



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGIA

**Interacciones de la ranolazina con agentes
vasoactivos endógenos y exógenos**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Elena Campos Carot

Dirigida por:

Dr. José María Vila Salinas

Dra. María Dolores Mauricio Aviñó

Dr. Juan Bautista Martínez León

Valencia, octubre 2022

D. José María Vila Salinas, Catedrático de Fisiología de la Universitat de València, **Dña. María Dolores Mauricio Aviñó**, profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Universitat de València y **D. Juan Bautista Martínez León**, Catedrático de Cirugía Cardiovascular de la Universitat de València,

CERTIFICAN: Que **Elena Campos Carot** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado «**Interacciones de la ranolazina con agentes vasoactivos endógenos y exógenos**» para optar al Grado de Doctora.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia a 25 de octubre de 2022.

Fdo:



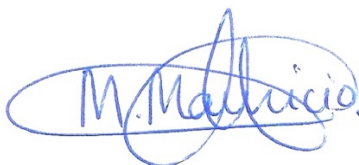
José Mª Vila Salinas

Fdo:



Juan B. Martínez León

Fdo:



Mª Dolores Mauricio Aviñó

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la inestimable ayuda de muchas personas a las que me gustaría dar las gracias:

En primer lugar, agradecer al Dr. José María Vila, codirector de esta tesis, por acogerme como una más en su equipo y dejarme acceder a su laboratorio. Sin su supervisión y sus conocimientos esta tesis no hubiera salido adelante. Gracias por darme ese “empujón” cuando más lo necesitaba.

A la Dra. María Dolores Mauricio, codirectora de esta tesis, por introducirme en la investigación, guiarme en el proceso y responder a todas mis dudas. Gracias por tu amabilidad y paciencia.

Al Prof. Juan Martínez León, codirector de esta tesis, profesor, jefe y mentor, por ser la primera persona que me dio la oportunidad de descubrir la Cirugía Cardiovascular.

A las Dras. Patricia Marchio y Solanye Guerra, por el valioso trabajo realizado en el laboratorio, por los conocimientos brindados y por haberme recibido y ayudado siempre que he acudido a ellas.

A todo el equipo de Cirugía Cardiovascular por participar desinteresadamente en la recogida de las muestras.

Al Dr. Gil y al Dr. Sirgo por aguantarme todos estos años. Y a la Dra. Rueda por animarme y acompañarme en la realización de la tesis.

A Rosario Salvador, coordinadora del Programa de Doctorado en Fisiología, y a Mari Blanch, secretaria del Departamento, por su eficiencia y su gran ayuda en la resolución de todos los trámites administrativos.

No quisiera finalizar este apartado sin dar las gracias a mi familia y amigos, por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	17
1. Enfermedades cardiovasculares	3
2. Cardiopatía isquémica	3
2.1. Tratamiento médico e intervencionismo coronario.....	5
2.1.1. Papel del tratamiento médico	5
3. Cirugía coronaria.....	6
4. Enfermedad del injerto de vena safena	9
4.1. Trombosis.....	10
4.2. Hiperplasia intimal	11
4.3. Aterosclerosis	12
4.4. Manejo perioperatorio. Empleo de fármacos vasoactivos.	13
4.5. Prevención.....	14
5. El endotelio y la regulación del tono vascular	15
5.1. Factores vasodilatadores derivados del endotelio	17
5.1.1. Óxido nítrico	17
5.1.2. Prostanoides	21
5.1.3. Hiperpolarización derivada del endotelio	24
5.2. Canales de potasio.....	27
5.2.1. Canales de potasio activados por calcio (KCa).....	28
5.2.2. Canales de potasio rectificadores anómalos (Kir).....	30
5.2.3. Canales de potasio dependientes de voltaje (Kv).....	31
5.2.4. Canales de potasio con dominio de dos poros (K2P)..	31
5.3. Factores vasoconstrictores derivados del endotelio	32
5.3.1. Tromboxano A ₂	32
5.3.2. Endotelina-1	33

5.3.3. Influencia del sistema simpático	34
6. Ranolazina	37
6.1. Farmacocinética	37
6.2. Farmacodinamia	39
6.3. Papel en la cardiopatía isquémica	42
6.4. Papel en la insuficiencia cardíaca.....	45
6.5. Angina microvascular	46
6.6. Arritmias.....	46
6.7. Diabetes	49
6.8. Efectos vasculares	51
6.9. Otros efectos.....	53
HIPÓTESIS	55
OBJETIVOS.....	59
MATERIAL Y MÉTODOS	63
1. Declaración ética	65
2. Pacientes.....	65
3. Obtención de las muestras.....	66
4. Estudio de la reactividad vascular	67
4.1 Preparación de las muestras en el baño de órganos	67
4.2 Determinación de la tensión basal óptima.....	69
4.3 Curvas concentración-respuesta.....	69
4.3.1 Curvas de ranolazina	70
4.3.1.1 Agonistas contráctiles	70
4.3.1.2 L-NAME e indometacina	70
4.3.1.3 Inhibidores de KCa.....	71
4.3.1.4 Verapamilo	71
4.3.2 Curvas de fenilefrina	72

4.3.2.1	L-NAME e indometacina	72
4.3.2.2	Inhibidores de KCa.....	72
4.4	Curvas frecuencia-respuesta.....	73
5.	Fármacos y soluciones	74
6.	Determinación de la expresión proteica por Western Blot	74
7.	Análisis estadístico	76
RESULTADOS	79
1.	Efectos de la ranolazina sobre la respuesta relajante	81
1.1.	En presencia de agonistas contráctiles	81
1.2	En presencia de indometacina y L-NAME	82
1.3	En presencia de inhibidores de los KCa.....	83
1.4	En presencia de verapamilo.....	85
2	Efectos de la ranolazina sobre las respuestas inducidas por fenilefrina	86
3	Efectos de la ranolazina sobre las respuestas inducidas por estimulación eléctrica.....	89
4	Efectos de la ranolazina sobre expresión proteica de la eNOS, el receptor adrenérgico $\alpha 1$ y la proteína del canal BKCa.....	91
DISCUSIÓN	93
1.	Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental	95
2.	Justificación de la elección del vaso a estudio	96
3.	Efectos de la ranolazina sobre la respuesta vascular de la vena safena humana	98
4.	Efectos de la ranolazina sobre la respuesta adrenérgica.....	100
5.	Participación de factores endoteliales en la respuesta a la ranolazina	102
6.	Participación de los canales KCa en la respuesta a la ranolazina	104

7. Participación de canales ICaL en la respuesta a la ranolazina	106
8. Consideraciones finales.....	107
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA.....	117

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

ADMA	N ^G ,N ^G -dimetil-L-arginina
AMI	Arteria mamaria interna
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARA-II	Antagonistas de los receptores de angiotensina II
COX	Ciclooxigenasa
DE	Desviación estándar
DTM	Dominios transmembrana
ECG	Electrocardiograma
EDH	Hiperpolarización derivada del endotelio
ET-1	Endotelina-1
EEM	Error estándar de la media
FA	Fibrilación auricular
GCs	Guanilato ciclasa soluble
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
IAMCEST	Infarto agudo de miocardio con elevación del ST
IAMSEST	Infarto agudo de miocardio sin elevación del ST
ICaL	Canales de calcio dependientes de voltaje tipo L
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
I _{Kr}	Corriente rectificadora de potasio
I _{NaL}	Corriente tardía de entrada de sodio
K2P	Canales de potasio con dominio de dos poros
KATP	Canales de potasio sensibles a ATP
KCa	Canales de potasio activados por calcio
K _{ir}	Canales de potasio rectificadores anómalos o internos
K _v o K _{dr}	Canales de potasio voltaje-dependientes
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
NA	Noradrenalina
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa

PGI ₂	Prostaciclina
SNC	Sistema nervioso central
TEA	Tetraetilamonio
TRAM 34	Triarilmetano 34
TXA ₂	Tromboxano-A ₂

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estrategia gradual para el tratamiento anti-isquémico según el perfil del paciente.	6
Tabla 2. Tabla comparativa entre los principales ensayos realizados con ranolazina en pacientes con cardiopatía isquémica.	43
Tabla 3. Características demográficas, factores de riesgo cardiovascular y tratamientos activos de los sujetos a estudio.....	65
Tabla 4. Valores de pD_2 y E_{max} para ranolazina en segmentos de vena safena precontraídos con fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M).	83
Tabla 5. Valores de pD_2 y E_{max} para ranolazina en segmentos de vena safena precontraídos con fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M).	84
Tabla 6. Valores de pD_2 y E_{max} para ranolazina en segmentos de vena safena precontraídos con fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M).	86
Tabla 7. Valores de pD_2 y E_{max} para fenilefrina en segmentos de vena safena humana en condiciones control y experimentales.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Permeabilidad del injerto a largo plazo y supervivencia libre de complicaciones tras cirugía de revascularización coronaria con injerto de vena safena interna.....	8
Figura 2. Aspecto angiográfico y ecográfico intravascular de trombo laminado en un injerto de vena safena interna implantado recientemente.	11
Figura 3. Fisiopatología del fracaso temprano y tardío del injerto de vena safena interna.	13
Figura 4. Principales mediadores vasoactivos liberados por el endotelio.	17

Figura 5. Síntesis de óxido nítrico.....	18
Figura 6. Síntesis de prostanooides.....	22
Figura 7. Mecanismos de hiperpolarización del músculo liso vascular.	25
Figura 8. Familias de canales de potasio.....	28
Figura 9. Corriente tardía de sodio fisiológica normal en comparación con una corriente tardía patológicamente elevada.	41
Figura 10. Representación de la inhibición del canal de sodio dependiente de voltaje en los miocitos vasculares y en las terminaciones nerviosas simpáticas perivasculares; y la antagonización del receptor adrenérgico $\alpha 1$ por la ranolazina.	53
Figura 11. Extracción quirúrgica abierta de la vena safena interna. .	66
Figura 12. Esquema del baño de órganos y el procedimiento experimental.	68
Figura 13. Curvas concentración-respuesta de ranolazina en segmentos venosos precontraídos con diferentes agonistas contráctiles.	81
Figura 14. Curvas concentración-respuesta de ranolazina en segmentos venosos con, sin endotelio y en presencia de L-NAME (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M).	82
Figura 15. Curvas concentración-respuesta de ranolazina en segmentos venosos en condiciones de control (indometacina 10^{-5} M más L-NAME 10^{-4} M) y en presencia de TEA (10^{-3} M), apamina (10^{-6} M), caribdotoxina (10^{-7} M) y TRAM-34 (10^{-6} M).	84
Figura 16. Curvas concentración-respuesta de ranolazina en segmentos venosos en presencia de verapamilo.	85
Figura 17. Curvas concentración-respuesta de fenilefrina en ausencia (control) y presencia diferentes concentraciones de ranolazina (10^{-6} - 10^{-4} M).	86

Figura 18. Curvas concentración-respuesta de fenilefrina en presencia de ranolazina (10^{-5} M) sola y asociada a indometacina (10^{-5} M) o L-NAME (10^{-4} M).....	87
Figura 19. Curvas concentración-respuesta de fenilefrina en presencia de ranolazina (10^{-5} M) y ranolazina (10^{-5} M) en combinación con Apamina (10^{-6} M), TRAM-34 (10^{-6} M), TEA (10^{-3} M) y caribdotoxina (10^{-7} M).	88
Figura 20. Respuesta contráctil a la estimulación del campo eléctrico a 2 y a 4 Hz en condiciones de control y en presencia de ranolazina (10^{-6} - 10^{-5} M).....	90
Figura 21. Respuesta contráctil a la estimulación del campo eléctrico (2 Hz) en condiciones de control y en presencia de indometacina (10^{-5} M) y L-NAME (10^{-4} M) solos y en combinación con ranolazina (10^{-5} M).....	90
Figura 22. Respuesta contráctil a la estimulación del campo eléctrico (2 Hz) en condiciones de control y en presencia de diferentes inhibidores [caribdotoxina (10^{-7} M), TRAM-34 (10^{-6} M) y apamina (10^{-6} M)] solos o asociados a ranolazina (10^{-5} M).....	91
Figura 23. Efecto de la ranolazina (10^{-5} M) sobre la expresión proteica de la eNOS, el canal BKCa y el receptor adrenérgico $\alpha 1$	92

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares continúan siendo a día de hoy la principal causa de muerte en adultos de mediana edad en todo el mundo ente debido a su reproducibilidad y facilidad (1). Este conjunto de patologías ejerce un gran impacto en la calidad de vida de los individuos que las padecen privándolos de salud en sus años más productivos. Su atención clínica es costosa y prolongada, lo que consume gran parte de los recursos familiares y sociales de un país.

El término “enfermedades cardiovasculares” engloba a un gran grupo de patologías que afectan al corazón y los vasos sanguíneos, entre las que se incluyen la cardiopatía isquémica, las enfermedades cerebrovasculares, la arteriopatía periférica, las cardiopatías reumáticas y congénitas, la trombosis venosa profunda y el tromboembolismo pulmonar. Dentro de este grupo, la cardiopatía isquémica es la más prevalente y la primera causa de muerte prematura (2).

En los países desarrollados, el envejecimiento progresivo de la población, la inmigración y el descenso progresivo en la mortalidad hacen suponer que la prevalencia de cardiopatía isquémica aumentará próximamente (3). No obstante, en los últimos años se ha observado una tendencia descendente en la mortalidad cardiovascular como resultado de la prevención primaria, las intervenciones terapéuticas en fase aguda y la prevención secundaria (4,5).

2. Cardiopatía isquémica

La Sociedad Europea de Cardiología describe la enfermedad de las arterias coronarias como una patología que se caracteriza por la

formación y acumulación de placas de ateroma en estos vasos, pudiendo condicionar o no una obstrucción que, a su vez, puede ser o no significativa clínicamente (6). Se trata de una patología crónica que generalmente presenta períodos prolongados de estabilidad pero que es progresiva. Es decir, implica riesgo incluso cuando su clínica es aparentemente silente, ya que puede inestabilizarse de forma repentina debido a eventos aterotrombóticos agudos que suelen estar ocasionados por la ruptura de una placa preexistente. Esto hace que dentro del espectro de la patología isquémica coronaria podamos diferenciar distintos síndromes (6). Por un lado, los síndromes coronarios crónicos, en los que placas estables generan una obstrucción de la luz vascular suficiente como para que, en determinadas condiciones como el esfuerzo, se produzca esa incapacidad para suplir el contenido necesario de oxígeno al músculo cardíaco. Por otro lado, los síndromes coronarios agudos, en los que la rotura o inestabilización de una placa lleva al riesgo de oclusión o a la oclusión completa, parcial o temporal de la luz vascular (7).

Los síndromes coronarios crónicos incluyen: la angina estable, la angina microvascular, la miocardiopatía isquémica y la angina vasoespástica. La primera, que es la forma más frecuente, se presenta como una angina típica de esfuerzo, con dolor torácico opresivo que cede con el reposo o los nitrovasodilatadores.

Los síndromes coronarios agudos incluyen: la angina inestable, el infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) y el infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST (IAMSEST). La diferenciación entre estos tres síndromes

se basa en el grado de oclusión de la luz vascular tras la rotura de una placa de ateroma que se traduce en manifestaciones electrocardiográficas, variación en las enzimas de daño miocárdico y diferentes hallazgos en la angiografía coronaria.

2.1. Tratamiento médico e intervencionismo coronario

De 2018 a 2020 la Sociedad Europea de Cardiología actualizó sus recomendaciones sobre el tratamiento de los diferentes síndromes coronarios. La estrategia de reperfusión inmediata está indicada en los pacientes con IAMCEST excepto si se considera que se trata de un infarto muy evolucionado y el territorio a revascularizar no es viable. En el IAMSEST el estado clínico y una serie de factores de riesgo marcan el tiempo a la estrategia invasiva que oscila entre la inmediatez y las 72 horas. Según los hallazgos se puede optar por tratamiento médico o bien por la revascularización. La forma de revascularización se decide según toda una serie de factores tanto clínicos como pronósticos, así como entre las distintas estrategias de revascularización cuando se opta por esta opción; cirugía o tratamiento percutáneo dependiendo del riesgo quirúrgico y los hallazgos de la coronariografía.

