rico, L., Fernandez, P., de Frutos, T., Rodriguez-Feo, J.A., Guerra, J., Caramelo, C., Casado, S., Lopez-Farre, A., 1998. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ. Res.* 83, 279–286.

Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J.G., Kaminski, P., Wolin, M.S., Koller, A., Kaley, G., 2002. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arterial function. *Circ. Res.* 90, 1159–1166.

Deanfield, J.E., Halcox, J.P., Rabelink, T.J., 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115, 1285–1295.

DeSouza, C.A., Shapiro, L.F., Clevenger, C.M., Dinunno, F.A., Monahan, K.D., Tanaka, H., Seals, D.R., 2000. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation* 102, 1351–1357.

Dinunno, F.A., Tanaka, H., Stauffer, B.L., Seals, D.R., 2001. Reductions in basal limb blood flow and vascular conductance with human ageing: role for augmented alpha-adrenergic vasoconstriction. *J. Physiol.* 536, 977–983.

Docherty, J.R., 2010. Subtypes of functional α_1 -adrenoceptor. *Cell Mol. Life Sci.* 67, 405–417.

Donato, A.J., Eskurza, I., Silver, A.E., Levy, A.S., Pierce, G.L., Gates, P.E., Seals, D.R., 2007. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor- κ B. *Circ. Res.* 100, 1659–1666.

Erac, Y., Selli, C., Kosova, B., Akcali, K.C., Tosun, M., 2010. Expression levels of TRPC1 and TRPC2 ion channels are reciprocally altered in aging rat aorta: implications for age-related vasospastic disorders. *Age (Dordr.)* 32, 223–230.

Erusalimsky, J.D., 2009. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J. Appl. Physiol.* 106, 326–332.

Eskurza, I., Monahan, K.D., Robinson, J.A., Seals, D.R., 2004. Effect of acute and chronic ascorbic acid on flow-mediated dilation with sedentary and physically active human ageing. *J. Physiol.* 556, 315–324.

Fenton, M., Huang, H.L., Hong, Y., Hawe, E., Kurz, D.J., Erusalimsky, J.D., 2004. Early atherosclerosis in senescence-accelerated mice. *Exp. Gerontol.* 39, 115–122.

Kung, C.F., Luscher, T.F., 1995. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension* 25, 194–200.

Lakatta, E.G., Levy, D., 2003. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation* 107, 139–146.

Leech, C.J., Faber, J.E., 1996. Different alpha-adrenoceptor subtypes mediate constriction of arterioles and venules. *Am. J. Physiol.* 270, H710–H722.

Llorens, S., de Mera, R.M., Pascual, A., Prieto-Martin, A., Mendizabal, Y., de, C.C., Nava, E., Jordan, J., 2007. The senescence-accelerated mouse (SAM-P8) as a model for the study of vascular functional alterations during aging. *Biogerontology* 8, 663–672.

Miyamoto, M., 1997. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp. Gerontol.* 32, 139–148.

Novella, S., Dantas, A.P., Segarra, G., Novensa, L., Bueno, C., Heras, M., Hermenegildo, C., Medina, P., 2010. Gathering of aging and estrogen withdrawal in vascular dysfunction of senescent accelerated mice. *Exp. Gerontol.* 45, 868–874.

Novella, S., Dantas, A.P., Segarra, G., Novensa, L., Heras, M., Hermenegildo, C., Medina, P., 2013. Aging enhances contraction to thromboxane A_2 in aorta from female senescence-accelerated mice. *Age (Dordr.)* 35, 117–128.

Novensa, L., Selent, J., Pastor, M., Sandberg, K., Heras, M., Dantas, A.P., 2010. Equine estrogens impair nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase transcription in human endothelial cells compared with the natural 17 β -estradiol. *Hypertension* 56, 405–411.

Novensa, L., Novella, S., Medina, P., Segarra, G., Castillo, N., Heras, M., Hermenegildo, C., Dantas, A.P., 2011. Aging differently affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER α /ER β balance in female mice. *PLoS One* 6, e25335.

Pereira, T.M., Nogueira, B.V., Lima, L.C., Porto, M.L., Arruda, J.A., Vasquez, E.C., Meyrelles, S.S., 2010. Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. *Lipids Health Dis.* 9, 87.

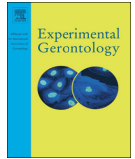
Rodriguez-Mañas, L., El-Assar, M., Vallejo, S., Lopez-Doriga, P., Solis, J., Petitdidier, R., Montes, M., Nevado, J., Castro, M., Gomez-Guerrero, C., Peiro, C., Sanchez-Ferrer, C.F., 2009. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell* 8, 226–238.

Rudner, X.L., Berkowitz, D.E., Booth, J.V., Funk, B.L., Cozart, K.L., D'Amico, E.B., El-Moalem, H., Page, S.O., Richardson, C.D., Winters, B., Marucci, L., Schwinn, D.A., 1999. Subtype specific regulation of human vascular α_1 -adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation* 100, 2336–2343.

Schutzer, W.E., Mader, S.L., 2012. Biochemical and molecular aspects of vascular adrenergic regulation of blood pressure in the elderly. *Int. J. Hypertens.* 2012, 915057.

Shaw, L.J., Bairey Merz, C.N., Pepine, C.J., Reis, S.E., Bittner, V., Kelsey, S.F., Olson, M., Johnson, B.D., Mankad, S., Sharaf, B.L., Rogers, W.J., Wessel, T.R., Arant, C.B., Pohost, G.M., Lerman, A., Quyyumi, A.A., Sopko, G., 2006. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study: part I: gender differences in traditional and novel risk factors, symptom evaluation, and gender-optimized diagnostic strategies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 47, 54–520.

- Takeda, T., Hosokawa, M., Higuchi, K., 1997. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Exp. Gerontol.* 32, 105–109.
- Takenouchi, Y., Kobayashi, T., Matsumoto, T., Kamata, K., 2009. Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. *Atherosclerosis* 206, 397–404.
- Tanabe, T., Maeda, S., Miyauchi, T., Iemitsu, M., Takanashi, M., Irukayama-Tomobe, Y., Yokota, T., Ohmori, H., Matsuda, M., 2003. Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta. *Acta Physiol. Scand.* 178, 3–10.
- Ungvari, Z., Kaley, G., de, C.R., Sonntag, W.E., Csiszar, A., 2010. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 65, 1028–1041.
- Wang, J.S., Liu, X., Xue, Z.Y., Alderman, L., Tilan, J.U., Adenika, R., Epstein, S.E., Burnett, M.S., 2011. Effects of aging on time course of neovascularization-related gene expression following acute hindlimb ischemia in mice. *Chin. Med. J. (Engl.)* 124, 1075–1081.
- Xia, Y., Zweier, J.L., 1997. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6954–6958.
- Xia, Y., Roman, L.J., Masters, B.S., Zweier, J.L., 1998. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J. Biol. Chem.* 273, 22635–22639.