2.1.1. Papel del tratamiento médico

Todos los pacientes con cardiopatía isquémica deben realizar un control estricto de los factores de riesgo cardiovascular y recibir tratamiento con antiagregantes plaquetarios, estatinas y otros fármacos dependiendo de su perfil de riesgo (antialdosterónicos, inhibidores de

la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA-II) o inhibidores de la neprilisina). Los pacientes en los que se opta por tratamiento médico o que persisten con clínica anginosa pese a la revascularización reciben tratamiento con fármacos antisquémicos que incluyen: betabloqueantes, antagonistas del calcio, nitratos, ivabradina, nicorandil, trimetazidina y ranolazina. Los algoritmos de la Sociedad Europea de Cardiología proporcionan un esquema terapéutico conforme a la evidencia de cada fármaco y las características de cada paciente (Tabla 1).

Tabla 1. Estrategia gradual para el tratamiento antisquémico según el perfil del paciente.

	Tratamiento estándar	Frecuencia cardíaca elevada	Frecuencia cardíaca baja (< 50 lpm)	IC o disfunción sistólica del VI	Hipotensión arterial
Escalón 1	BB o AC	BB o AC no DHP	AC DHP	BB	Dosis bajas de BB o AC no DHP
Escalón 2	BB y AC DHP	BB y AC no DHP	NAP	NAP o ivabradina	Dosis bajas de NAP
Escalón 3	Fármaco de 2ª línea	Ivabradina	AC DHP y NAP	Fármaco de 2ª línea	Ivabradina, RZ , trimetazidina
Escalón 4			Nicorandil, RZ , trimetazidina		

Lpm: latidos por minuto; **IC:** insuficiencia cardíaca; **VI:** ventrículo izquierdo; **BB:** bloqueantes beta adrenérgicos; **AC:** antagonistas de los canales de calcio; **DHP:** antagonistas de los canales de calcio dihidropiridínicos; **NAP:** nitratos de acción prolongada; **RZ:** ranolazina.

3. Cirugía coronaria

Los primeros intentos de revascularización miocárdica iban enfocados a lograr la creación de neovasos que mejoraran la perfusión

del corazón. Se pensó que creando adherencias con estructuras vecinas como el músculo pectoral mayor, el epiplón o los pulmones se lograría aumentar la circulación de la zona tratada. En 1965 P.K. Sen desarrolló una técnica que denominó “acupuntura transmiocárdica” que consistía en realizar múltiples punciones en la pared ventricular con el fin de aumentar la vasculogénesis (8). Esta técnica sirvió de base para la posterior técnica de revascularización con láser, desarrollada por O. Frazier y D. Cooley. En 1958 W. P. Longmire comenzó a realizar endarterectomías coronarias asociadas a plastias de ampliación con parche (9).

La cirugía de revascularización miocárdica, tal y como la conocemos en la actualidad, es relativamente reciente. Las primeras referencias datan de principios de los años 60, tras el desarrollo de la circulación extracorpórea por Gibbon en 1954 y la angiografía coronaria por Sones en 1957 (10). Esta época constituye el inicio de la era moderna del tratamiento electivo de la enfermedad coronaria mediante revascularización directa. Parece ser que el primero en realizar con éxito una derivación de arteria mamaria interna (AMI) sobre la arteria coronaria derecha fue R. Goetz en 1961 (11). Por todo el mundo, pioneros de la cirugía cardíaca como Favaloro, Garrett y Effler comenzaron a desarrollar técnicas de derivación vascular. En 1968, R. Favaloro publicó la primera gran serie de pacientes coronarios tratados con éxito mediante bypass aorto-coronario empleando como injerto la vena safena interna de ejecución (12). Los resultados obtenidos inicialmente fueron muy satisfactorios. No obstante, con el paso del tiempo el deterioro de los injertos venosos se hizo evidente y,

a los 10 años, sólo un 60% de ellos seguían siendo permeables, y de los injertos permeables sólo el 50% estaba libre de estenosis significativa (Figura 1) (13).

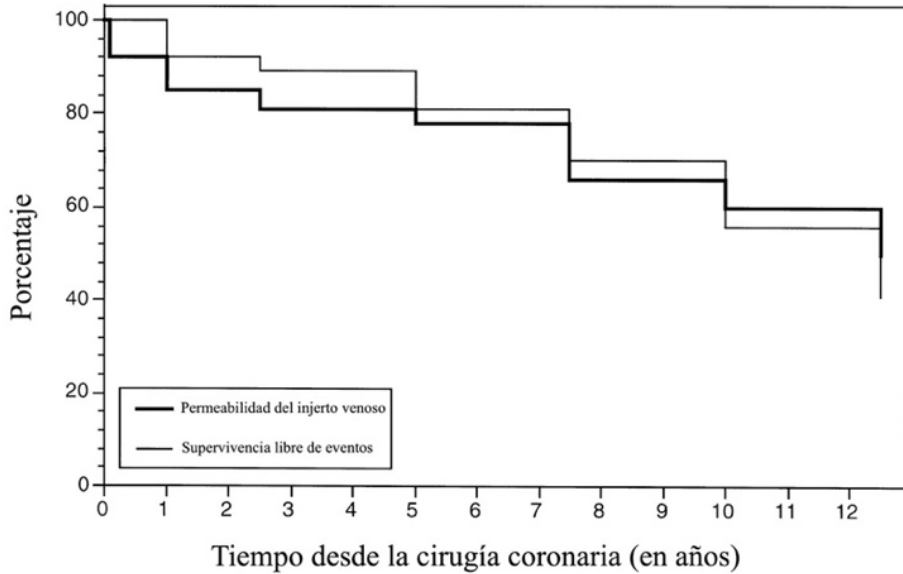


Figura 1. Permeabilidad del injerto a largo plazo y supervivencia libre de complicaciones tras cirugía de revascularización coronaria con injerto de vena safena interna. Adaptado de (13).

Esto condujo a que se produjera un viraje hacia el uso de injertos arteriales como la AMI izquierda, la AMI derecha, la arteria radial, la gastroepiploica y la epigástrica. Se describieron diversas técnicas realizando derivaciones “en Y”, anastomosis secuenciales, extensiones, etc. De todas las variaciones estudiadas, la que ha demostrado mejores resultados con el paso del tiempo es el uso de las dos arterias mamarias, que ha evidenciado en múltiples estudios una mejora en la supervivencia a largo plazo reduciendo la mortalidad hospitalaria y la

tasa de re-intervenciones, especialmente en pacientes diabéticos, con esperanza de vida mayor de 10 años o múltiples factores de riesgo cardiovascular (14–17). Sin embargo, a pesar de toda la evidencia acumulada, la vena safena continúa siendo el injerto más empleado en el mundo debido a su facilidad de disección, su longitud y su gran versatilidad de uso, ya que la fisiología venosa hace que presente una menor tendencia al espasmo y sea menos susceptible al flujo competitivo (18).

4. Enfermedad del injerto de vena safena

La degeneración acelerada que sufrían los injertos venosos se denominó “enfermedad del injerto de vena safena” y se convirtió en objeto de estudio de múltiples ensayos prospectivos randomizados. Uno de los más representativos fue el realizado por Fitz-Gibbon y sus colaboradores (19) en el que se evaluaron angiográficamente 5284 injertos coronarios de pacientes varones en edad media que habían sido sometidos a uno o varios procedimientos sucesivos de revascularización durante el período de 25 años que duró el estudio (1969 a 1994). Un 91% de los injertos fueron venosos, un 9% arteriales, y se analizaron y clasificaron sucesivamente según la enfermedad y la permeabilidad observada. En los injertos venosos la permeabilidad fue disminuyendo de forma constante del 88% al mes, al 81% al año, 75% a los 5 años y 50% a partir de los 15 años siendo la tasa de oclusión de 2,1% al año. Al analizar la patología de los injertos durante el primer año se observaron irregularidades que Fitz-Gibbon et al. atribuyeron a aterosclerosis. Otros autores que realizaron estudios similares no

encontraron evidencia histológica de aterosclerosis durante el primer año pero sí signos de hiperplasia intimal localizada (20).

Hoy se sabe que la patogénesis de la enfermedad del injerto de vena safena interna está compuesta por tres procesos que, aunque presentan una secuencia temporal distinta, están interrelacionados fisiopatológicamente: la trombosis, la hiperplasia intimal y la aterosclerosis.

4.1. Trombosis

La trombosis suele acontecer durante el primer mes tras la intervención como resultado de una combinación de alteraciones: la lesión endotelial, la hipercoagulabilidad y el estasis sanguíneo (21) (Figura 2). Estas alteraciones comienzan a producirse durante la preparación quirúrgica del injerto ya que, incluso cuando éste es extraído con especial cuidado, sufre manipulaciones que producen lesiones focales en el endotelio (13,22–25). La pérdida de células endoteliales y daño en la capa media conduce a la activación plaquetaria, al depósito de fibrina, al aumento de factores protrombóticos y a la reducción de factores anticoagulantes (Figura 3) (13).

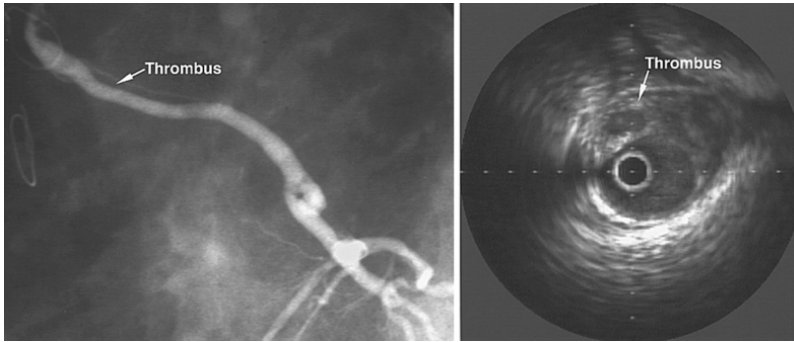


Figura 2. Aspecto angiográfico y ecográfico intravascular de trombo laminado en un injerto de vena safena interna implantado recientemente. Tomado de (13).

En cuanto a los mecanismos vasomotores, la producción de NO y prostaciclina, ambos inhibidores de la activación plaquetaria, es menor de base en las venas que en las arterias y todavía se encuentra más disminuida en los conductos injertados debido al daño endotelial que sufren al ser implantados en la circulación arterial donde incrementan su diámetro, turbulencia y *shear stress* (fuerza de rozamiento vascular) (26,27). Adicionalmente, cabe mencionar que los vasos venosos son altamente sensibles a las sustancias vasoconstrictoras circulantes, especialmente la endotelina-1 (ET-1) (28).

4.2. Hiperplasia intimal

La hiperplasia intimal es el proceso patológico predominante entre el primer mes y el primer año tras la intervención (25). Consiste en el acúmulo de células musculares lisas y matriz extracelular en la capa íntima de las venas en respuesta a la liberación de factores de crecimiento y citoquinas (Figura 3). Este proceso ocurre de forma más

acentuada en las venas sometidas a presión arterial y, si bien no produce estenosis significativa por sí mismo, sirve de base para el posterior desarrollo de placas de ateroma (13,22,29).

Por otro lado, la isquemia transitoria que se produce en el injerto durante su extracción y la consecuente reperusión que se produce tras su implante disminuyen la producción de mediadores antiproliferativos endoteliales e inducen la formación de radicales superóxido que, a su vez, aumentan todavía más la proliferación de células musculares lisas (29–31).

4.3. Aterosclerosis

A partir del primer año postoperatorio el proceso que predomina es la aterosclerosis, que es rápidamente progresiva en comparación con la que ocurre en los vasos nativos (25) y que, histológicamente, presenta células inflamatorias y espumosas, lo que ha llevado a contemplar la posibilidad de que se trate de un proceso de aterosclerosis inmunomediada similar a la que tiene lugar en del rechazo crónico de un órgano trasplantado (32) (Figura 3). Morfológicamente, las placas de ateroma que se forman sobre los injertos venosos suelen ser concéntricas, difusas, poco calcificadas y muy friables. La consecuencia final del avance de la degeneración aterosclerótica es la trombosis tardía del injerto (13,24).



Figura 3. Fisiopatología del fracaso temprano y tardío del injerto de vena safena interna. Adaptado de (25). **NO:** óxido nítrico; **TXA₂:** tromboxano A₂; **FvW:** factor de von Willebrand; **PAI-1:** inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; **CMLv:** célula de músculo liso vascular.

4.4. Manejo perioperatorio. Empleo de fármacos vasoactivos.

La circulación extracorpórea produce una respuesta inflamatoria sistémica que se asocia a la liberación de distintos tipos de citocinas y la activación de la cascada de coagulación (30,33). Se ha visto que no sólo altera la producción local de factores que influyen en la hemostasia, sino que también modifica sus niveles circulantes, con una elevación perioperatoria particularmente marcada del fibrinógeno plasmático y de la trombina. Se ha visto que la respuesta predominante de la vena safena interna a la trombina es constrictora mientras que en la AMI el efecto predominante es de relajación (34). Asimismo, durante la circulación extracorpórea, se produce un aumento de la

concentración circulante de ET-1 (28) cuyo efecto vasoconstrictor atenúa el flujo a través de los injertos venoso promoviendo la estasis. Por otro lado, el flujo continuo y la hipotermia inducida durante la circulación extracorpórea contribuyen a disminuir la liberación basal de NO por el endotelio favoreciendo la vasoconstricción (31).

A todo lo anterior se suma el ambiente estresante que se genera durante el período perioperatorio. Es relativamente frecuente la aparición en mayor o menor grado de un síndrome de bajo gasto cardíaco cuyo manejo incluye el empleo de sustancias vasoactivas que ayuden a mantener una hemodinámica estable. Es común el uso de factores vasoconstrictores como las catecolaminas exógenas (adrenalina y noradrenalina [NA]), aminas simpaticomiméticas (efedrina) y agonistas α_1 (fenilefrina). Esta última actúa casi exclusivamente mediante la estimulación de los receptores alfa-1-adrenérgicos provocando una importante vasoconstricción arterial y también venosa. En compensación, también se emplean fármacos vasodilatadores como la nitroglicerina y el nitroprusiato sódico; e inotrópicos como la dobutamina y el levosimendán (35). Todo ello contribuye a generar un desequilibrio en el tono vascular que puede causar daño endotelial y reducir la permeabilidad de los injertos empleados.

4.5. Prevención

El fallo de los injertos venosos es el resultado de la suma de múltiples factores biológicos, técnicos y sistémicos. Son varias las estrategias de prevención que han demostrado ser eficaces para

prolongar la vida útil de los injertos. Algunas de ellas tienen aplicación durante la extracción e implante del injerto: el almacenamiento en soluciones con nitroglicerina, verapamilo o papaverina; la extracción endoscópica y la técnica *no touch*, evitando la disección agresiva y la distensión; la elección del vaso diana, etc. (36). Otras forman parte de lo que comúnmente denominamos prevención secundaria y consisten fundamentalmente en el uso de fármacos antiagregantes plaquetarios e hipolipemiantes (24,25). Otras estrategias como la colocación de prótesis externas (37) o la terapia génica todavía están en fase experimental (38).

Desafortunadamente, a pesar de los avances descritos, la “enfermedad del injerto de vena safena” continúa representando un desafío importante y no resuelto en la práctica clínica. De ahí, la importancia de conocer los mecanismos vasculares que regulan la homeostasis en la vena safena humana, con el fin de evitar la aterosclerosis, que es la causa más frecuente de fracaso del injerto.

5. El endotelio y la regulación del tono vascular

El endotelio es un órgano altamente especializado formado por una sola capa de células que tapiza la luz de todos los vasos sanguíneos incluido el endocardio. De igual modo, es metabólicamente muy activo y desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis vascular al ser capaz de liberar una serie de mediadores vasoactivos que no solo regulan el tono y la permeabilidad de los vasos, sino que también ejercen una acción paracrina sobre los hemoderivados circulantes y participan en la angiogénesis, la respuesta inmune e

inflamatoria. La disfunción endotelial se asocia a múltiples patologías y en muchas de ellas es considerada una parte fundamental de su etiopatogenia, especialmente de las enfermedades cardiovasculares (39).

Las células endoteliales son enormemente versátiles y multifuncionales. Existe una variación fenotípica entre los diferentes órganos e incluso dentro del mismo vaso sanguíneo pudiendo expresarse de forma diferente en lechos vasculares específicos y generar respuestas diversas ante un mismo estímulo (40). Actúan de barrera selectiva transportando moléculas circulantes hasta el espacio subendotelial (p.ej. los transportadores de glucosa tipo GLUT de la barrera hematoencefálica y de aminoácidos como la L-arginina) e intervienen en la regulación de numerosos procesos mediante la liberación de determinadas sustancias (41).

La regulación del tono vascular es, junto con la función de barrera y transporte, una de las funciones más importantes que realiza el endotelio. Es llevada a cabo mediante la liberación de mediadores vasoactivos capaces de modificar la función y estructura del músculo liso subyacente. Los factores vasoconstrictores derivados del endotelio incluyen a la ET-1, la prostaglandina H₂ (PGH₂), el TXA₂ y los aniones superóxido; mientras que los vasodilatadores están representados por la prostaciclina (PGI₂), el NO y la hiperpolarización derivada del endotelio (EDH) (42).

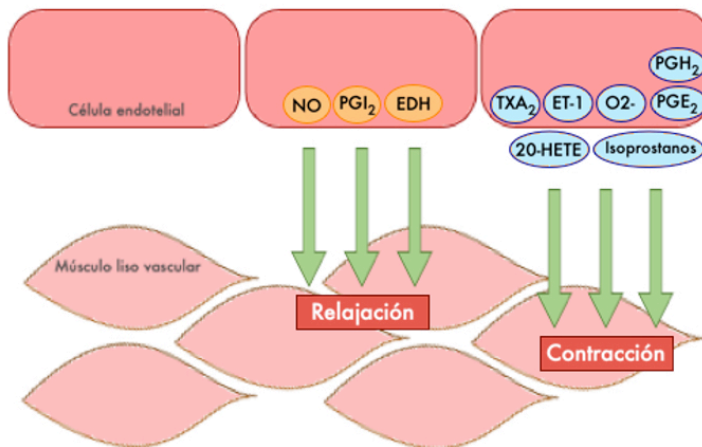


Figura 4. Principales mediadores vasoactivos liberados por el endotelio. **NO:** óxido nítrico; **PGI₂:** prostaciclina; **EDH:** hiperpolarización derivada del endotelio; **TXA₂:** tromboxano A₂; **ET-1:** endotelina-1; **O₂⁻:** anión superóxido; **PGH₂:** prostaglandina H₂; **PGE₂:** prostaglandina E₂.

5.1. Factores vasodilatadores derivados del endotelio

5.1.1. Óxido nítrico

El NO es posiblemente la sustancia vasoactiva más importante generada por las células endoteliales. Es sintetizado por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina que da lugar a L-citrulina y NO. Para que esta reacción pueda ser llevada a cabo es necesaria la presencia de cosustratos (oxígeno y nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato [NADPH]) y otros cofactores (tetrahidrobiopterina, flavin mono y dinucleótidos y zinc) (43) (Figura 5).

El NO, una vez sintetizado, difunde hacia las células musculares lisas y actúa estimulando la guanilato ciclasa soluble (GCs) que convierte el guanosín trifosfato en guanosín monofosfato cíclico. Éste,

a su vez, activa la proteína quinasa G que, por un lado, fosforila al receptor inositol trifosfato e inhibe la entrada de calcio en las células; y, por otro lado, provoca la ruptura de la unión actina-miosina dando como resultado la relajación del músculo liso (21) (Figura 5). Igualmente, difunde también hacia la luz de los vasos donde inhibe la agregación plaquetaria. En el lado luminal es metabolizado a metabolitos estables (nitratos y nitritos) que circulan por el torrente sanguíneo y finalmente son excretados vía renal. Su vida media es corta y, por tanto, los niveles plasmáticos de sus metabolitos nos proporcionan una información bastante aproximada sobre la actividad de la NOS *in vivo* (44).

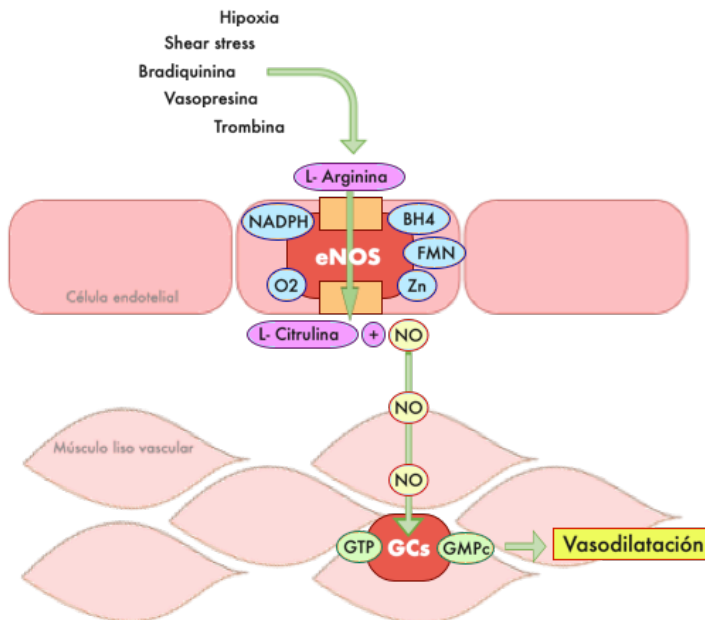


Figura 5. Síntesis de óxido nítrico. **eNOS:** enzima óxido nítrico sintasa; **NADPH:** nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato; **O₂:** oxígeno; **BH₄:** tetrahidrobiopterina; **FMN:** flavin mononucleótidos; **Zn:** Zinc; **NO:** óxido nítrico; **GTP:** guanosín trifosfato; **GCs:** guanilato ciclasa soluble; **GMPC:** guanosín monofosfato cíclico.

Existen tres isoformas de la NOS: la tipo I o neuronal (nNOS), la tipo II o inducible (iNOS) y la tipo III o endotelial (eNOS). La actividad de la nNOS y la eNOS es dependiente de la concentración intracelular de calcio y su asociación con la calmodulina, a diferencia de la iNOS cuya actividad es inducida por citoquinas y otras moléculas inflamatorias (45).

La eNOS es la isoforma predominante en las células endoteliales pero no es exclusiva de éstas ya que también está presente en las plaquetas, células epiteliales y cardiomiocitos. Se encuentra activa de forma constitutiva si bien algunos factores como el *shear stress*, la hipoxia, las catecolaminas, la trombina, la vasopresina o la bradiquinina, entre otros, aumentan su actividad.

La nNOS se encuentra en neuronas específicas del sistema nervioso central (SNC) y periférico así como el sistema nervioso autónomo que inerva los aparatos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. En el SNC, participa en la neurotransmisión excitatoria, la regulación del flujo sanguíneo encefálico y la plasticidad cerebral (46).

La iNOS es inducida por estímulos inflamatorios y participa en la inmunidad celular y en los mecanismos de defensa contra organismos patógenos y células tumorales. Una vez activada, produce grandes cantidades de NO hasta ser degradada. Esta sobreproducción descontrolada conduce a estados citotóxicos y parece estar involucrada en el shock séptico, enfermedades inmunomediadas y neurodegenerativas (45).

Existen sustancias análogas de la L-arginina que pueden actuar como inhibidores de la actividad de la NOS. Estos análogos proceden del exterior, como el N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME); o son sintetizados de forma endógena como el N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) y el N^G,N^G-dimetil-L-arginina (ADMA), ambos componentes naturales del plasma humano que se forman como subproductos de la metilación y degradación de proteínas por acción de las enzimas proteína-arginina-metiltransferasas (PRMTs) (46–48). Inhiben eficazmente la NOS, produciendo vasoconstricción y disminución del flujo sanguíneo *in vitro*. Se ha observado un aumento de los niveles de ADMA en la insuficiencia renal, la hipertensión y la hipercolesterolemia, por lo que se reconoce que el ADMA puede desempeñar un papel relevante en la patogenia y la progresión de la aterosclerosis siendo considerado un predictor independiente de la mortalidad cardiovascular (48,49).

Como se ha descrito anteriormente, gran parte de las enfermedades cardiovasculares están relacionadas con un grado variable de disfunción endotelial que conduce a un déficit en la producción endógena de NO. En esta línea, se han desarrollado fármacos que actúan de forma independiente liberando NO de forma espontánea (50). Se trata de las nitrosaminas y los nitrosotioles, cuyo principal representante es el nitroprusiato sódico, un potente vasodilatador arteriovenoso que está indicado actualmente en el tratamiento de las crisis hipertensivas refractarias y la insuficiencia cardíaca congestiva.

5.1.2. Prostanoides

Pertenecen al grupo de los eicosanoides. Su precursor es el ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado que forma parte de los fosfolípidos de membrana (51). Una vez liberado gracias a la acción de las fosfolipasas puede ser metabolizado por diferentes vías siendo la más importante la vía enzimática de la ciclooxigenasa (COX) que genera como resultado prostaglandinas y tromboxanos (42). El primer paso de la síntesis es la oxidación del ácido araquidónico que da lugar a prostaglandina G_2 . A continuación, ésta se transforma en prostaglandina H_2 mediante peroxidación (52). A partir de este momento actúan sintetas específicas que dan lugar a diferentes prostanoides con capacidad vasoactiva que puede ser vasodilatadora como la PGI_2 , la prostaglandina D_2 y la prostaglandina E_2 ; o vasoconstrictora como la misma PGI_2 en altas concentraciones, la prostaglandina $F_{2\alpha}$ y el TXA_2 (51,52) (Figura 6). De los anteriores, los que intervienen más significativamente en la regulación del sistema cardiovascular son la PGI_2 y el TXA_2 (42).

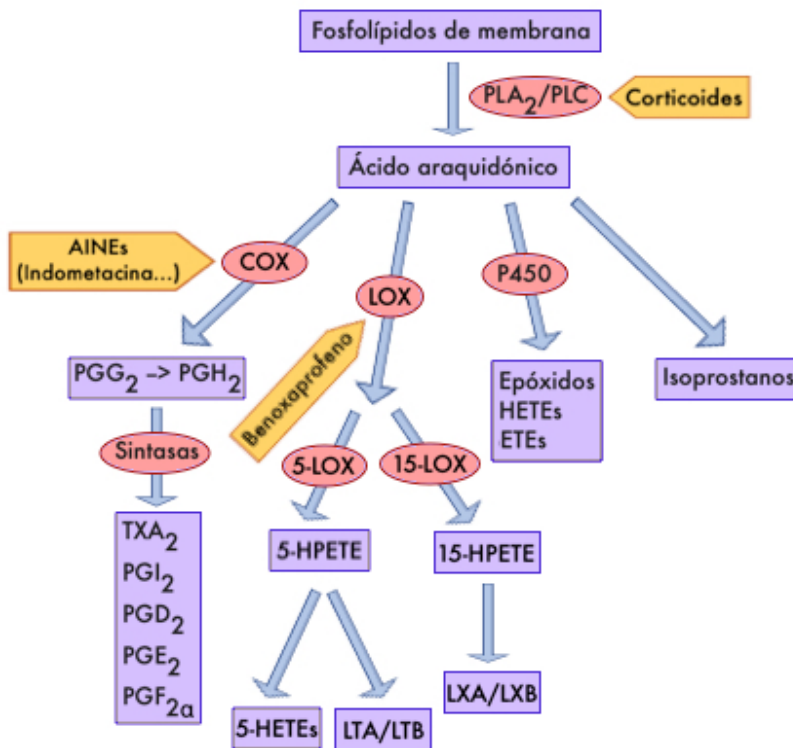


Figura 6. Síntesis de prostanoides. **PLA₂**: fosfolipasa A₂; **PLC**: fosfolipasa C; **COX**: ciclooxigenasa; **PGG₂**: prostaglandina G₂; **PGH₂**: prostaglandina H₂; **PGI₂**: prostaciclina; **TXA₂**: tromboxano A₂; **PGD₂**: prostaglandina D₂; **PGE₂**: prostaglandina E₂; **PGF_{2α}**: prostaglandina F_{2α}; **LOX**: lipooxigenasa; **HPETE**: ácido hidroperoxieicosatetraenoico; **HETEs**: ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos; **ETEs**: ácidos hidroperoxieicosatrienoicos **LTA/LTB**: leucotrienos A y B; **LXA/LXB**: lipoxinas A y B; **P450**: citocromo P450.

La PGI₂ es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria. Una vez sintetizada, interacciona con receptores específicos tipo inositol trifosfato presentes en la membrana del músculo liso vascular. La activación de estos receptores genera un aumento del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que, por un lado, actúa como segundo mensajero reduciendo la concentración de calcio

intracelular y produciendo finalmente la relajación del músculo liso; y por otro lado, puede activar directamente diferentes canales de potasio que también provocan la relajación muscular (53).

Existen tres isoformas de la COX. La COX-1 se encuentra en el citoplasma o cerca del retículo endoplásmico celular y, aunque se expresa constitutivamente en muchos tejidos, su expresión puede aumentar o disminuir en respuesta a diferentes estados fisiológicos o patológicos (p.ej. en el endotelio generalmente aumenta en situaciones de hipoxia o *shear stress*). La COX-2 se encuentra fundamentalmente en la región perinuclear y en la membrana nuclear. También se expresa constitutivamente en varios tejidos como el riñón o el SNC siendo inducida por situaciones de estrés oxidativo o en respuesta a distintos mediadores inflamatorios (54). Se ha visto que desempeña un papel fundamental en la producción de PGI₂ en situaciones de daño vascular, actuando de forma predominante en la región carotídea y el árbol coronario (55). La COX-3 fue la última en ser identificada (2002) y, aunque deriva del mismo gen que codifica la COX-1, es estructural y funcionalmente distinta. Se expresa fundamentalmente en el córtex cerebral y el corazón. Se ha visto que tiene una función clave en la producción de la fiebre y el dolor a nivel central. Tiene la particularidad de ser inhibida por el paracetamol por lo que se ha postulado que su inhibición podría estar relacionada con el efecto antipirético de varios antiinflamatorios no esteroideos (56).

5.1.3. Hiperpolarización derivada del endotelio

La vasodilatación dependiente del endotelio es generalmente atribuida a la liberación de PGI₂ y NO. No obstante, esta respuesta no puede explicarse únicamente por la acción de estos dos mediadores ya que, en presencia de inhibidores de la COX y la NOS, se observa una vasodilatación residual en gran parte de los lechos vasculares que se produce por un mecanismo de hiperpolarización de las células musculares lisas. Inicialmente la naturaleza química de este mecanismo no estaba claramente definida por lo que se atribuyó a un factor endotelial no caracterizado que se denominó factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF, por sus siglas en inglés) (57,58). En la actualidad, se ha visto que dicha respuesta, si bien depende del endotelio, no está mediada por un factor específico (58,59).