Decreased bioavailability of nitric oxide in aorta from ovariectomized senescent mice. Role of cyclooxygenase



Xavier Vidal-Gómez^{a,b,1}, Susana Novella^{a,b,1}, Isabel Pérez-Monzó^{a,b}, Manel Garabito^{c,d}, Ana Paula Dantas^{c,d}, Gloria Segarra^{a,b}, Carlos Hermenegildo^{a,b}, Pascual Medina^{a,b,*}

^a Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain

^b INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain

^c Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

^d Institut Clínic del Tòrax, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2015

Received in revised form 23 December 2015

Accepted 12 January 2016

Available online 13 January 2016

Section Editor: Christiaan Leeuwenburgh

Keywords:

Senescence-accelerated mice

Aging

Experimental menopause

Vascular reactivity

Prostanoids

Nitric oxide

Estrogen

ABSTRACT

This study investigates the effects of aging and/or ovariectomy on vascular reactivity to thromboxane A₂ (TXA₂) receptor stimulation with U46619, and the modulation by nitric oxide (NO) and cyclooxygenase (COX) in aorta from female senescence-accelerated mice (SAMP8) and from senescence resistant mice (SAMR1). Five-month-old female SAMR1 and SAMP8 were divided into three groups: sham-operated, ovariectomized and ovariectomized plus estradiol. Twenty-eight days after surgery, thoracic aortic rings were mounted for isometric recording of tension and concentration–response curves for U46619 (10^{-10} – 3×10^{-7} M) were performed in the absence and in the presence of the NO synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} M) and/or COX inhibitor indomethacin (10^{-5} M). Vascular superoxide production was detected by dihydroethidium staining on sections of thoracic aorta. NO bioavailability in response to U46619 was suppressed by estrogen withdrawn in young and senescent mice and was restored by the administration of estradiol. In the presence of indomethacin, contractions to U46619 decreased in all groups indicating an aging- and estrogen-dependent modulation of contractile prostanoids. The simultaneous incubation of L-NAME and indomethacin did not change the maximal responses and sensitivities to TXA₂ in any group in comparison with untreated aortic segments. The superoxide generation induced by TXA₂ was greater in aorta from SAMP8 than in SAMR1. Moreover, in ovariectomized groups superoxide production was further increased and treatment with 17β-estradiol reverted the effects of the ovariectomy. Inhibition of COX with indomethacin prevented the U46619-induced increase in superoxide formation. Our results indicate that NO bioavailability in response to TP receptor activation is both estrogen- and aging-dependent. TXA₂ induced contractions are partially mediated by COX activation. Both aging and ovariectomy enhanced COX-dependent component of the TXA₂-induced contraction. It is noteworthy that in the absence of estrogen, COX inhibition induces an increase of NO bioavailability. Therefore, in senescent female mice with an experimental menopause, TP-receptor stimulation is responsible for COX activation and enhanced superoxide generation, which may result in reduced NO bioavailability. These effects were reversed by estrogen administration.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Vascular aging, characterized by endothelial dysfunction, is a major risk factor for developing cardiovascular disease (Lakatta and Levy, 2003). Estrogens possess vasculoprotective effects (Cano et al., 2007; Dantas and Sandberg, 2006) mostly mediated by an increase in endothelium-derived vasodilator factors, including nitric oxide (NO) (Mendelsohn, 2009) and prostacyclin (Sobrinho et al., 2010). In women,

the acceleration of the vascular dysfunction after menopause suggests that reduction in estrogen levels may be a triggering event that leads to increased vascular vulnerability (Moreau and Hildreth, 2014; Novella et al., 2012). However since menopause coincides with aging, whether the higher cardiovascular risk in postmenopausal women is a function of aging, a consequence of menopause, or both has been debated in the literature for many years (Bittner, 2009). Therefore, further understanding of the biological pathways involved in vascular aging in women during transition to menopause is needed.

Thromboxane A₂ (TXA₂), a vasoconstrictor prostanoid, plays an important role in the regulation of vascular tone in the normal systemic vasculature (Fulton and Stallone, 2002) through activation of the TXA₂ receptor (TP) (Li et al., 2008). In contrast, abnormal TXA₂-mediated

* Corresponding author at: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Avenida Blasco Ibañez 15, 46010, Valencia, Spain.

E-mail address: pascual.medina@uv.es (P. Medina).

¹ These authors contributed equally to this work.

activity is involved in the pathophysiology of vascular dysfunction during estrogen withdrawal (Dantas et al., 1999, 2004) and aging (Briones et al., 2005; Matz et al., 2000; Vanhoutte, 2009). Vascular dysfunction associated to aging involves cyclooxygenase (COX) activation and elevated TP receptor expression (Novella et al., 2013a; Tang and Vanhoutte, 2008). In humans, the production of COX-derived endothelium-derived contractile factors is a characteristic of the aged blood vessels that results in an earlier onset and acceleration of the endothelial dysfunction (Taddei et al., 1997a,b). Animal studies link the effect of both aging and ovariectomy, conditions present in menopausal women, proving that increased COX-dependent vasoconstriction is mediated by TP receptor activation (Davidge et al., 1996; Davidge and Zhang, 1998).

There are evidences that support a potential interaction between NO synthase (NOS) and COX systems (Goodwin et al., 1999; Mollace et al., 2005). On the one hand, NO has been shown to modulate COX activity and modify prostanoid production (Davidge et al., 1995; Miyamoto et al., 2007). Conversely, COX-derived prostanoids, such as TXA₂, modulate NOS activity by downregulation of phosphorylation and decreasing its activity (Ashton and Ware, 2004). With aging, enhanced vasoconstriction mediated by endothelium-derived TXA₂ induces a decrease in NO that amplifies the endothelial dysfunction (Feletou et al., 2009; Matz et al., 2000).

In addition, another mechanism underlying age-associated reductions in endothelium-dependent vasodilation and NO bioavailability is the development of vascular oxidative stress (Eskurza et al., 2004; Taddei et al., 2001). In fact, a great burden of oxidative stress is seen during aging (Hamilton et al., 2001) and menopause (Hildreth et al., 2014) which can contribute to vascular dysfunction.

Senescence-accelerated mice (SAM) model of vascular aging replicates most of the features and pathophysiological states founds in human aging, *i.e.* SAM model display impaired endothelial-dependent dilation with advancing age (Novella et al., 2013b). Our approach is to induce a surgical menopause in SAM to determine how aging and/or estrogen withdrawal affects vascular contraction to TXA₂ and how the interplay between vascular mediators such as NO and prostanoids affect this response.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals

Female senescence-accelerated mouse-resistant 1 (SAMR1, $n = 42$) and senescence-accelerated mouse-prone 8 (SAMP8, $n = 42$) were obtained from the breeding stock at University of Valencia and housed according to institutional guidelines (22 °C constant room temperature, 12 h light/dark cycle, 60% humidity, standard mice chow and water *ad libitum*). All protocols were approved by the Institutional Ethics Committee at the University of Valencia, conformed to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Both SAMR1 and SAMP8 were randomly separated at 5 months of age into three groups: 1) sham-operated (Sham); 2) ovariectomized (Ovx); and 3) ovariectomized chronically-treated with estrogen (OvE). Six-month old sham-operated SAMR1 was used as control group, as they present a regular life-span.