Cuando la hiperpolarización de las células musculares lisas vasculares se produce por vía endotelial requiere la apertura de los canales de potasio activados por calcio (KCa) (60). Diversos estímulos físicos (*shear stress*) y neurohormonales (acetilcolina, bradiquinina, etc.) provocan un aumento del calcio en el interior de las células endoteliales que conduce a la apertura de los KCa de baja e intermedia conductancia (57). Esto genera una salida de iones potasio al espacio intersticial desde donde difunden al interior de los miocitos subyacentes por diversos mecanismos: a través de la activación de la bomba sodio-potasio (ATPasa), de los canales rectificadores anómalos de entrada de potasio (Kir) y de las uniones mioendoteliales tipo gap por acoplamiento eléctrico (58,61) (Figura 7).

Se ha postulado la existencia de una segunda vía que no depende del endotelio. La hiperpolarización en este caso se produciría tras la apertura de diferentes canales de potasio, especialmente los sensibles a ATP (KATP) y los KCa de alta conductancia (BKCa) presentes en las células musculares lisas, y estaría inducida por distintos mediadores entre los que se incluyen: los ácidos epoxieicosatrienoicos, el NO, el AMPc, las corrientes iónicas, los propios iones potasio, el monóxido de carbono, el peróxido de hidrógeno, el péptido natriurético atrial y las especies reactivas del oxígeno (57,58,62,63) (Figura 7).

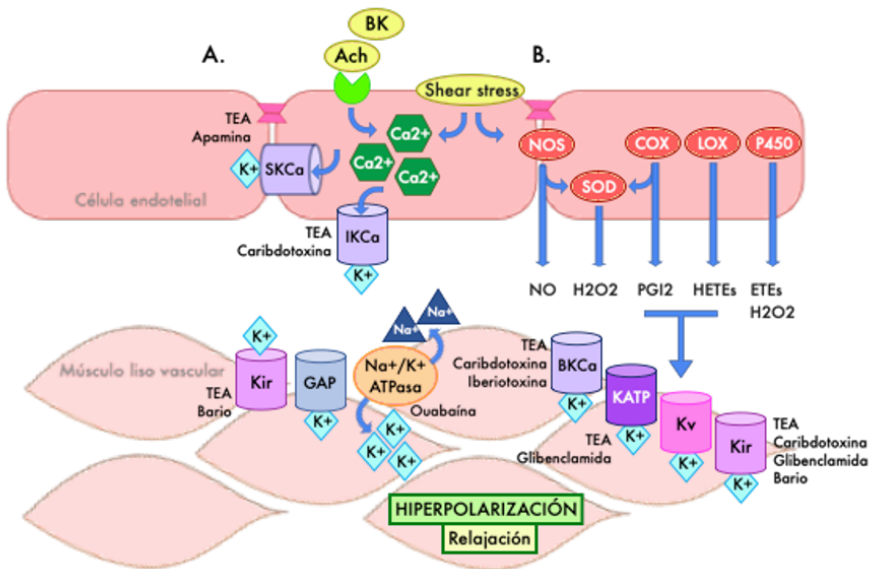


Figura 7. Mecanismos de hiperpolarización del músculo liso vascular. **BK:** bradiquinina; **Ach:** acetilcolina; **SKCa:** canales de potasio activados por calcio de baja conductancia; **IKCa:** canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia; **BKCa:** canales de potasio activados por calcio de alta conductancia; **KATP:** canales de potasio sensibles a ATP; **Kv:** canales de potasio dependientes de voltaje; **Kir:** canales rectificadores anómalos de entrada de potasio; **K⁺:** potasio; **Ca²⁺:** calcio; **Na⁺:** sodio; **NOS:** óxido nítrico sintasa; **SOD:** superóxido dismutasa; **COX:** ciclooxigenasa; **LOX:** lipooxigenasa; **P450:** citocromo P450; **TEA:** tetraetilamonio;

NO: óxido nítrico; **H₂O₂:** peróxido de hidrógeno; **PGI₂:** prostaciclina; **HETEs:** ácidos hidroxieicosatetraenoicos; **EETs:** ácidos epoxieicosatrienoicos.

La contribución del endotelio en la relajación de los vasos así como el número de uniones gap mioendoteliales aumenta de forma inversamente proporcional al tamaño de estos (57,64,65). Asimismo, la vasodilatación mediada por la EDH varía dentro del mismo vaso, entre lechos vasculares e incluso entre especies (58,63).

Las respuestas mediadas por la EDH se alteran por el envejecimiento y diversas patologías como la hipertensión, la hipercolesterolemia, la insuficiencia cardíaca, la diabetes o la sepsis. La disfunción endotelial observada en diversas enfermedades cardiovasculares se asocia también con una disminución de la síntesis de NO. El NO ejerce un tono inhibitorio sobre los mecanismos de la EDH, por lo que ante una disminución de su biodisponibilidad en presencia de inhibidores de la NOS, se potenciaría la vía de la EDH asegurando el mantenimiento de la vasodilatación dependiente del endotelio (58). Se han realizado estudios en animales con algunos fármacos como el cilostazol (66) o el enalapril (67) que han demostrado una mejora en la señalización de la EDH. Aunque se ha observado que la acción terapéutica de los IECA, los ARAII, los inhibidores de la fosfodiesterasa 3, los ácidos grasos omega-3 o los derivados de los polifenoles pueden restaurar las respuestas mediadas por la EDH, esta vía aún no ha sido el objetivo directo de ninguna herramienta terapéutica (64,65).

5.2. Canales de potasio

Como se ha mencionado anteriormente, la función predominante del músculo liso vascular es la regulación del tono de los vasos que se modula en base a mecanismos de contracción-relajación. El estado contráctil depende de la concentración citosólica de calcio en las células musculares lisas. La concentración intracelular de calcio en reposo es baja (menos de 10 nM) pero puede incrementarse mediante su liberación desde depósitos intracelulares como el retículo sarcoplásmico y la mitocondria, o mediante su entrada desde el espacio extracelular a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, sobre todo de tipo L (ICaL), presentes en la membrana plasmática del sarcolema (42). El potencial de reposo de las fibras musculares se mantiene entre -40 y -50 mV gracias a la acción de los canales de potasio (68). Su apertura conduce a la hiperpolarización, cierre de los canales de calcio y, por consiguiente, relajación, mientras que su cierre conduce a la despolarización produciendo el efecto contrario.

Dentro de los canales iónicos, el subgrupo de los canales de potasio es el más diverso y numeroso. Se han identificado hasta 75 genes diferentes relacionados con dichos canales (69). Su función consiste en permitir el paso de iones potasio a través de la membrana plasmática y, dependiendo de su topología, se han clasificado cuatro familias: los KCa, los Kir (entre los que se incluyen los sensibles a ATP [K. Ho et al., 1993]), los voltaje-dependientes (Kv o Kdr) y con dominio de dos poros (K2P) (42,71,72).

De forma simplificada, todos ellos están formados por una subunidad α (principal) formada por dos dominios transmembrana

(DTM) que constituyen el poro funcional del canal y una subunidad β (accesoria) que modifica las propiedades funcionales de este. KATP y Kir están formados por únicamente por los dos DTM que limitan la región del poro. KCa y Kv poseen al menos seis DTM, entre la cinco y seis se ubica el poro del canal y además cuentan con una región responsable de detectar los cambios de voltaje (73). K2P están formados por cuatro DTM con dos dominios formadores de poro y, a diferencia del resto de canales, se forman como un dímero (Figura 8).

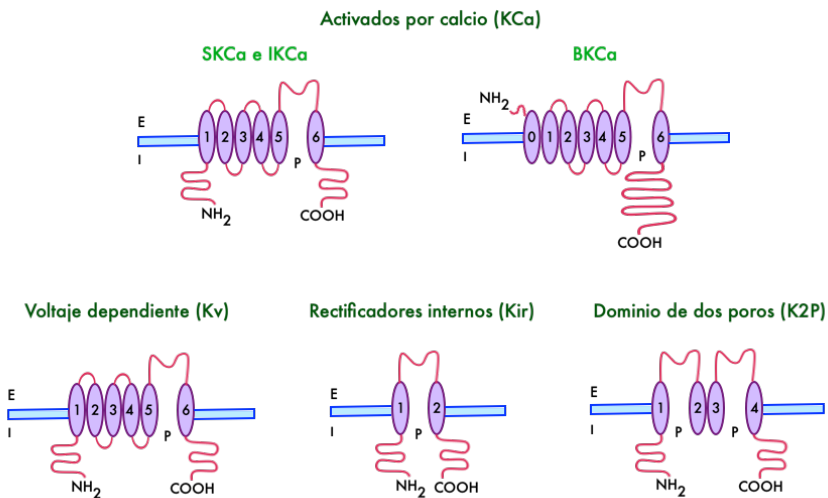


Figura 8. Familias de canales de potasio. E: espacio extracelular; I: espacio intracelular; P: poro; NH₂: extremo amino terminal; COOH: extremo carboxilo terminal.

5.2.1. Canales de potasio activados por calcio (KCa)

Los KCa juegan un papel fundamental en el control del tono miogénico vascular, especialmente en arterias de pequeño tamaño (57,64,65). Su activación es dependiente de calcio y de voltaje. Se han descrito tres subtipos según su conductancia: baja, intermedia o alta.

Estos subtipos presentan una distribución tisular variada y una farmacología específica (42,72).

Los de alta conductancia se expresan mayoritariamente en las células musculares lisas vasculares y regulan su excitabilidad. A diferencia de los canales baja e intermedia conductancia, su sensibilidad al calcio no está relacionada con su asociación a la calmodulina si no con la presencia de dos regiones de alta afinidad ubicadas en la subunidad α que se unen al calcio de manera directa (42). El incremento de calcio producido durante la despolarización y contracción estimula la apertura de estos canales favoreciendo la posterior repolarización del potencial de membrana y la relajación como resultado de un sistema de retroalimentación negativa del acoplamiento excito-contráctil de las células musculares. A estas corrientes transitorias y espontáneas de salida de potasio se les denominó “corrientes transitorias espontáneas de salida” (STOCs, por sus siglas en inglés) y proporcionan un mecanismo de frenado frente a la vasoconstricción (58). Son inhibidos por bloqueadores inespecíficos como el tetraetilamonio (TEA) y por los venenos de escorpión caribdotoxina e iberiotoxina, entre otros (42,68).

Los canales KCa de baja e intermedia conductancia se expresan de forma constitutiva en las células endoteliales y son actores clave en la generación de respuestas mediadas por NO y EDH. Tienen una distribución espacial específica, los de baja conductancia se localizan en las uniones gap intercelulares y las caveolas mientras que los de conductancia intermedia se localizan próximos a las uniones gap mioendoteliales. En términos generales, un aumento del calcio

endotelial activa estos dos canales y producen hiperpolarización. El subtipo de conductancia intermedia también es inhibido por el TEA, la caribdotoxina y específicamente por el triarilmetano 34 (TRAM 34) mientras que el de baja conductancia es inhibido específicamente por la apamina (42,68).

La expresión de los K_{Ca} aumenta en patologías que asocian disfunción endotelial como la hipertensión o la diabetes. Se ha visto que en las células de músculo liso vascular sanas aisladas los K_{Ca} de baja e intermedia conductancia generalmente no se expresan. No obstante, en estas mismas células en cultivo o tras un daño vascular la expresión de estos canales aumenta (68).

5.2.2. Canales de potasio rectificadores anómalos (Kir)

Los canales Kir, también denominados rectificadores de entrada (*inward rectifiers*) o anómalos, funcionan a través de un mecanismo anormal respecto al resto de canales de potasio. La mayor parte del tiempo el potencial de membrana es más positivo que el potencial de equilibrio del potasio por lo que el potasio fluye hacia fuera generando una corriente hiperpolarizante limitada pero constante que contribuye al mantenimiento de este potencial. Sin embargo, los Kir no siguen un comportamiento lineal como cabría esperar sino que cuando el potencial de membrana es más negativo que el potencial de equilibrio del potasio la conductancia de este ion hacia dentro es mayor que la esperada para un canal no dependiente de voltaje. Incluyen cuatro subtipos: los acoplados a proteínas G (GIRK), los K_{ATP}, los transportadores y los Kir clásicos (70).

Los Kir no sólo son activados por un aumento de la concentración extracelular de potasio sino también por el *shear stress* causando hiperpolarización y relajación. Intervienen en la vasodilatación mediada por el flujo y están modulados por agonistas vasoactivos (71). Su bloqueo causa despolarización y vasoconstricción siendo su principal inhibidor el cloruro de bario (42,68).

5.2.3. Canales de potasio dependientes de voltaje (Kv)

Estos canales se expresan tanto en las células endoteliales como en el músculo liso vascular. Son dependientes de voltaje y participan en el control del potencial de membrana y en la regulación del tono muscular. Se activan tras la despolarización para restaurar el potencial de membrana (por eso también son denominados “rectificadores tardíos” o *delayed rectifiers*) y prevenir la contracción excesiva del músculo liso en respuesta a estímulos físicos o neurohumorales (74). Este mecanismo de protección se denomina “contención dependiente de voltaje” (*voltage-dependent brake*) (42,75). Son inhibidos por el fármaco 4-aminopiridina (76) y, al igual que en los Kir, su bloqueo da como resultado la despolarización y vasoconstricción.

5.2.4. Canales de potasio con dominio de dos poros (K2P)

Los canales K2P permanecen abiertos de forma prácticamente independiente al potencial y con poca dependencia del voltaje por lo que, al igual que los Kir, intervienen en el establecimiento del potencial de membrana. También participan en la regulación del tono vascular miogénico y en la excitabilidad celular. Incluyen varios subtipos y están

distribuidos en varias regiones del organismo, p.ej. los canales TASK se expresan en las arterias pulmonares y mesentéricas, los canales TWIK-2 en las arterias cerebrales, etc. (42). Actualmente se ha descrito el mecanismo de acción de algunos de ellos, si bien la función precisa de cada uno aún no se ha caracterizado completamente, ya que son los de más reciente descubrimiento.

5.3. Factores vasoconstrictores derivados del endotelio

5.3.1. Tromboxano A₂

Pertenece al grupo de los eicosanoides. Originalmente se pensaba que era sintetizado únicamente por las plaquetas en respuesta al daño endotelial pero actualmente se sabe que es liberado también por otros grupos celulares entre los que se incluyen los neutrófilos, los macrófagos y las células endoteliales (77). Como su nombre indica, ejerce una acción protrombótica ya que estimula la activación de las plaquetas y su agregación. Tiene una vida media corta (unos 30 segundos) por lo que actúa de forma autocrina o paracrina activando a las plaquetas adyacentes que, a su vez, generan más TXA₂ en un mecanismo de retroalimentación positiva (77). Además, es un potente vasoconstrictor y el principal agonista de los receptores prostanoides en el músculo liso vascular. Pero no sólo provoca la contracción del músculo liso de los vasos sino también del intestinal, el bronquial, el uterino y el vesical (78).

Se ha observado un aumento de su actividad en numerosas patologías inflamatorias y cardiovasculares entre las que se incluyen el infarto de miocardio, la angina de Prinzmetal, la aterosclerosis y el

asma bronquial (79,80). También se ha descrito su implicación en la angiogénesis y metástasis de células cancerosas (77,78).

5.3.2. Endotelina-1

A finales de los años 80, ya era conocida la existencia de un mecanismo de vasoconstricción dependiente del endotelio que se producía en respuesta a diferentes estímulos como la hipoxia, el estrés mecánico o el aumento de la presión intraluminal. Sin embargo, no fue hasta 1988 cuando se aisló el mediador responsable de dicha respuesta, la endotelina, un péptido de 21 aminoácidos cuya isoforma más importante es la ET-1, actualmente considerada el vasoconstrictor endógeno más potente conocido (81).