2.2. Surgical procedures and hormonal treatment

Surgical procedures were performed as previously described (Novella et al., 2010). Briefly, ovariectomy was performed under isoflurane anesthesia and a single 1-cm dorsal midline incision was made in the skin and the ovaries were removed. At the moment of the surgery, half of the OvX mice received estrogen replacement by subcutaneous implant of an osmotic pump (Model 2004, Alzet Osmotic Pumps®; Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) containing 17 β -estradiol in 50% DMSO at a dose of 10 μ g/kg/day (OvE). Untreated OvX mice were implanted with a pump filled with vehicle only (50% DMSO

in saline). Sham-operated female mice were also included. To check the efficacy of ovariectomy and estrogen treatments, uterine weight and plasmatic 17 β -estradiol concentration were evaluated. Four weeks after surgical procedures mice were euthanized and therefore all the experiments were performed in 6-month old female mice.

2.3. Determination of biochemical variables

Blood samples were withdrawn by cardiac puncture and centrifuged at 1200 \times g for 10 min. Plasma levels of glucose, creatinine, total bilirubin and 17 β -estradiol were determined using an automatic analyzer (ADVIA Centaur® CP Immunoassay System, Siemens, Munich, Germany) at a commercial analytical service center.

2.4. Isolated mouse aorta preparation

For functional studies, thoracic aorta ($n = 8$ mice per group) was excised, placed immediately in ice cold Krebs–Henseleit solution and cleaned of surrounding tissue. Arteries were dissected into 4-mm rings, mounted between 2 stainless steel holders (100 μ m inner diameter), and placed in 4 mL tissue baths containing modified Krebs–Henseleit solution (in mM: NaCl 115; KCl 4.6; KH₂PO₄ 1.2; MgCl₂ 1.2; CaCl₂ 2.5; NaHCO₃ 25; glucose 11.1; EDTA 0.01, pH 7.3–7.4) at 37 °C and aerated with 95% O₂/5% CO₂ for isometric force measurements (Grass FT03, Grass Instruments Division Astromed, Inc., West Warwick, RI, USA). Changes in isometric force were recorded by use of Chart v. 3.4/s software and a MacLab/8e data acquisition system (ADInstruments, East Sussex, UK). Once the optimal resting tension was reached (1 g), aortic rings were allowed to attain a steady level of tension during a 1-hour equilibration period before testing.

Following the equilibration period, arterial segments were exposed to the depolarizing agent KCl (60 mM) until the contraction reached a stable plateau (10 to 20 min). After washout and return to stable baseline, functional integrity of the endothelium was confirmed routinely by the presence of relaxation induced by acetylcholine (10⁻⁷–10⁻⁶ M) during contraction obtained with serotonin (10⁻⁵ M). Only aortic segments in which acetylcholine reversed the serotonin induced tone by more than 85% were considered with functional endothelium and were used in this study.

Contractile responses were determined by cumulative concentration–response curves to the thromboxane A₂ (TXA₂) mimetic U46619 (10⁻¹⁰ to 3 \times 10⁻⁷ M) in the absence (control) and in the presence of L-NAME (10⁻⁴ M) to inhibit NOS, indomethacin (10⁻⁵ M) to inhibit COX or the combination of L-NAME (10⁻⁴ M) plus indomethacin (10⁻⁵ M), to inhibit in conjunction NOS and COX. Inhibitors were added to the organ bath 15 min prior to the concentration–response curves to U46619 were performed. Only one concentration–response curve to U46619 was obtained in each artery ring. Control and treated rings obtained from the same animal were studied in parallel.

2.5. Quantification of oxidative stress

Vascular superoxide production was detected *in situ* by dihydroethidium (DHE) staining on unfixed frozen sections of thoracic aorta from another set of animals ($n = 6$ mice in each experimental group). Freshly prepared DHE (2 μ M; Molecular Probes) was applied to 4-mm thoracic aorta segments in PBS and incubated for 30 min in a light protected humidified chamber at 37 °C and then viewed by fluorescent microscope. To study the effect of TXA₂ on superoxide production, U-46619 (10⁻⁸ M) was applied to the vascular segments 10 min after DHE addition. The role of cyclooxygenases on TXA₂-induced superoxide production was evaluated with the incubation for 15 min with indomethacin (10⁻⁵ M) before adding DHE. Control samples were only treated with DHE. After incubations, aortic segments were gently washed with PBS and mounted in Tissue-Tek® OCT compound (Sakura Finetek, USA), molded, snap frozen in dry ice, and stored at –80 °C.

Then, 10 μm sections were cut with a cryostat (Leica CM1900, Heidelberg, Germany) and included in a slide, brought to 37 °C and equilibrated with pre-warmed PBS. Aortic sections were visualized through a fluorescent microscope (Eclipse Ti-S, Nikon Co, Japan) equipped with a Nikon digital video camera (Digital Sight DS-Qi1Mc, Nikon Co, Japan). For quantification, mean intensity fluorescence was calculated from four sampled areas (40 \times magnification) per ring for each experimental condition using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD). All measurements were blind conducted.

2.6. Drugs

The following drugs were used: serotonin hydrochloride, acetylcholine chloride, N^c-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), indomethacin, 9,11-dideoxy-11 α ,9 α -epoxymethanoprostaglandin F_{2 α} (U46619), and 17 β -estradiol were obtained from Sigma (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). All drugs for vascular reactivity studies were dissolved in Krebs solution except U46619, which was dissolved initially in ethanol, and indomethacin, which was dissolved in ethanol and sodium bicarbonate solution (150 mM) and readjusted to pH 7.4 with HCl prior to use, and further diluted in Krebs solution to the proper final concentration. 17 β -estradiol was dissolved in 50% DMSO and saline. Stock solutions of each drug were freshly prepared at the day of experiment, and kept on ice throughout the experiment.

2.7. Data analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Contractions to U46619 are shown as absolute tension (g). pD₂ (negative logarithm of the molar concentration at which half-maximum contraction occurs) was determined from individual concentration–response curves by non-linear regression analysis. Concentration–response curves to U46619 were also statistically analyzed by comparing the areas under the curves (AUCs) of treated and untreated groups. In each experimental group *n* indicates the number of animals. Differences between mouse strains (*i.e.*, SAMR1 vs. SAMP8) and by experimental treatment groups (*i.e.*, Sham, OvX vs. OvE) were analyzed by two-way ANOVA, and then Bonferroni's test was performed. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$. The statistical analysis was carried out using the Prism 4 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Biochemical and morphological parameters

To assess the effectiveness of ovariectomy and estrogen treatment, uterine weights and estrogen levels were determined. No differences among Sham groups were detected, indicating that senescence-accelerated female mice (SAMP8) did not change ovarian function. In OvX and OvE groups, changes on uterine weight were similar in both strains (Table 1). As expected, uterine weight and estrogen plasma levels decreased with ovariectomy ($P < 0.01$), assuring the efficacy of the surgical process. Estrogen treatment prevented the loss in uterine mass and kept plasma levels of 17 β -estradiol in OvX to similar levels

as seen in Sham females. These data demonstrate the effectiveness of estrogen dose used to treat ovariectomized mice. Plasmatic concentrations of glucose, creatinine and total bilirubin were not affected by aging, ovariectomy or estrogen treatment (Table 1).