La mayor parte de la ET-1 es liberada localmente y ejerce su acción vasoconstrictora y proliferativa a través de los receptores de endotelina tipo A presentes en las células musculares lisas. Existe un segundo grupo de receptores, los tipo B, que se localizan predominantemente en las células endoteliales. Su activación causa mayoritariamente vasodilatación a través de la liberación de NO y PGI₂ contribuyendo a atenuar la vasoconstricción producida por los tipo A (41,81).

Es sintetizada por el endotelio vascular en respuesta a diversos factores entre los que se encuentran la angiotensina II, la vasopresina, la trombina, la hipoxia y el *shear stress* bajo. Por el contrario, el *shear stress* alto, el NO, la PGI₂, el péptido natriurético atrial y la heparina inhiben su producción (82). Existe evidencia a favor de su participación en la patogenia de la hipertensión arterial severa debido a su interacción

con el sistema renina-angiotensina y con el NO (83). Se han observado concentraciones elevadas de ET-1 en múltiples patologías entre las que se incluyen, además de la hipertensión, el infarto de miocardio, la preeclampsia, arteriosclerosis e insuficiencia renal (84,85)

5.3.3. Influencia del sistema simpático

El sistema nervioso simpático se encarga de regular de forma involuntaria numerosas acciones, entre ellas la función cardíaca, la contracción del músculo liso y la secreción glandular. Está compuesto por neuronas preganglionares, cuyo cuerpo se encuentra en el encéfalo o la médula espinal, y neuronas postganglionares ubicadas en los ganglios simpáticos. Ejerce su acción a partir de dos neurotransmisores: la adrenalina y NA. La primera es liberada por las células cromafines de la médula adrenal mientras que la segunda es liberada por las terminaciones postganglionares simpáticas. Ambos mediadores se unen a receptores específicos (adrenérgicos o adrenorreceptores) actuando sobre numerosos órganos y sistemas (21,86,87).

En 1948 Ahlquist describió dos tipos de adrenorreceptores tras completar varios estudios que investigaban las acciones agonistas y antagonistas de los fármacos alcaloides del cornezuelo de centeno (88). Se vio que el receptor denominado β tenía una función fundamentalmente inhibitoria, excepto en el corazón, y el receptor denominado α principalmente excitadora, excepto en el intestino (88). Estos conocimientos fueron ampliándose posteriormente de modo que se fueron identificando nuevos subtipos de receptores α (α_1 y α_2) y β (β_1 , β_2 y β_3) (87).

Los receptores α_1 son postsinápticos. Están presentes en el músculo liso vascular y los tractos urinario y gastrointestinal. Su activación produce un aumento o disminución del tono muscular según el órgano efector: produce constricción en determinados lechos vasculares (especialmente el esplácnico y el cutáneo) y relajación en el tracto digestivo y urinario. Aunque en menor medida, también actúan sobre la circulación venosa causando vasoconstricción (89,90).

Los receptores α_2 son de localización pre y postsináptica. A nivel postsináptico se les atribuyen múltiples acciones: regulación del tono vascular, agregación plaquetaria, inhibición de la lipólisis y liberación de insulina. En el endotelio ejercen una función vasodilatadora al aumentar la liberación de NO (87,91). No obstante, se ha visto que en el sistema venoso de la mayoría de las especies pueden causar vasoconstricción (87,92). A nivel presináptico, aumentan la recaptación de NA disminuyendo la respuesta vasoconstrictora en un mecanismo de *feed back* negativo. A nivel central incrementan el tono parasimpático disminuyendo las resistencias vasculares sistémicas y la frecuencia cardíaca (87).

La distribución de estos receptores varía entre los diferentes lechos vasculares e incluso en un mismo vaso. En general en el sistema arterial los receptores α_2 aumentan respecto a los α_1 conforme disminuye el tamaño del vaso excepto en la circulación cerebral donde ocurre lo contrario (93). En la circulación coronaria hay un cambio en los receptores conforme disminuye el calibre de las arterias de modo que los vasos pequeños sólo poseen receptores β_1 (87, 94).

Los receptores β son los más estudiados y conocidos. Regulan principalmente la función cardíaca aunque también ejercen su acción sobre el sistema vascular (92). Los receptores β_1 son postsinápticos y predominan en el miocardio y en el sistema de conducción donde aumentan el inotropismo y el cronotropismo (90). Los receptores β_2 son pre y postsinápticos. Su estimulación presináptica tiene un efecto opuesto al de los α_2 aumentando la liberación de NA endógena en la sinapsis. Se localizan en el músculo liso de los vasos, la piel, los bronquios, el tracto urinario y gastrointestinal y su efecto es de relajación (92). Los receptores β_3 son el subtipo menos estudiado. Recientemente, su expresión ha sido demostrada en varios tejidos revelando nuevos detalles sobre sus vías de señalización y sus funciones, entre ellas su implicación en mecanismos de relajación vesical y concentración de la orina, en la lipogénesis y termogénesis del tejido adiposo, la regulación de los estados depresivos y los procesos inflamatorios (95).

Se ha sugerido la existencia de una interrelación entre los receptores adrenérgicos y la vía del NO en el control del tono vascular (91). El desequilibrio entre ambos mecanismos suele estar comprometido en la mayoría de patologías cardiovasculares en las que se observa una disminución de la liberación de NO y un aumento del tono simpático (62).

Actualmente existe toda una serie de herramientas terapéuticas que actúan sobre el sistema nervioso simpático. Dentro de su farmacología cabe diferenciar entre fármacos simpaticomiméticos y simpaticolíticos. Los fármacos simpaticomiméticos producen efectos

similares a los producidos por la estimulación fisiológica normal que pueden ser directos, estimulando los receptores (p.ej. la adrenalina, NA, isoproterenol y dopamina), indirectos aumentando la liberación o inhibiendo la recaptación del neurotransmisor en cuestión (p.ej. la efedrina, cocaína o guanetidina), o mixtos. Los fármacos simpaticolíticos inhiben la respuesta simpática e incluyen a los alfabloqueantes (p.ej. la prazosina y fenoxibenzamina), los betabloqueantes (p.ej. esmolol, propranolol o atenolol) y los alfa y betabloqueantes (como el labetalol) (96).

6. Ranolazina

La ranolazina es un fármaco derivado de la piperazina ([+]-N-[2,6-dimetilfenil]-4[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)-propil]-1-piperazina acetamida) (97), que actualmente se utiliza como terapia complementaria en el tratamiento de pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable que sean intolerantes o no hayan respondido adecuadamente al tratamiento con los fármacos de primera elección (betabloqueantes, antagonistas del calcio y nitratos) (Tabla 1).

6.1. Farmacocinética de la ranolazina

Es un fármaco que se administra vía oral y está disponible en comprimidos de 375 mg, 500 mg y 750 mg que se deben ingerir dos veces al día. En su forma de liberación inmediata, su farmacocinética está caracterizada por una semivida corta y con una gran variabilidad interindividual en su absorción (98) por lo que actualmente las fórmulas que se emplean son de liberación retardada. Su biodisponibilidad oral

es de aproximadamente el 75% alcanzando su concentración plasmática máxima a las 2 - 6 horas y el estado estacionario en un plazo de 3 días desde su administración (98). Respecto a su distribución, aproximadamente el 62% se encuentra unida a proteínas plasmáticas con un volumen de distribución medio en estado estacionario que ronda los 180 litros (2,5 L/kg) (98). Su semivida de eliminación es de 2-3 horas tras su administración vía intravenosa y 7 horas por vía oral con un aclaramiento dosis dependiente. Sufre una metabolización hepática rápida que es llevada a cabo principalmente por la enzima CYP3A4 y parcialmente por CYP2D6, ambas pertenecientes al complejo enzimático citocromo P450, siendo ésta la vía principal de eliminación.

Los parámetros farmacocinéticos previamente descritos no se ven afectados por el género ni la edad, si bien en sujetos de edad avanzada se recomienda revisar adecuadamente la dosis asumiendo que la función renal disminuye con la edad y que, adicionalmente, se ha observado una mayor incidencia de eventos adversos en este grupo de población. Sí se ha observado un aumento en la concentración plasmática del fármaco en sujetos con bajo peso corporal, insuficiencia cardíaca avanzada, insuficiencia renal moderada y grave e insuficiencia hepática moderada (98). Igualmente, se debe vigilar cuidadosamente su administración concomitante con inhibidores moderados de la CYP3A4 y de la glicoproteína P de la que es sustrato. Su uso concomitante con inhibidores potentes (p.ej. ketoconazol, claritromicina, inhibidores de la proteasa, zumo de pomelo, etc.) está contraindicado. No obstante, en el caso de la CYP2D6 sólo se recomienda ajustar la dosis en metabolizadores lentos o cuando se

desconoce el estado del paciente respecto a esta enzima. Al mismo tiempo se debe considerar que la coadministración con inductores del citocromo P450 provoca una pérdida de eficacia. Además, la ranolazina es un inhibidor en sí misma de la glicoproteína P, de la CYP3A4 y de la CYP2D6 por lo que puede aumentar las concentraciones plasmáticas de otros medicamentos (98).

Por otro lado, se ha visto que la ranolazina prolonga el intervalo QT de forma dosis dependiente por lo que en pacientes con antecedentes de QT largo o en tratamiento con otros fármacos que alteren este intervalo (p.ej. antiarrítmicos de clase I como la quinidina o de clase III como el sotalol) su uso está contraindicado (98).

6.2. Farmacodinamia de la ranolazina

En cuanto a su mecanismo de acción, actúa principalmente inhibiendo la corriente tardía de entrada de sodio (I_{NaL}) en los miocitos aunque, a concentraciones terapéuticas, también inhibe la corriente rectificadora de potasio (I_{Kr}) (99–101). En condiciones fisiológicas, se produce la apertura de los canales de sodio de las células cardíacas durante el potencial de acción. Este mecanismo genera una primera corriente rápida de iones sodio hacia el interior celular durante la fase de despolarización y una segunda corriente más lenta y tardía durante la fase de meseta (97,101). Esta última contribuye en la repolarización regulando la duración del potencial de acción (97). Cuando se ve alterada, fundamentalmente en situaciones de isquemia miocárdica, se produce una sobrecarga de sodio intracelular (100,102). Este desequilibrio iónico desencadena la activación de una serie de

mecanismos destinados a restaurar de nuevo el balance entre el exterior y el interior celular. El miocito expulsa las concentraciones patológicas de sodio a través del intercambiador sodio-calcio de tipo 1 (102) lo que conduce a una sobrecarga de calcio intracelular y al aumento de la tensión en el miocito que se traduce en un retraso de la relajación miocárdica con la consiguiente disfunción diastólica (Figura 9). En estudios preclínicos, este aumento de la rigidez miocárdica diastólica da como resultado una compresión extrínseca prolongada de los vasos intramurales y una disminución del suministro de oxígeno al miocardio (103,104). Asimismo, se produce un desplazamiento hacia potenciales más positivos que favorecen las despolarizaciones espontáneas tardías y, por tanto, las arritmias (102). Además, al inhibir la I_{K_r} , aumenta la duración del potencial de acción ventricular prolongando el intervalo QT (99,101).

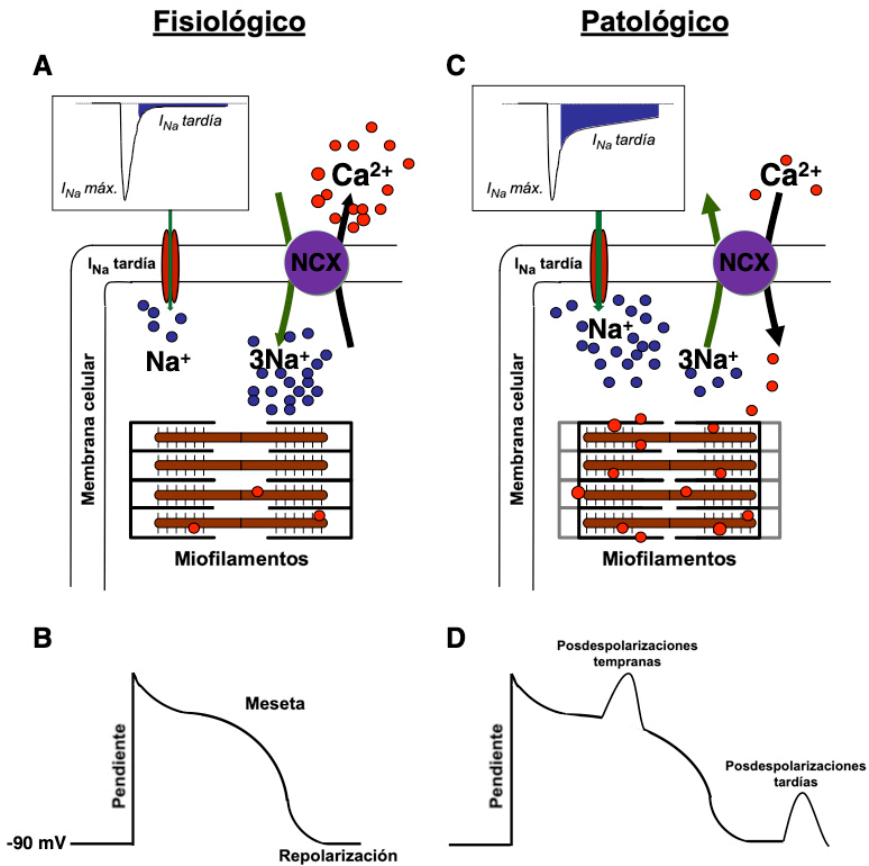


Figura 9. Corriente tardía de sodio fisiológica normal en comparación con una corriente tardía patológicamente elevada. El aumento de la I_{Na} tardía conduce a una sobrecarga de calcio a través del NCX y disfunción diastólica debido a la hiperactivación de los miofilamentos e inestabilidad electrofisiológica como resultado de la prolongación de la duración del potencial de acción con posdepolarizaciones tempranas y tardías. Adaptado de (100). I_{Na} : corriente de sodio; Ca^{2+} : calcio; Na^+ : sodio; NCX : intercambiador sodio-calcio.

La ranolazina ejerce un efecto cardioprotector al evitar la sobrecarga de calcio en las células miocárdicas mitigando la distensión diastólica del ventrículo izquierdo, estabilizando la actividad eléctrica del miocardio y mejorando el flujo sanguíneo coronario (104,105).

Además, a dosis terapéuticas sus efectos no alteran la frecuencia cardíaca ni la presión arterial, a diferencia de otros fármacos antianginosos (106).

6.3. Papel de la ranolazina en la cardiopatía isquémica

La FDA aprobó en 2006 el uso de ranolazina en pacientes con angina crónica estable que no alcanzaban una respuesta adecuada o no toleraban adecuadamente otros antianginosos (107). Desde su aparición, se han realizado varios estudios reseñables para evaluar sus propiedades farmacodinámicas y su perfil de eficacia clínica y seguridad en pacientes con diferentes perfiles de cardiopatía isquémica (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla comparativa entre los principales ensayos realizados con ranolazina en pacientes con cardiopatía isquémica.

	MARISA	CARISA	ERICA	MERLIN-TIMI 36
Pacientes	Angina estable	Angina estable	Angina estable	SCASEST
Diseño	Controlado con placebo, doble ciego	Aleatorizado, controlado con placebo, paralelo de 3 grupos, doble ciego	Aleatorizado, controlado con placebo, grupos paralelos, doble ciego, multicéntrico	Aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego, multicéntrico
Tratamiento	RZ en monoterapia	RZ asociada a: 5 mg de amlodipino , 180 mg de diltiazem o 50 mg de atenolol	RZ asociada a: 10 mg de amlodipino	RZ asociada a terapia estándar (AAS, heparina, tienopiridinas, inhibidores de la GpIIb/IIIa, BB, IECA, estatinas)
n	191	823	565	6560
Duración	4 semanas	3 meses	6 semanas	11 meses
Dosis	500, 1000 y 1500 mg/12h	750 o 1000 mg/12h	1000 mg/12h	200 mg durante 1h, 80 iv durante 12-96h. seguidos de 1000 mg/12h vo
Objetivo primario	Efectos sobre el ejercicio según la dosis	Efectos sobre el ejercicio	Frecuencia episodios de angina	Mortalidad cardiovascular, IAM o isquemia recurrente
Resultados	Aumento en la duración del ejercicio dosis-dependiente	Aumento del tiempo de ejercicio, reducción de angina e isquemia	Reducción de los episodios de angina y el uso de nitratos	No eficaz para reducir mortalidad cardiovascular, IAM o isquemia recurrente

SCASEST: síndrome coronario agudo sin elevación del ST, **RZ:** ranolazina; **AAS:** ácido acetil salicílico; **BB:** bloqueantes beta adrenérgicos; **IECA:** inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; **IAM:** infarto agudo de miocardio.

Más recientemente, se han realizado dos ensayos clínicos en pacientes con perfiles más concretos dentro de la cardiopatía isquémica. En 2016, el ensayo RIVER-PCI (*Results From the Ranolazine for Incomplete Vessel Revascularization*) (108) trató de evaluar la eficacia

de la ranolazina en 2604 pacientes con angina recurrente tras una revascularización percutánea incompleta empleando dosis no autorizadas en la ficha técnica (1000 mg dos veces al día). Al año no se observaron diferencias en la necesidad de hospitalización o revascularización ni en riesgo de mortalidad entre ambos grupos. Sin embargo, se notificaron más eventos cardiovasculares mayores y mortalidad por todas las causas en el grupo de pacientes de 75 años o más tratados con ranolazina. También se vio que los pacientes del grupo tratado interrumpieron con más frecuencia el tratamiento lo que pudo haber limitado la capacidad de explorar sus efectos más a largo plazo.

En 2019, el RIMINI Trial (*Reduction of Ischemic Myocardium with Ranolazine - Treatment IN patients with acute myocardial Infarction*) (109) se realizó con el objetivo evaluar si la mejora en la perfusión miocárdica atribuida a la ranolazina va acompañada de una reducción de la zona miocárdica isquémica en pacientes con síndrome coronario agudo. Se incluyeron veinte participantes con angina inestable, isquemia cardíaca aguda y discinesia miocárdica evidenciada mediante ecocardiografía. Los participantes fueron aleatorizados a recibir tratamiento estándar con o sin ranolazina asociada. A las 6 semanas se observó que los que recibieron ranolazina mostraron una disminución del área de miocardio discinético y una mayor tendencia a una fracción de eyección normal.

Basándose en los resultados obtenidos en los ensayos clínicos anteriores, tanto la guía americana (110) como la europea (6) únicamente recomiendan la ranolazina como antianginoso de segunda

línea en el tratamiento sintomático de la angina crónica estable con un nivel de recomendación IIa y nivel de evidencia B.

6.4. Papel de la ranolazina en la insuficiencia cardíaca

En modelos animales de insuficiencia cardíaca se ha observado que la I_{NaL} está anormalmente elevada provocando un deterioro del rendimiento diastólico del miocardio isquémico (111). La ranolazina, al actuar inhibiendo dicha corriente, podría mejorar la función ventricular y, de hecho, se han realizado varios estudios experimentales *in vivo* e *in vitro* en este sentido objetivándose en todos ellos una mejora de la función diastólica aunque con efectos inotrópicos positivos poco notables (100). En cuanto a ensayos clínicos destaca el estudio RALIDHF (*RANoLazIne for the treatment of Diastolic Heart Failure*) (112), que investigó si el tratamiento con ranolazina mejoraba la función diastólica en pacientes con insuficiencia cardíaca y fracción de eyección conservada. Los resultados revelaron que mejoró los parámetros hemodinámicos sin observarse mejoría en los parámetros de relajación del miocardio. Asimismo, en el estudio MERLIN TIMI-36 se estudió un subgrupo de pacientes con síndrome coronario agudo y niveles elevados de péptidos natriuréticos y se concluyó que la ranolazina no redujo significativamente la aparición de insuficiencia cardíaca (113).

Por último, cabe mencionar el papel de la ranolazina como complemento de la cardioplejía empleada durante las cirugías con circulación extracorpórea. Se ha evidenciado de forma experimental en modelos de isquemia-reperusión con corazones aislados de rata que

durante el paro cardiopléjico isquémico se produce un aumento de la presión telediastólica del VI. La adición de ranolazina o tetrodotoxina a la solución de cardioplejía produjo una notable mejoría en la función diastólica postisquémica (114).

6.5. Papel de la ranolazina en la angina microvascular

Respecto a la angina microvascular la evidencia disponible es contradictoria. Algunos estudios, aunque con poco tamaño muestral, han mostrado evidencias a favor de la ranolazina en el tratamiento de este síndrome (115) mientras que otros (47) no mostraron mejoría de la sintomatología. Por tanto, podría considerarse como opción terapéutica en casos refractarios o con mala tolerancia a otros tratamientos antianginosos teniendo en cuenta que su utilidad en este contexto no ha sido claramente demostrada.

6.6. Papel de la ranolazina en las arritmias

Como se ha visto anteriormente, la ranolazina en concentraciones terapéuticas también inhibe el I_{Kr} lo que explicaría que prolongue el intervalo QT aumentando la duración del potencial de acción ventricular. El intervalo QT largo predispone a la aparición de arritmias ventriculares por lo que cabría esperar que la ranolazina tuviese efecto arritmogénico. Sin embargo, se ha comprobado en varios modelos experimentales que al inhibir ambas corrientes de forma equilibrada no sólo no produce sino que suprime las arritmias ventriculares, especialmente en situaciones patológicas como la isquemia. A nivel auricular, no sólo inhibe la I_{Na} en la fase de meseta

sino también durante la fase de despolarización inicial del potencial de acción disminuyendo la excitabilidad auricular, la velocidad de conducción y aumentando la refractariedad posterior a la repolarización (116). Además, al inhibir también la I_{Kr} , prolonga la duración del potencial de acción auricular aumentando el período refractario efectivo (100).

Por todo lo anterior, su papel en la prevención y tratamiento de las arritmias ha sido objeto de estudio en varios ensayos clínicos. En el estudio MERLIN-TIMI 36 se realizó una monitorización Holter durante los primeros siete días tras la administración de ranolazina y se observó una reducción de las taquicardias ventriculares no sostenidas y de las taquicardias supraventriculares (117). Respecto a la FA, aunque su incidencia fue muy baja, la tendencia a su aparición fue menor en el grupo tratado. Sin embargo, este ensayo no tenía la suficiente potencia estadística ni fue diseñado para investigar la FA de nueva aparición por lo que actualmente no hay evidencia suficiente para recomendar la ranolazina como profilaxis para la FA *de novo* tras un síndrome coronario agudo.

En un ensayo clínico realizado por Fragakis *et al* (118) se evidenció que la adición de ranolazina al tratamiento estándar con amiodarona era igualmente seguro y parecía ser más eficaz en comparación con la amiodarona sola en la cardioversión farmacológica de la FA de aparición reciente.

En el ensayo clínico HARMONY (*Combined Ranolazine and Dronedarone in the Management of Paroxysmal Atrial Fibrillation: Mechanistic and Therapeutic Synergism*) se evaluó el efecto

antiarrítmico de la ranolazina y la dronedarona, solas o combinadas a distintas dosis, en pacientes con FA paroxística. Se realizó un seguimiento durante 12 semanas y se observó que en el grupo que combinaba 750 mg de ranolazina con 225 mg de dronedarona (una dosis reducida ya que lo habitual son 400 mg) dos veces al día hubo una reducción en la carga de FA en comparación con el resto de grupos del ensayo y con placebo (119).

En vista de lo anterior, en este momento no se dispone de evidencia suficiente que apoye el uso de ranolazina en el tratamiento antiarrítmico estándar de pacientes con FA de inicio reciente. Respecto a su papel como agente antiarrítmico adyuvante en el tratamiento de la FA persistente o crónica se han publicado algunas series de casos con escasa repercusión (120). Más recientemente, el estudio RAFFAELLO (*Ranolazine in Atrial Fibrillation Following an Electrical Cardioversion*) (121) incluyó a 241 pacientes con FA persistente sometidos a una cardioversión eléctrica efectiva que fueron aleatorizados a recibir tratamiento con ranolazina a dosis crecientes (375, 500 o 750 mg dos veces al día) o placebo durante 16 semanas. Ninguna dosis de ranolazina prolongó significativamente el tiempo hasta la recurrencia de la FA.

Existe evidencia que sostiene que la ranolazina es eficaz en la prevención de la FA tras cirugía cardíaca. En este estudio publicado por Hammond *et al* en 2015 (122) se evaluó un total de 205 pacientes intervenidos de cirugía coronaria, valvular o ambas y se observó una frecuencia menor de FA postoperatoria en el grupo tratado con

ranolazina añadida al tratamiento estándar en comparación con el grupo que recibió terapia estándar sola.

En el campo de las arritmias ventriculares no existen muchos ensayos clínicos relevantes al respecto. La mayor parte de la evidencia disponible ha sido obtenida en estudios experimentales en animales, p.ej. con corazones de perro *in vitro* (99) y de cerdo *in vivo* (123) donde ha demostrado disminuir la extrasistolia y aumentar el umbral de la fibrilación ventricular. Aparte de los datos aportados por los subestudios derivados del MERLIN-TIMI 36 únicamente destaca el ensayo RAID (*Ranolazine in High-Risk Patients With Implanted Cardioverter-Defibrillators*) que analizó el efecto antiarrítmico de la ranolazina en pacientes de alto riesgo portadores de desfibrilador automático implantable. Los criterios principales fueron la tasa de mortalidad o la de taquicardia o fibrilación ventricular que provocase una activación apropiada del desfibrilador. La ranolazina no demostró reducir los criterios principales aunque en análisis secundarios posteriores demostró disminuir marginalmente la taquicardia o fibrilación ventricular recurrentes sin aumentar la mortalidad (124).

6.7. Papel de la ranolazina en la diabetes

La ranolazina ha demostrado mejorar el control glucémico en varios estudios derivados de ensayos clínicos de relevancia como el CARISA y el MERLIN-TIMI. En el primero demostró disminuir los niveles de HbA1c respecto al grupo control en los sujetos con diabetes y angina estable (125). Un subestudio del ensayo MERLIN-TIMI arrojó resultados similares donde, además, éstos tenían más probabilidades de

alcanzar un HbA1c menor al 7% y menos probabilidades de aumentar sus niveles al cabo de 1 año. También es importante recalcar que no se apreció un aumento de la hipoglucemia en el grupo tratado (126). No obstante, estos resultados deben ser interpretados con cautela puesto que dichos estudios no fueron diseñados para evaluar el efecto de la ranolazina sobre los parámetros glucémicos y además los pacientes con diabetes mellitus estaban generalmente en tratamiento con otros antidiabéticos.

Recientemente Eckel *et al* publicaron un estudio aleatorizado, controlado con placebo y doble ciego que evaluó el efecto de la ranolazina en monoterapia en 465 pacientes con diabetes tipo 2 con control inadecuado de la glucemia sólo con dieta y ejercicio. En el grupo de ranolazina se observó una reducción significativa de la HbA1c siendo la proporción de sujetos que lograron una HbA1c < 7,0% mayor en el grupo tratado (127).

El mecanismo por el cual actúa mejorando el control glucémico todavía se desconoce. Se ha postulado en modelos experimentales animales que pueda actuar preservando las células β del páncreas y aumentando la liberación de insulina (128), o bien bloqueando las células α inhibiendo la síntesis de glucagón (127,129). Aunque actualmente la ranolazina no está reconocida como tratamiento antidiabético, los resultados expuestos sugieren que debería considerarse como una posible opción de tratamiento para pacientes con cardiopatía isquémica estable y diabetes tipo 2 ya que la diabetes es una comorbilidad bastante común en este grupo de pacientes.

6.8. Efectos vasculares de la ranolazina

Venkataraman *et al* (130) demostraron que una dosis media de ranolazina (1.000 mg) dos veces al día en pacientes con cardiopatía isquémica estable, mejoró la perfusión en zonas de isquemia miocárdica durante el ejercicio. La mejora en el flujo sanguíneo coronario se evidenció mediante imágenes de perfusión miocárdica con tomografía computarizada por emisión de positrones. Este estudio piloto abierto no aleatorizado fue el primero de estas características realizado en humanos y estableció la hipótesis para varios ensayos clínicos posteriores. Hoy por hoy, es posible afirmar con certeza que la ranolazina mejora el flujo sanguíneo miocárdico y ejerce un efecto vasodilatador en los pacientes con enfermedad arterial coronaria (6,103).

La evidencia sobre su acción relajante en los vasos coronarios ha despertado el interés por estudiar sus efectos vasculares a nivel periférico. En este sentido, se han realizado varios estudios experimentales en diferentes lechos vasculares de modelos animales. En un estudio realizado en 2011 con cerdos anestesiados (131) se analizó si la administración intracoronaria o intrafemoral directa de ranolazina producía vasodilatación local en dichas regiones vasculares. Se dividió a los animales en tres grupos y se les inyectó ranolazina, nitroglicerina o solución salina (grupo control) en la arteria descendente anterior o en la femoral. La inyección de ranolazina se realizó en bolo y de forma rápida para lograr concentraciones locales altas. Se observó un aumento en el flujo y una reducción de la resistencia vascular en ambos lechos, sin asociar cambios en la frecuencia cardíaca ni en la

presión arterial. El efecto vasodilatador fue comparable en magnitud al de la nitroglicerina aunque más persistente, y fue atribuido principalmente al bloqueo adrenérgico α_1 . Sin embargo, en un estudio similar realizado en perros conscientes (132) en los que la ranolazina se administró de forma sistémica vía intravenosa sólo se observó un aumento transitorio del flujo coronario sin objetivarse cambios significativos en el flujo sanguíneo femoral, lo que conduce a pensar que dicho efecto probablemente se obtuviera como consecuencia de la elevada concentración local lograda con la administración intraarterial.

Algunos autores han sugerido que la vasodilatación inducida por ranolazina depende de la liberación de factores endoteliales. En un ensayo clínico realizado por Deshmukh *et al* (133) se observó que la ranolazina redujo los niveles de ADMA y aumentó los niveles de NO, aunque sin alcanzar la significación estadística. En otro estudio llevado a cabo en arterias intrarrenales de rata (134), la ranolazina indujo relajación dependiente de la concentración en anillos arteriales precontraídos con fenilefrina. Adicionalmente, al evaluar el papel del endotelio se apreció una reducción del efecto relajante del fármaco en presencia de apamina e iberiotoxina sugiriendo la participación de la EDH en su mecanismo de acción. La ranolazina a concentraciones elevadas (mayor a 30 μM) también demostró inhibir las contracciones inducidas por calcio y bloquear los ICaL en células de músculo liso aisladas de arteria renal (134) y aorta de rata (135). Este último, además, aporta nuevos datos sobre la posible implicación de los canales de sodio dependientes de voltaje presentes en los miocitos vasculares y en las terminaciones nerviosas simpáticas perivasculares en los efectos

vasorrelajantes del fármaco (Figura 10). En este mismo estudio también se analizaron los efectos de la ranolazina sobre la arteria uterina humana donde demostró producir una ligera vasodilatación. En otro estudio se analizaron sus efectos sobre el flujo braquial en pacientes con diabetes mellitus y se observó un aumento de la dilatación con cambios en la velocidad de flujo tras 2 semanas de tratamiento (136).