3.2. Modulation of TXA₂ contraction by NO

In aortas from sham-operated SAMR1, the analog of TXA₂ induced a concentration-dependent contraction that was significantly enhanced in the presence of the NOS inhibitor L-NAME (10⁻⁴ M) (Fig. 1A) suggesting a modulation of TXA₂ contraction by NO. The involvement of NO in TXA₂ contraction was abolished in aorta from SAMR1 OvX and restored by estradiol treatment (Fig. 1), demonstrating an estrogen-dependent NO modulation in this vascular response. In senescent sham-operated females (SAMP8), however, contractions to TXA₂ increased in the presence of L-NAME in a lesser extent than in SAMR1 (Fig. 1A). This NO modulation was also estrogen-dependent as it was lost in aorta from OvX mice and restored in aorta from estradiol-treated (OvE) mice (Fig. 1A). Maximal response and pD₂ values of the concentration response curves to U46619 in the different experimental conditions are summarized in Table 2. The role of NO in response to TXA₂ was further analyzed by calculating the difference (Δ) between the AUC to U46619 of the untreated segments (Control) and those treated with L-NAME (Fig. 1B).

3.3. Modulation of TXA₂ contraction by prostanoids

In order to study the involvement of COX products in TXA₂ mediated response, we incubated arterial segments with the COX inhibitor indomethacin (10⁻⁵ M). Aorta from both SAMR1 and SAMP8 showed a decreased sensitivity to TXA₂ (Fig. 2) by indomethacin suggesting a role of contractile COX products. Through the analysis of the Δ in AUC (AUC Control – AUC indomethacin-treated), we found a greater role of contractile prostanoids on TXA₂ in senescent mice (Fig. 2B) suggesting that with aging the COX pathway is modified towards a higher production of vasoconstrictor products. The production of vasoconstrictor prostanoids was intensified in aorta from OvX mice (Fig. 2B), although this increase was twice as high in SAMP8 OvX as it was in SAMR1 OvX. Estrogen treatment restored the response levels in aorta from both OvX strains (Fig. 2B).

3.4. Modulation of TXA₂ contraction by both prostanoids and NO

To evaluate the interplay of prostanoids and NO on TXA₂ contractions during aging and menopause, aortas were incubated simultaneously with indomethacin (10⁻⁵ M) and L-NAME (10⁻⁴ M), before performing curves to TXA₂. When both pathways were inhibited, no changes were observed in maximal responses and sensitivities to TXA₂ in any surgical group in comparison with control (untreated) curves (Fig. 3). In aortas from Sham-operated and OvE mice of both SAMR1 and SAMP8, the involvement of NO counteracted the contractile prostanoids production observed in response to TXA₂ when treated alone (Fig. 3). Surprisingly, in aortas from OvX groups a masked effect of L-NAME was observed when COX was inhibited, suggesting that in

Table 1
Physiological and biochemical parameters in female SAMR1 and SAMP8.

	SAMR1			SAMP8		
	Sham	OvX	OvE	Sham	OvX	OvE
Uterus weight (mg)	143 \pm 9	30 \pm 2*	149 \pm 8 [#]	159 \pm 8	33 \pm 4*	158 \pm 9 [#]
17 β -Estradiol (pg/mL)	167 \pm 20	28 \pm 7*	189 \pm 33 [#]	158 \pm 16	25 \pm 3*	183 \pm 21 [#]
Glucose (mg/dL)	162 \pm 15	177 \pm 8	175 \pm 11	169 \pm 13	164 \pm 10	161 \pm 6
Creatinine (mg/dL)	0.26 \pm 0.01	0.30 \pm 0.02	0.30 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01	0.29 \pm 0.03	0.27 \pm 0.02
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01

Values are means \pm SEM. *n* = 13–14 animals per group. * $P < 0.01$ versus Sham-operated group of the same strain, [#] $P < 0.01$ versus OvX group of the same strain.

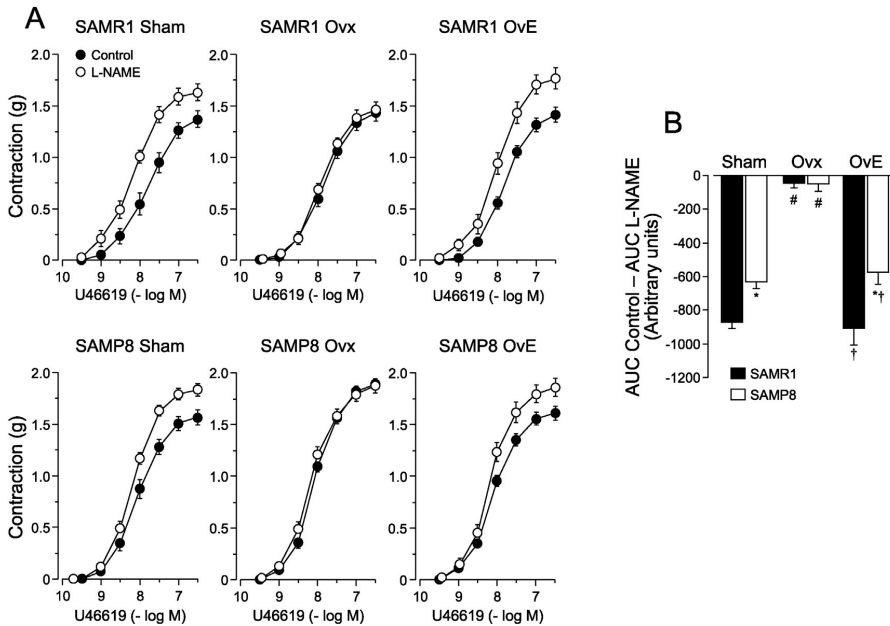


Fig. 1. (A) Concentration–response curves to U46619 in aortic rings from Sham, Ovx, and Ove SAMR1 and SAMP8 mice in the absence (Control) and in the presence of NOS synthase inhibitor L-NAME (10^{-4} M). (B) Area under curves (AUCs) from concentration–response curves in the absence (Control) minus AUC in the presence of L-NAME (10^{-4} M). Each data point shows mean \pm SEM from $n = 7$ –8 mice for each group. * $P < 0.05$ versus SAMR1 with same surgical procedure, # $P < 0.05$ versus Sham group of the same strain, and † $P < 0.05$ versus Ovx group of the same strain.

the absence of estrogen, contractile prostanoids counteracted NO contribution to TXA_2 contraction.

3.5. TXA_2 increases superoxide production

Recent studies suggest that activation of TP receptor promotes superoxide formation in vascular smooth muscle cells. Therefore, we investigated whether TP receptor activation in aorta from SAMR1 and SAMP8 induces superoxide formation and how COX inhibition could

modify the superoxide production during aging and estrogen withdrawal. Treatment of aortic segments with U46619 (10^{-8} M) induces a significant increase of superoxide (Fig. 4). The effects of TXA_2 on superoxide generation were greater in aorta from SAMP8 than in SAMR1 mice (6.22 ± 0.44 vs. 5.95 ± 0.08 , respectively). In both Ovx groups the U46619-induced superoxide production was further increased. SAMP8 superoxide levels were greater than in SAMR1 (13.4 ± 1.29 and 18.90 ± 0.96 , $P < 0.05$, respectively) and treatment with 17β -estradiol reverted the effects of the ovariectomy (Fig. 4). Treatment

Table 2

pD_2 values and maximal responses (Emax) to U46619 in aortic rings in the absence (Control) and in the presence of L-NAME (10^{-4} M), indomethacin (10^{-5} M) or L-NAME plus indomethacin from Sham, Ovx, and Ove of both SAMR1 and SAMP8 mice groups.

	SAMR1			SAMP8		
	n	pD_2	Emax (g)	n	pD_2	Emax (g)
<i>Sham-operated</i>						
Control	7	7.77 ± 0.10	1.39 ± 0.06	7	$8.12 \pm 0.05^*$	$1.62 \pm 0.06^*$
L-NAME	8	8.21 ± 0.06^a	1.64 ± 0.06^a	8	8.25 ± 0.04	1.85 ± 0.06
Indomethacin	8	7.61 ± 0.09	1.22 ± 0.07	8	7.72 ± 0.08^a	1.60 ± 0.09
L-NAME + indomethacin	8	7.70 ± 0.06	1.44 ± 0.03	8	8.10 ± 0.06^b	1.49 ± 0.04
<i>Ovariectomized</i>						
Control	7	7.82 ± 0.06	1.38 ± 0.06	7	8.10 ± 0.03	$1.92 \pm 0.04^{* \#}$
L-NAME	8	7.92 ± 0.07	1.39 ± 0.06	8	8.15 ± 0.06	1.90 ± 0.06
Indomethacin	8	7.40 ± 0.06^a	1.10 ± 0.06^a	8	7.67 ± 0.06^a	1.50 ± 0.07^a
L-NAME + indomethacin	8	7.70 ± 0.09^b	1.39 ± 0.05^b	8	8.06 ± 0.12^b	1.85 ± 0.08^b
<i>Ovariectomized + E2</i>						
Control	7	7.82 ± 0.04	1.36 ± 0.05	7	8.11 ± 0.04	1.61 ± 0.04
L-NAME	8	8.06 ± 0.08^a	1.76 ± 0.09^a	8	8.17 ± 0.07	1.84 ± 0.07^a
Indomethacin	8	7.71 ± 0.06	1.23 ± 0.07	8	7.73 ± 0.04^a	1.65 ± 0.07
L-NAME + indomethacin	8	7.75 ± 0.06	1.35 ± 0.06	8	8.04 ± 0.07^b	1.55 ± 0.04

Values are means \pm SEM, n, animals per group. * $P < 0.05$ versus SAMR1 group with same treatment, # $P < 0.05$ versus Sham group of the same strain, † $P < 0.05$ versus untreated aortic rings (Control) of the same strain and surgical group and ‡ $P < 0.05$ versus indomethacin-treated aortic rings of the same strain and surgical group.

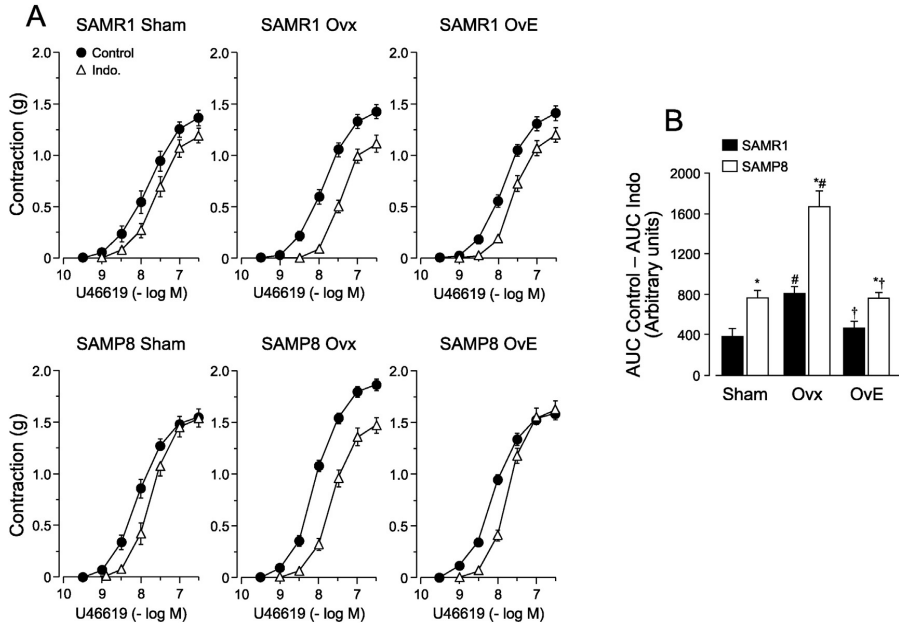


Fig. 2. (A) Concentration–response curves to U46619 in aortic rings from Sham, OvX, and OvE SAMR1 and SAMP8 mice in the absence (Control) and in the presence of the nonselective COX inhibitor indomethacin (Indo, 10⁻⁵ M). (B) Area under curves (AUCs) from concentration–response curves in the absence (Control) minus AUC in the presence of Indo. (10⁻⁵ M). Each data point shows mean ± SEM from n = 7–8 mice for each group. *P < 0.05 versus SAMR1 group with same surgical procedure, #P < 0.05 versus Sham group of the same strain, and †P < 0.05 versus OvX group of the same strain.

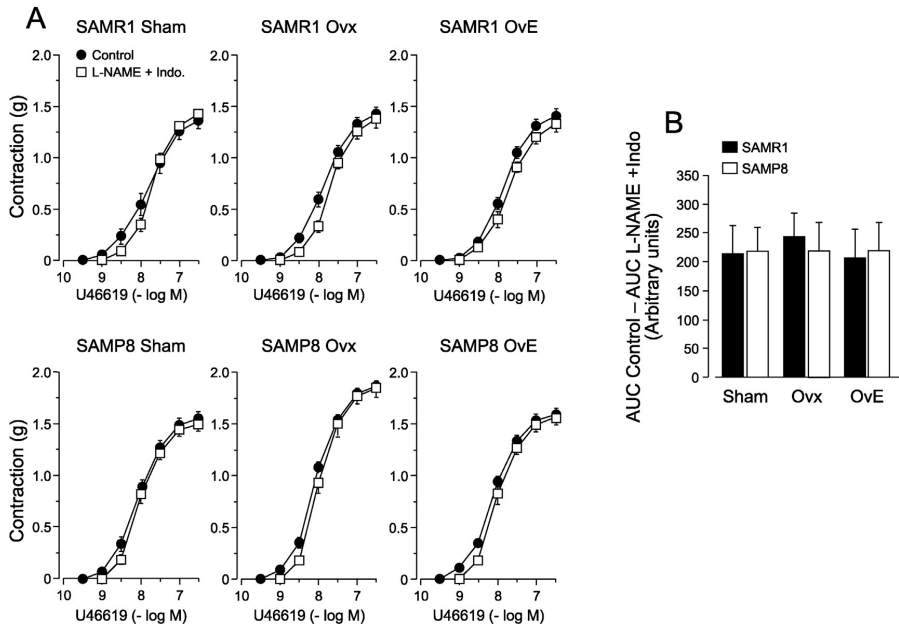


Fig. 3. (A) Concentration–response curves to U46619 in aortic rings from Sham, OvX, and OvE SAMR1 and SAMP8 mice in the absence (Control) and in the presence of L-NAME (10⁻⁴ M) plus indomethacin (Indo, 10⁻⁵ M). (B) Area under curves (AUCs) from concentration–response curves in the absence (Control) minus AUC in the presence of L-NAME (10⁻⁴ M) plus Indo. (10⁻⁵ M). Each data point shows mean ± SEM from n = 7–8 mice for each group.