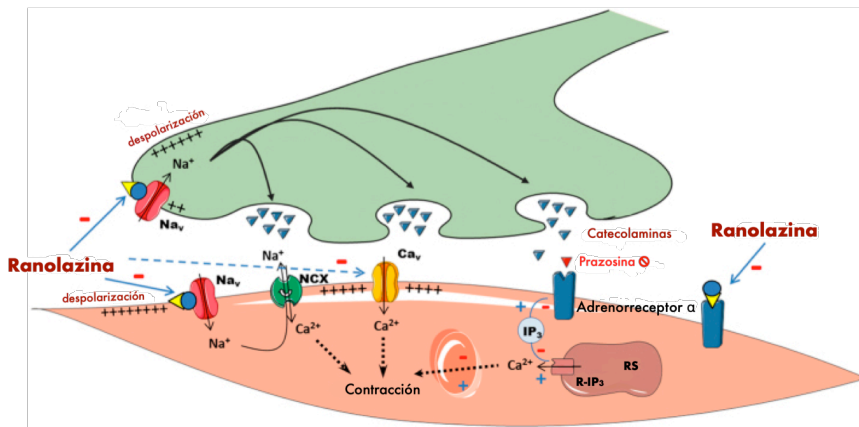


Figura 10. Representación de la inhibición del canal de sodio dependiente de voltaje en los miocitos vasculares y en las terminaciones nerviosas simpáticas perivasculares; y la antagonización del receptor adrenérgico α_1 por la ranolazina. Adaptado de (135). **Nav**: canales de sodio dependientes de voltaje; **Cav**: canales de calcio dependientes de voltaje; **NCX**: intercambiador de sodio-calcio; **IP₃**: receptor de inositol trifosfato; **RS**: retículo sarcoplasmático. La flecha discontinua representa el antagonismo del canal Cav.

6.9. Otros efectos de la ranolazina

Se ha propuesto que la ranolazina actúe a nivel del SNC pudiendo resultar útil en el tratamiento del dolor (137) y de los trastornos epilépticos (138). En esta línea, se han estudiado sus efectos sobre las neuronas y astrocitos de rata y se ha demostrado su efecto

neuroprotector sobre los astrocitos cultivados, con un aumento significativo de su viabilidad y una reducción de la apoptosis, la necrosis y los fenómenos inflamatorios (139).

Finalmente, cabe mencionar que también se le ha atribuido un efecto antiinflamatorio por disminuir los niveles plasmáticos de proteína C reactiva (133).

HIPÓTESIS

La ranolazina ejerce un efecto vasodilatador en los pacientes con enfermedad arterial coronaria mejorando el flujo sanguíneo miocárdico por lo que actualmente se utiliza como terapia adyuvante en el tratamiento de pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable que sean intolerantes o no hayan respondido adecuadamente al tratamiento con los fármacos antianginosos tradicionales.

La evidencia sobre su acción relajante en los vasos coronarios ha despertado el interés por estudiar sus efectos vasculares a nivel periférico. Sin embargo, sus efectos sobre la vena safena humana han sido poco estudiados a pesar de la importancia de este injerto vascular en la cirugía de revascularización miocárdica y el interés existente por encontrar estrategias eficaces para prolongar su vida útil.

Nuestra hipótesis es que la ranolazina podría ejercer un efecto relajante sobre la vena safena humana actuando a través de diferentes mecanismos dependientes e independientes del endotelio, así como por antagonizar los receptores α_1 adrenérgicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los efectos de la ranolazina en la vena safena interna humana haciendo hincapié en los mecanismos a nivel endotelial.

Objetivos específicos

1. Analizar los efectos vasculares de la ranolazina en presencia de agentes vasoactivos endógenos (ET-1, vasopresina y el análogo del TXA₂).
2. Estudiar el efecto de la ranolazina sobre el sistema adrenérgico.
3. Caracterizar los diferentes factores endoteliales que pudieran mediar los efectos vasculares de la ranolazina.
4. Analizar las posibles acciones de la ranolazina sobre los ICaL y los KCa.
5. Evaluar los efectos de la ranolazina sobre la expresión proteica de los receptores de la eNOS, los receptores adrenérgicos α_1 y de los canales BKCa localizados en el tejido vascular.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Declaración ética

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia (INCLIVA) y realizado bajo los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes incluidos firmaron el consentimiento informado.

2. Pacientes

Se incluyeron 53 muestras de vena safena interna de pacientes sometidos a cirugía coronaria. Las características de los sujetos aparecen representadas en la Tabla 3. Se excluyeron aquellos pacientes que recibían tratamiento con ranolazina antes del procedimiento.

Tabla 3. Características demográficas, factores de riesgo cardiovascular y tratamientos activos de los sujetos a estudio.

Pacientes (n)	53
Género	
Varón	44 (83.01%)
Mujer	9 (16.98%)
Edad (media, DE)	70.17 (8.92)
Factores de riesgo cardiovascular	
Hipertensión arterial (n, %)	45 (84.91%)
Diabetes (n, %)	32 (60.38%)
Hipercolesterolemia (n, %)	34 (64.15%)
Tabaquismo (n, %)	17 (32.08%)
IMC (media, DE)	30.28 (DE 4.76)
Obesidad (IMC > 30) (n, %)	28 (52.83%)
Tratamientos	
Antagonistas del calcio (n, %)	14 (26.92%)
Betabloqueantes (n, %)	23 (43.40%)
IECA/ARA-II (n, %)	32 (60.38%)
Nitrovasodilatadores (n, %)	3 (5.66%)
Antagonistas α -1 (n, %)	9 (16.98%)
Antidiabéticos orales (n, %)	19 (35.85%)
Estatinas (n, %)	29 (54.72%)
Diuréticos (n, %)	15 (28.30%)

IMC: índice de Masa Corporal; **IECA:** inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; **ARA:** antagonistas de los receptores de angiotensina II.

3. Obtención de las muestras

La extracción de la vena safena se realizó en quirófano durante las intervenciones de revascularización miocárdica. La obtención de los injertos venosos se llevó a cabo de forma cuidadosa realizando una única incisión cutánea con bisturí frío. Se redujo al máximo la manipulación del vaso empleando únicamente pinzas vasculares y tijeras para su disección, evitando el uso de bisturí eléctrico, el pinzamiento y la distensión hidrostática del segmento disecado (Figura 10). Una vez obtenidas, las venas fueron divididas en dos fragmentos: uno de mayor longitud, destinado a la realización de los injertos aorto-coronarios; y uno menor destinado al experimento. Estos últimos se colocaron inmediatamente en una solución de suero salino fría y fueron almacenados a 4°C hasta ser trasladados al laboratorio. Las ramas colaterales sólo se ocluyeron mediante ligadura o *clipado* automático en el segmento necesario para realizar la intervención. Todas las muestras fueron procesadas durante las primeras 24 horas desde su obtención.

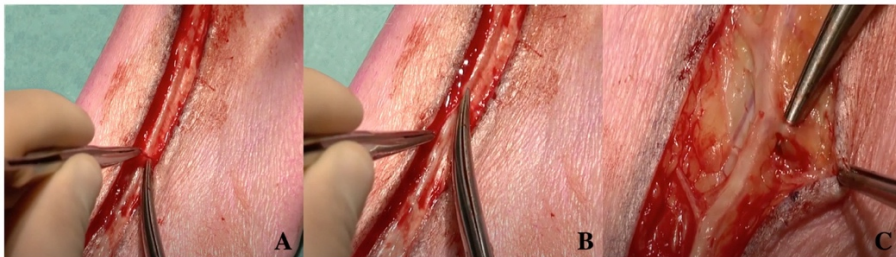


Figura 11. Extracción quirúrgica abierta de la vena safena interna. **A:** apertura de la piel y el tejido celular subcutáneo. **B:** apertura de la fascia siguiendo el trayecto venoso. **C:** localización y disección de ramas colaterales.

Todas las muestras para nuestro estudio fueron obtenidas siguiendo el protocolo aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

4. Estudio de la reactividad vascular

4.1 Preparación de las muestras en el baño de órganos

En el laboratorio, bajo una lupa de disección (Wild M3C) iluminada con luz fría, los segmentos venosos se limpiaron en una placa de Petri con solución salina (NaCl 0.9%) fría y se cortaron en anillos de 3 mm de longitud.

Una vez preparada, cada muestra se colocó en un sistema para el registro de la tensión isométrica (Figura 11). Los anillos venosos fueron ensamblados con dos pasadores rígidos de acero inoxidable en forma de *L* de 200 μm de diámetro colocados a través de su luz y enfrentados entre sí. Uno de los alambres era fijo e iba unido a un soporte adherido, a su vez, a la pared del baño de órganos; el otro alambre móvil, con un desplazamiento paralelo al anterior, iba conectado a un transductor de desplazamiento de fuerza (FT03; Grass Instruments, West Warwick, RI, EEUU) cuya señal era registrada en una computadora Macintosh (Apple Corp., Cupertino, CA, EEUU) utilizando el *software* LabChart versión 7 y un sistema de adquisición de datos MacLab/8e (AD Instruments).

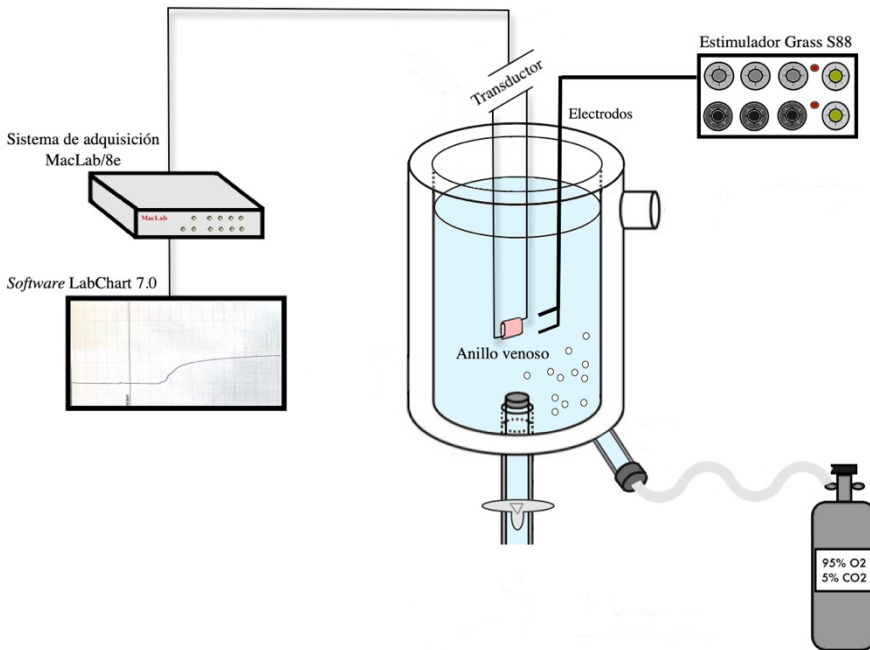


Figura 12. Esquema del baño de órganos y el procedimiento experimental.

Se utilizó un tornillo micrométrico unido al transductor de fuerza que iba separando progresivamente los alambres hasta obtener la tensión pasiva adecuada de los anillos vasculares. Una vez ajustado, cada anillo se introdujo en un baño de órganos que contenía 4 ml de solución fisiológica de Krebs-Henseleit modificada con la siguiente composición (en mM: NaCl 115, KCl 4.6, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.2, $CaCl_2$ 2.5, $NaHCO_3$ 25, glucosa 11.1 y EDTA disódico 0.01). Esta solución, además, iba equilibrada con una mezcla gaseosa (95% O_2 y 5% CO_2) con el fin de obtener un pH entre 7.3-7.4. La temperatura se mantuvo a 37 °C durante todo el experimento.

La funcionalidad del endotelio se analizó valorando la respuesta a bradiquinina (10^{-7} M) en anillos precontraídos con noradrenalina (10^{-7} a 3×10^{-7} M). Si la relajación era mayor o igual al 50% la función endotelial se consideró adecuada. El endotelio de algunas de las muestras se eliminó mecánicamente introduciendo un alambre de acero inoxidable rugoso intraluminal y produciendo una suave rotación de los anillos sobre papel de filtro húmedo. Adicionalmente, se evaluó la capacidad contráctil del músculo liso vascular en base a su respuesta máxima al KCl (60 mM) y se observó que fue similar en los anillos con y sin endotelio.

4.2 Determinación de la tensión basal óptima

Para determinar la tensión basal óptima de los segmentos venosos se realizaron una serie de análisis preliminares. El tornillo micrométrico unido al transductor de fuerza fue separando progresivamente los alambres hasta obtener tensiones pasivas entre 1 y 5 g. Se registró la contracción inducida por KCl (60 mM) en este rango de valores de tensión y la mayor respuesta contráctil se obtuvo a 3 g, considerándose este valor la tensión óptima de reposo para la vena safena interna. La tensión se fue reajustando regularmente hasta alcanzar una tensión basal estable que se mantuvo durante un período de acomodación de 2 horas antes de iniciar el experimento.

4.3 Curvas concentración-respuesta

Una vez alcanzada la tensión basal óptima, se fueron realizando las curvas concentración-respuesta de forma acumulativa, entendiendo

que la concentración de una determinada sustancia en el baño de órganos es la resultante de la suma de la última dosis aplicada a las administradas previamente. El incremento de concentración se llevó a cabo cuando la dosis anterior había alcanzado su efecto máximo.

4.3.1 Curvas de ranolazina

4.3.1.1 Agonistas contráctiles

Para evaluar la correlación entre la relajación inducida por ranolazina y el agonista contráctil utilizado, se realizaron curvas concentración-respuesta de ranolazina (10^{-9} a 10^{-4} M) en segmentos venosos diferentes precontraídos con:

- KCl (60 mM).
- ET-1 (10^{-7} M).
- Fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M).
- Vasopresina (10^{-7} M).
- Análogo de TXA₂ U 46619 (10^{-7} M).

4.3.1.2 L-NAME e indometacina

Para evaluar la participación del endotelio en la respuesta a la ranolazina, se realizaron curvas de ranolazina (10^{-9} a 10^{-4} M) en segmentos con y sin endotelio previamente contraídos con fenilefrina (a concentraciones a las cuales se alcanza una contracción entre el 60 y el 70% de la respuesta máxima al KCl 60 mM).

Para evaluar la participación de factores prostanoideos y del NO en la respuesta relajante a la ranolazina, se realizaron experimentos en

segmentos previamente contraídos con fenilefrina en ausencia (grupo control) y en presencia de los siguientes inhibidores:

- Indometacina (10^{-5} M) para inhibir la síntesis de prostaglandinas (PGI_2).
- L-NAME (10^{-4} M) con la finalidad de inhibir la producción de NO por la NOS.

4.3.1.3 Inhibidores de KCa

Para evaluar la participación de los canales KCa se realizaron curvas concentración-respuesta de ranolazina (10^{-9} a 10^{-4} M) en presencia de indometacina (10^{-5} M) y L-NAME (10^{-4} M) (grupo control) combinados con diferentes inhibidores:

- Tetraetilamonio (TEA, 10^{-3} M), un inhibidor inespecífico de los canales KCa.
- Apamina (10^{-6} M), un inhibidor de los canales KCa de baja conductancia.
- TRAM-34 (10^{-6} M), un inhibidor de los canales KCa de conductancia intermedia.
- Caribdotoxina (10^{-7} M), un inhibidor de los canales KCa de intermedia y alta conductancia.

4.3.1.4 Verapamilo

Para evaluar la participación de los ICaL se realizaron curvas concentración-respuesta de ranolazina (10^{-9} a 10^{-4} M) en presencia de indometacina (10^{-5} M) y L-NAME (10^{-4} M) combinados con verapamilo (10^{-6} M).

4.3.2 Curvas de fenilefrina

Para estudiar los efectos de la ranolazina sobre la contracción adrenérgica exógena, en primer lugar, se realizaron curvas concentración-respuesta de fenilefrina (10^{-9} - 10^{-3} M) en ausencia (grupo control) y en presencia de diferentes concentraciones de ranolazina (10^{-6} - 10^{-4} M).