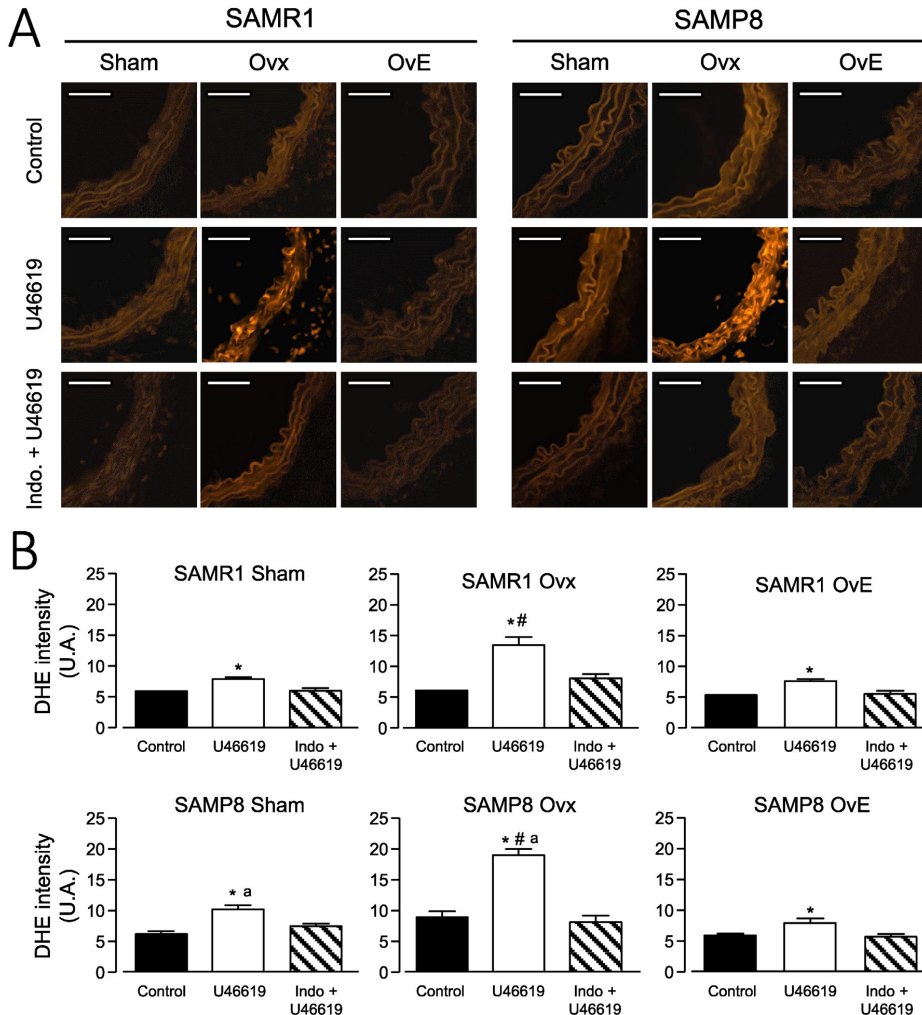


Fig. 4. (A) Dihydroethidium (DHE) staining in aorta sections from Sham, OvX, and OvE SAMR1 and SAMP8 mice in the absence (Control) and in the presence of U46619 (10^{-8} M) and indomethacin (Indo, 10^{-5} M) plus U46619 (10^{-8} M). (B) Quantification of fluorescent intensity from superoxide anion production in aortic sections exposed to different conditions. Each value shows mean \pm SEM from 6 mice for each group. * $P < 0.05$ versus untreated aorta sections (Control) of the same strain and surgical group, # $P < 0.05$ versus Sham group of the same strain, ^a $P < 0.05$ versus SAMR1 group with same treatment and surgical group.

with indomethacin (10^{-5} M) prevented the increase in superoxide formation induced by U46619, suggesting a role of the COX activation in the superoxide generation (Fig. 4).

4. Discussion

In the present study, we demonstrate that contractile response to TP receptor stimulation is modulated by an interaction between NOS and COX pathways in aorta from SAM mice. This interaction is altered by aging and estrogen status and is driven partially by COX-mediated generation of superoxide that decreases NO bioavailability.

One approach to understand the contribution of human menopause in the vascular function is to evaluate changes mediated by aging and/or the lack of estrogens. In this regard, the use of female senescence-accelerated mouse (SAM) model to determine the progressive effects of aging into the female vasculature is supported by previous studies

(Novella et al., 2010; Novensa et al., 2011). In fact, we previously demonstrated a sharper aging-associated decline in endothelium-dependent relaxation and an increase of vasoconstrictor responses in aorta from female SAMP8 (Novella et al., 2013a,b), and have established ovariectomized SAMP8 as a suitable experimental model of menopause, as addresses both aging and lack of estrogens (Novella et al., 2010; Novensa et al., 2011).

Analysis of plasma glucose and creatinine level, demonstrated that there were no differences between SAMR1 and SAMP8 mice, which discards a possible contribution of age-induced metabolic changes or impaired renal or hepatic function to vasomotor dysfunction. Furthermore, measurements of 17β -estradiol plasma levels did not differ between Sham-operated SAMR1 and SAMP8 animals. As expected, ovariectomy reduced significantly the 17β -estradiol plasma levels and the administration of 17β -estradiol with the osmotic pumps reached similar levels than Sham-operated group.

Aging induces a time-dependent decrease of NO in response to U46619 in aorta from SAM mice (Novella et al., 2013a). Nevertheless, estrogen withdrawn suppresses the involvement of NO on vasoconstriction in young and senescent mice. The decreased NO bioavailability in response to TXA₂ was restored by the administration of estradiol indicating an appropriate mechanism of hormonal therapy to restore vascular function in both young and senescent mice. These findings are consistent with previous observations of estradiol-related increase in NO bioavailability. However, the estrogen replacement does not fully restore NO bioavailability in SAMP8 to SAMR1 levels. The reasons for this are unclear but may be related to the age-associated phenotypic changes in the vascular wall that diminish signaling or responsiveness to estrogens (Sherwood et al., 2007).

Besides NO, vasoconstrictor prostaglandins have also been implicated in the pathophysiology of vascular dysfunction during aging (Briones et al., 2005; Matz et al., 2000; Vanhoutte, 2009) and estrogen withdrawn (Dantas et al., 1999, 2004). The role of vasoconstrictor prostanoids on TXA₂ response was previously reported in SAM mice (Novella et al., 2013a). Our previous studies show a release of dilating prostanoids to modulate the contractile effects of TXA₂ in aortas from 3 months old SAMR1 and SAMP8. However, this modulation disappeared with aging and the prostanoid profile shifted towards contractile prostanoids in 6 months old mice, suggesting aging-dependent changes of COX in the regulation of TXA₂ contraction (Novella et al., 2013a). In the present study, these contractile prostanoids are evident in the aorta of SAMR1 and SAMP8 mice as the contraction to TXA₂ decreases in presence of indomethacin. It is noteworthy that this effect is exacerbated in ovariectomized SAMP8 mice.

However, not only contractile prostanoids participate in the modulation of TXA₂ contraction. A mutual regulation between NO and COX-derived products has been demonstrated in different vascular beds (Cuzzocrea and Salvemini, 2007; Mollace et al., 2005). One interesting finding of the present study is that in ovariectomized mice, COX inhibition by indomethacin restores the potentiating effect of L-NAME on TXA₂ induced contraction. Taken together these findings suggest that in ovariectomized mice, COX activity decreases NO bioavailability by producing COX-derived products which can, at least partially, inactivate NO. Therefore, in ovariectomized SAMR1 and SAMP8, the increase in TXA₂ contraction not only participates contractile prostanoids, but also a decreased NO bioavailability.

TXA₂ has been shown to reduce NOS activity in endothelial cells through a receptor-mediated mechanism (Ashton and Ware, 2004; Liu et al., 2009). On the other hand, COX is also involved in the endothelial generation of reactive oxygen species, a key factor in the generation of endothelium-dependent contractions (Tang et al., 2007; Yang et al., 2002) and decrease of NO bioavailability (Rubanyi and Vanhoutte, 1986).

Thus, TP receptor activation could modulate NO bioavailability through the activation of COX and production of superoxide. Our results demonstrate a significant beneficial effect of indomethacin on aging and estrogen deprivation suggesting that in aorta of SAM mice the COX-derived superoxide induced by TP receptor stimulation was involved in the reduced NO bioavailability. In concordance with this, previous studies demonstrating that in human disease, indomethacin restores endothelium-dependent NO-mediated vasodilation in the forearm vasculature of patients with essential hypertension (Taddei et al., 1997a).

Estrogen has direct antioxidant effects *in vitro* and *in vivo* and is thought to play an inhibitory role in either the production and/or scavenging of ROS (Hermenegildo et al., 2002a,b; Sudoh et al., 2001). In ovariectomized animals, estrogen treatment protects NO from its scavenging by ROS (Keaney et al., 1994; Sudoh et al., 2001). Our data reveal that TP receptor stimulation induces production of superoxide in aortic rings, which is increased by aging and further increased by estrogen deprivation. COX inhibition was able to block, at least in part, superoxide production, therefore the COX-derived superoxide production could contribute to the decreased NO bioavailability induced by aging

and aggravated by estrogen withdrawn. Several evidences indicate that oxidative stress contributes to endothelial dysfunction in estrogen-deficient postmenopausal women (Moreau et al., 2013; Virdis et al., 2000). This raises the possibility that pharmacological inhibition of the TP receptor may serve as a target for treatment in vascular disease (Belhassen et al., 2003; Zuccollo et al., 2005). Therefore, the present results could be of clinical significance since we obtain a better understanding of the mechanisms underlying age-related shift to vasoconstrictor phenotype in middle-aged and ovariectomized female mice.

5. Conclusions

In summary, our results indicate that in response to TP receptor activation, NO is reduced by aging and is totally dependent of the estrogen. The contraction to TXA₂ is mediated partially by COX activation and the role of COX is increased by aging and ovariectomy. In the absence of estrogen, COX inhibition induces an increase of NO, evidenced by increased contractions to TXA₂ in presence of L-NAME. Therefore, the activation of TP receptors is responsible for the COX activation and superoxide generation decreasing NO bioavailability. This reinforces the rationale to use therapies targeted to inhibit the COX in order to increase NO bioavailability in aging and estrogens deficiency.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III – FEDER-ERDF (grants FIS P13/00617, P13/00091 and Red Cardiovascular RD12/0042/0052 and RD12/0042/0006) and COST action BM1402.

References

- Ashton, A.W., Ware, J.A., 2004. Thromboxane A₂ receptor signaling inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation and migration. *Circ. Res.* 95, 372–379.
- Belhassen, L., Pelle, G., Dubois-Randé, J.L., Adnot, S., 2003. Improved endothelial function by the thromboxane A₂ receptor antagonist S 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 1198–1204.
- Bittner, V., 2009. Postmenopausal hormone therapy and the risk of cardiovascular disease. *Expert. Opin. Pharmacother.* 10, 2041–2053.
- Briones, A.M., Montoya, N., Giraldo, J., Vila, E., 2005. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton. Autocoid Pharmacol.* 25, 155–162.
- Cano, A., Hermenegildo, C., Oviedo, P., Tarin, J.J., 2007. The risk for cardiovascular disease in women: from estrogens to selective estrogen receptor modulators. *Front. Biosci.* 12, 49–68.
- Cuzzocrea, S., Salvemini, D., 2007. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. *Kidney Int.* 71, 290–297.
- Dantas, A.P., Sandberg, K., 2006. Does 2-methoxyestradiol represent the new and improved hormone replacement therapy for atherosclerosis? *Circ. Res.* 99, 234–237.
- Dantas, A.P., Scivoletto, R., Fortes, Z.B., Nigro, D., Carvalho, M.H., 1999. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34, 914–919.
- Dantas, A.P., Franco, M.C., Tostes, R.C., Fortes, Z.B., Costa, S.G., Nigro, D., Carvalho, M.H., 2004. Relative contribution of estrogen withdrawal and gonadotropins increase secondary to ovariectomy on prostaglandin generation in mesenteric microvessels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 43, 48–55.
- Davidge, S.T., Zhang, Y., 1998. Estrogen replacement suppresses a prostaglandin H synthase-dependent vasoconstrictor in rat mesenteric arteries. *Circ. Res.* 83, 388–395.
- Davidge, S.T., Baker, P.N., Laughlin, M.K., Roberts, J.M., 1995. Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. *Circ. Res.* 77, 274–283.
- Davidge, S.T., Hubel, C.A., McLaughlin, M.K., 1996. Impairment of vascular function is associated with an age-related increase of lipid peroxidation in rats. *Am. J. Phys.* 271, R1625–R1631.
- Eskurza, I., Monahan, K.D., Robinson, J.A., Seals, D.R., 2004. Effect of acute and chronic ascorbic acid on flow-mediated dilatation with sedentary and physically active human ageing. *J. Physiol.* 556, 315–324.
- Feletou, M., Verbeuren, T.J., Vanhoutte, P.M., 2009. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br. J. Pharmacol.* 156, 563–574.

- Fulton, C.T., Stallone, J.N., 2002. Sexual dimorphism in prostanoid-potentiated vascular contraction: roles of endothelium and ovarian steroids. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H2062–H2073.
- Goodwin, D.C., Landino, L.M., Marnett, L.J., 1999. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J.* 13, 1121–1136.
- Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., McIntyre, M., Graham, D., Dominiczak, A.F., 2001. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 37, 529–534.
- Hernenegildo, C., Garcia-Martinez, M.C., Tarin, J.J., Cano, A., 2002a. Estradiol reduces $F_{2\alpha}$ -isoprostane production in cultured human endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H2644–H2649.
- Hernenegildo, C., Garcia-Martinez, M.C., Tarin, J.J., Cano, A., 2002b. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by the pure antiestrogens ICI 182780 and EM-652 (SCH 57068). *Menopause* 9, 430–435.
- Hildreth, K.L., Kohrt, W.M., Moreau, K.L., 2014. Oxidative stress contributes to large elastic arterial stiffening across the stages of the menopausal transition. *Menopause* 21, 624–632.
- Keaney Jr., J.F., Shwaery, G.T., Xu, A., Nicolosi, R.J., Loscalzo, J., Foxall, T.L., Vita, J.A., 1994. 17 β -Estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation* 89, 2251–2259.
- Lakatta, E.G., Levy, D., 2003. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation* 107, 139–146.
- Li, M., Kuo, L., Stallone, J.N., 2008. Estrogen potentiates constrictor prostanoid function in female rat aorta by upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane pathway expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2444–H2455.
- Liu, C.Q., Leung, F.P., Wong, S.L., Wong, W.T., Lau, C.W., Lu, L., Yao, X., Yao, T., Huang, Y., 2009. Thromboxane prostanoid receptor activation impairs endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxations: the role of rho kinase. *Biochem. Pharmacol.* 78, 374–381.
- Matz, R.L., de Sotomayor, M.A., Schott, J.C., Andriantsitohaina, R., 2000. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br. J. Pharmacol.* 131, 303–311.
- Mendelsohn, M.E., 2009. Estrogen actions in the cardiovascular system. *Climacteric* 12 (Suppl. 1), 18–21.
- Miyamoto, A., Hashiguchi, Y., Ohi, T., Ishiguro, S., Nishio, A., 2007. Ibuprofen or ozagrel increases NO release and L-nitro arginine induces TXA₂ release from cultured porcine basilar arterial endothelial cells. *Vasc. Pharmacol.* 46, 85–90.
- Mollace, V., Muscoli, C., Masini, E., Cuzzocrea, S., Salvemini, D., 2005. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol. Rev.* 57, 217–252.
- Moreau, K.L., Hildreth, K.L., 2014. Vascular aging across the menopause transition in healthy women. *Adv. Vasc. Med.* 2014.
- Moreau, K.L., Stauffer, B.L., Kohrt, W.M., Seals, D.R., 2013. Essential role of estrogen for improvements in vascular endothelial function with endurance exercise in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 4507–4515.
- Novella, S., Dantas, A.P., Segarra, G., Novensa, L., Bueno, C., Heras, M., Hermenegildo, C., Medina, P., 2010. Gathering of aging and estrogen withdrawal in vascular dysfunction of senescent accelerated mice. *Exp. Gerontol.* 45, 868–874.
- Novella, S., Dantas, A.P., Segarra, G., Medina, P., Hermenegildo, C., 2012. Vascular aging in women: is estrogen the fountain of youth? *Front. Physiol.* 3, 165.
- Novella, S., Dantas, A.P., Segarra, G., Novensa, L., Heras, M., Hermenegildo, C., Medina, P., 2013a. Aging enhances contraction to thromboxane A₂ in aorta from female senescence-accelerated mice. *Age (Dordr.)* 35, 117–128.
- Novella, S., Dantas, A.P., Segarra, G., Vidal-Gómez, X., Mompeon, A., Garabito, M., Hermenegildo, C., Medina, P., 2013b. Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression. *Exp. Gerontol.* 48, 1329–1337.
- Novensa, L., Novella, S., Medina, P., Segarra, G., Castillo, N., Heras, M., Hermenegildo, C., Dantas, A.P., 2011. Aging negatively affects estrogen-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER α /ER β balance in female mice. *PLoS ONE* 6, e25335.
- Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M., 1986. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 250, H822–H827.
- Sherwood, A., Bower, J.K., McFetridge-Durdle, J., Blumenthal, J.A., Newby, L.K., Hinderliter, A.L., 2007. Age moderates the short-term effects of transdermal 17 β -estradiol on endothelium-dependent vascular function in postmenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1782–1787.
- Sobrinho, A., Oviedo, P.J., Novella, S., Laguna-Fernandez, A., Bueno, C., Garcia-Perez, M.A., Tarin, J.J., Cano, A., Hermenegildo, C., 2010. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- α . *J. Mol. Endocrinol.* 44, 237–246.
- Sudoh, N., Toba, K., Akishita, M., Ako, J., Hashimoto, M., Iijima, K., Kim, S., Liang, Y.Q., Ohike, Y., Watanabe, T., Yamazaki, I., Yoshizumi, M., Eto, M., Ouchi, Y., 2001. Estrogen prevents oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Circulation* 103, 724–729.
- Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Magagna, A., Salvetti, A., 1997a. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension* 29, 274–279.
- Taddei, S., Virdis, A., Mattei, P., Ghiadoni, L., Fasolo, C.B., Sudano, I., Salvetti, A., 1997b. Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension* 29, 736–743.
- Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Salvetti, G., Bernini, G., Magagna, A., Salvetti, A., 2001. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension* 38, 274–279.
- Tang, E.H., Vanhoutte, P.M., 2008. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol. Genomics* 32, 409–418.
- Tang, E.H., Leung, F.P., Huang, Y., Feletou, M., So, K.F., Man, R.Y., Vanhoutte, P.M., 2007. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. *Br. J. Pharmacol.* 151, 15–23.
- Vanhoutte, P.M., 2009. COX-1 and vascular disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 86, 212–215.
- Virdis, A., Ghiadoni, L., Pinto, S., Lombardo, M., Petraglia, F., Gennazzani, A., Buralli, S., Taddei, S., Salvetti, A., 2000. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation* 101, 2258–2263.
- Yang, D., Feletou, M., Boulanger, C.M., Wu, H.F., Levens, N., Zhang, J.N., Vanhoutte, P.M., 2002. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 136, 104–110.
- Zuccollo, A., Shi, C., Mastroianni, R., Maitland-Toolan, K.A., Weisbrod, R.M., Zang, M., Xu, S., Jiang, B., Oliver-Krasinski, J.M., Cayatte, A.J., Corda, S., Lavielle, G., Verbeuren, T.J., Cohen, R.A., 2005. The thromboxane A₂ receptor antagonist S18886 prevents enhanced atherogenesis caused by diabetes mellitus. *Circulation* 112, 3001–3008.