4.3.2.1 *L-NAME e indometacina*

En segundo lugar, se realizaron curvas concentración-respuesta de fenilefrina en presencia de ranolazina (10^{-5} M) asociada con indometacina (10^{-5} M) y L-NAME (10^{-4} M) para evaluar la participación de la PGI₂ y el NO respectivamente.

4.3.2.2 *Inhibidores de KCa*

Y en tercer lugar, para evaluar específicamente la participación de los canales KCa, las muestras fueron incubadas en las siguientes condiciones experimentales:

- Ranolazina (10^{-5} M) + Indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M) + TEA (10^{-3} M).
- Ranolazina (10^{-5} M) + Indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M) + Apamina (10^{-6} M).
- Ranolazina (10^{-5} M) + Indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M) + TRAM-34 (10^{-6} M).
- Ranolazina (10^{-5} M) + Indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M) + Caribdotoxina (10^{-7} M).

Todas las curvas en presencia de inhibidores se realizaron tras un período de incubación de 20 minutos.

4.4 Curvas frecuencia-respuesta

Para realizar las curvas frecuencia-respuesta se utilizó un estimulador Grass S88 (Grass Instruments, Quincy, EEUU) que consta de dos electrodos de platino separados entre ellos a 5 mm de distancia y colocados a ambos lados y paralelamente al eje de los anillos venosos (Figura 10). Las curvas frecuencia-respuesta se determinaron en un rango de frecuencias comprendido entre 2 y 4 Hz aplicando estímulos de 15 V de 0.2 ms de duración durante un tren de pulsos de 15 segundos. Se respetaron períodos de 10 minutos de reposo entre estimulaciones.

Para evaluar la acción de la ranolazina sobre la respuesta vasoconstrictora adrenérgica endógena tras el estímulo eléctrico, inicialmente se realizaron curvas frecuencia-respuesta en ausencia (grupo control) y presencia de ranolazina (10^{-6} - 10^{-4} M). Seguidamente, se realizaron curvas frecuencia-respuesta adicionales en presencia de diferentes inhibidores aislados y en combinación con ranolazina (10^{-5}).

- Indometacina (10^{-5} M).
- L-NAME (10^{-4} M)
- Indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M)
- Indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M) + Apamina (10^{-6} M).
- Indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M) + TRAM-34 (10^{-6} M).

- Indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M) + Caribdotoxina (10^{-7} M).

Las curvas se realizaron en el mismo segmento venoso inicialmente en condiciones control y a continuación tras la incubación durante 20 minutos con los distintos inhibidores.

5. Fármacos y soluciones

Cloruro de bradiquinina, clorhidrato de NA, ET-1, fenilefrina, vasopresina, análogo de TXA₂ U 46619, indometacina, L-NAME, TEA, caribdotoxina, apamina, TRAM-34, verapamilo y KCl. Todas las sustancias y reactivos fueron distribuidos por Sigma Aldrich (St Louis, MO, EEUU), excepto el KCl distribuido por Panreac. Las soluciones concentradas de los fármacos utilizados en los experimentos se realizaron con agua bidestilada, excepto la indometacina que se disolvió en etanol y bicarbonato sódico (150 mM) ajustado a un pH 7,4 con HCl. La concentración final de etanol en el baño fue inferior al 0,01%. Las diluciones de los fármacos utilizados en el baño de órganos se prepararon diariamente en una solución salina estándar (NaCl 0.9%).

6. Determinación de la expresión proteica por Western Blot

Los segmentos venosos destinados al análisis de la expresión proteica se incubaron durante 20 minutos en el baño de órganos en condiciones de control (solución de Krebs-Henseleit modificada equilibrada con una mezcla gaseosa [95% O₂ y 5% CO₂] a 37 °C) y en

presencia de ranolazina (10^{-5} M). A continuación, fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -80°C hasta ser procesadas. Para la extracción y cuantificación de proteínas, se realizó la homogeneización del tejido vascular en un tampón de lisis (Tris HCl 0.125 M, pH 6.8, SDS al 2%, glicerol al 19% e inhibidores de proteasa al 1% v/v) y después se centrifugó a 12.000 g (fuerza centrífuga relativa o fuerza g) a 4°C durante 15 minutos para separar el componente proteico. La concentración de proteínas totales se determinó por el método del ácido bicinonínico (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, EEUU). Una vez obtenida la concentración de proteínas de cada muestra, se añadió mercaptoetanol al 0,5% (v/v) y azul de bromofenol al 1% y se calentaron a 90°C durante 5 min. Seguidamente, 20 μg de proteína de cada muestra se separaron por electroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) en un gel de poliacrilamida aplicando un voltaje constante de 140 V durante aproximadamente una hora. Después, se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU) prehumedecida con metanol utilizando un tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol al 20%) y aplicando un voltaje constante de 40 V durante 1 hora. Para realizar la inmunodetección, estas membranas fueron bloqueadas en albúmina al 5% en TBS-Tween 20 (Tris-Cl 20mM, NaCl 150mM, Tween-20 0.1%, pH 7.5) durante una hora y, posteriormente, fueron incubadas con anticuerpos específicos. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C e incluían: el anticuerpo policlonal adrenérgico $\alpha 1\text{A}$ (1:500, n° de catálogo NB100 78585, Novusbio, Madrid, España), el anticuerpo

policlonal eNOS (1:500, n° de catálogo Bs-0163R, Biossusa, EEUU) y el anticuerpo policlonal Maxi canal de potasio alfa (BKCa, 1:500, n° de catálogo ab3586; Abcam, Reino Unido). Los anticuerpos secundarios empleados fueron los siguientes: el anticuerpo anti-IgG de conejo (1:1000, n° de catálogo 7074, Cell Signaling Technology, Leiden, Países Bajos) y el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H+L) (1:10.000, n° de catálogo 31430, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), ambos ligados a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Estos últimos fueron incubados a temperatura ambiente durante una hora tras haber lavado las membranas con tampón de lavado TBS con Tween (3 lavados de 5 minutos). Una vez completada la incubación, las membranas fueron lavadas por última vez y se llevó a cabo la detección de los anticuerpos ligados a HRP mediante el método de quimioluminiscencia mejorada (ECL Kit, Amersham Biosciences, Barcelona, España). La señal de las bandas de autorradiografía correspondientes se analizó por densitometría con el software ImageJ (NIH Image, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EEUU). El anticuerpo monoclonal primario α tubulina (B7) (1:1000, n° de catálogo Sc 5286, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) se utilizó como control para determinar la cantidad de proteínas.

7. Análisis estadístico

Todas las variables fueron evaluadas mediante un análisis descriptivo. Las variables continuas se expresaron en media \pm DE (desviación estándar) y las variables categóricas con medidas de frecuencia absoluta (n) y relativa (porcentajes). Para los experimentos

en baño de órganos los valores se expresaron como media \pm EEM (error estándar de la media) y para el Western Blot como media \pm DE (desviación estándar).

La respuesta contráctil se expresó como un porcentaje de la respuesta producida por KCl 60 mM. Se calcularon los valores de EC50 (concentración de agonista que produce la mitad del efecto máximo) para cada curva concentración-respuesta y se tomaron como parámetros representativos de las curvas en las diferentes condiciones experimentales el efecto máximo (Emax) y el pD2 (-log EC50). La respuesta relajante se representó como el porcentaje de inhibición producido sobre la respuesta inducida por los agonistas contráctiles.

Se comprobó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk. Para comparar los resultados obtenidos en los grupos de experimentos cuyas variables presentaban una distribución normal se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía mientras que para comparar los grupos con distribución no normal se utilizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. Para comparaciones múltiples se empleó la prueba de Bonferroni post hoc. La comparación de las curvas de concentración-respuesta se efectuó sobre los parámetros Emax y pD2 (-log EC50) aplicando ANOVA de dos vías. Para los experimentos con estimulación eléctrica y para el análisis Western blot, en los que se utilizaron los mismos segmentos venosos en condiciones de control y experimentales, se utilizó la prueba *t* de Student pareada. El nivel de significación aceptado fue del 5%, es decir, $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 8.3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU).

RESULTADOS

1. Efectos de la ranolazina sobre la respuesta relajante

1.1. En presencia de agonistas contráctiles

En las curvas concentración-respuesta de ranolazina en anillos precontraídos con diferentes agonistas vasoactivos se observó una relajación dependiente de la concentración únicamente en los anillos precontraídos con fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M) (Figura 13).

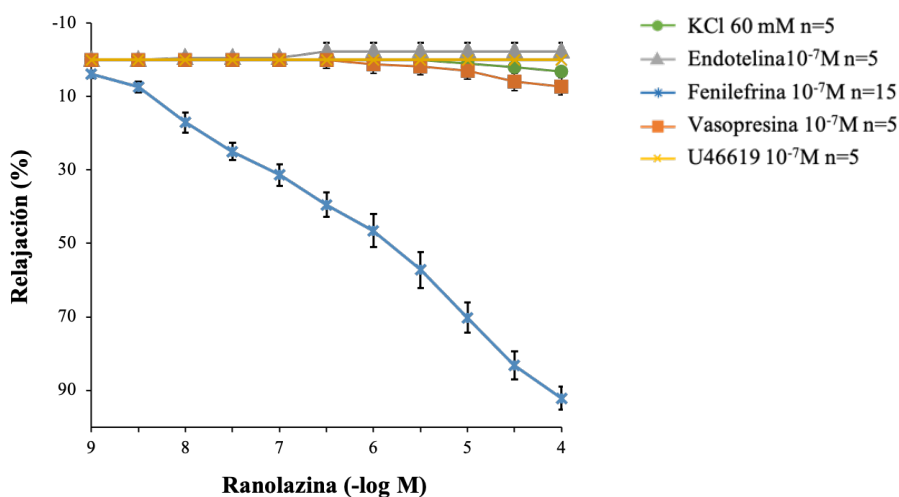


Figura 13. Curvas concentración-respuesta de ranolazina en segmentos venosos precontraídos con diferentes agonistas contráctiles. Valores expresados como media \pm EEM.

Además, en estos segmentos venosos la eliminación mecánica del endotelio redujo significativamente los efectos relajantes producidos por la ranolazina ($pD_2 = 6,55 \pm 0,26$ frente a $5,56 \pm 0,22$, para anillos con y sin endotelio respectivamente, $p = 0,01$) (Tabla 4).

1.2 En presencia de indometacina y L-NAME

Respecto a los experimentos realizados en presencia de inhibidores, la indometacina (10^{-5} M) no afectó a la relajación inducida por la ranolazina mientras que L-NAME (10^{-4} M) redujo la relajación inducida por el fármaco en anillos con endotelio ($pD_2 = 6,55 \pm 0,26$ frente a $5,78 \pm 0,18$, para anillos en presencia de L-NAME y grupo control respectivamente, $p < 0,05$), sugiriendo la participación, al menos parcial, del NO en el efecto relajante provocado por la ranolazina (Figura 14, Tabla 4).

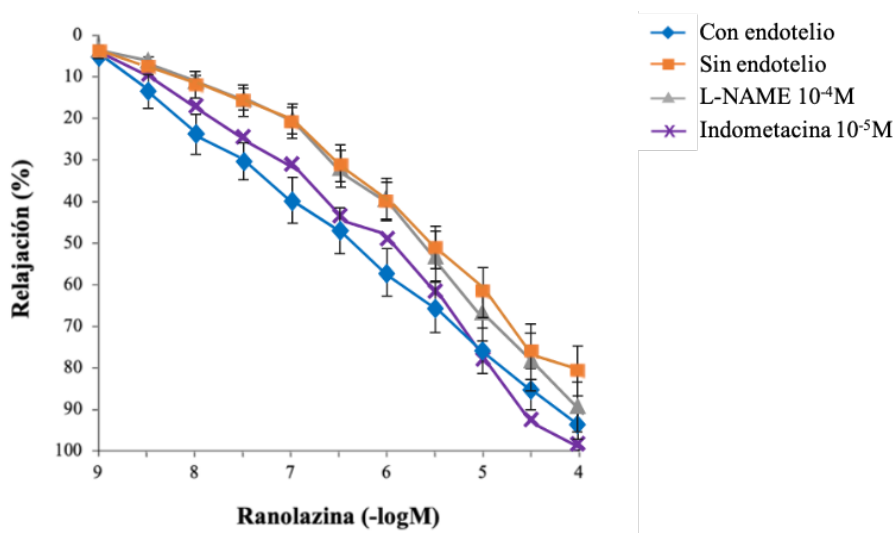


Figura 14. Curvas concentración-respuesta de ranolazina en segmentos venosos con, sin endotelio y en presencia de L-NAME (10^{-4} M) e indometacina (10^{-5} M). Valores expresados como media \pm EEM.

Tabla 4. Valores de pD_2 y E_{max} para ranolazina en segmentos de vena safena precontraídos con fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M).

Ranolazina	n	pD_2	E_{max}
Con endotelio (control)	15	6.55±0.26	94±2
Sin endotelio	13	5.56±0.22*	80±7
L-NAME 10^{-4} M	10	5.78±0.18*	90±4
Indometacina 10^{-5} M	5	6.10±0.40	99±1

n: número de pacientes; **pD_2 :** $-\log EC_{50}$; **E_{max} :** efecto máximo. *Los datos se muestran como media ± EEM. E_{max} se expresa como un porcentaje de respuesta a KCl 60 mM. * $p < 0,05$ vs control.*

1.3 En presencia de inhibidores de los KCa

En los segmentos de vena safena tratados con ranolazina e incubados con indometacina y L-NAME asociados a otros inhibidores adicionales, se evidenció que la relajación dependiente del endotelio se redujo aún más con TEA (10^{-3} M) y caribdotoxina (10^{-7} M). Sin embargo, no se observaron cambios significativos con TRAM-34 (10^{-6} M) y apamina (10^{-6} M) (Figura 15). Por tanto, cabe interpretar que los canales de KCa de alta conductancia contribuyen significativamente a la respuesta relajante a la ranolazina. La Tabla 5 recoge los valores de pD_2 y E_{max} en las diferentes condiciones experimentales.

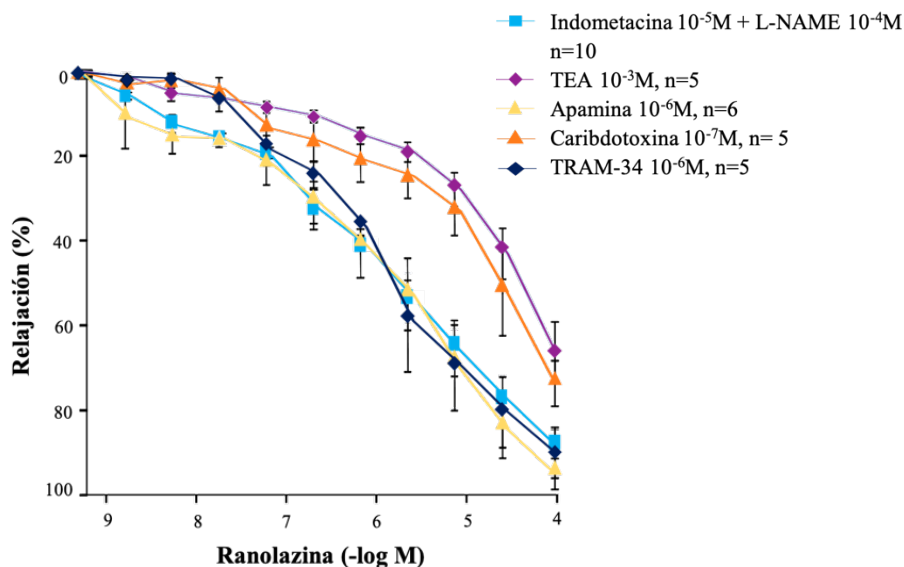


Figura 15. Curvas concentración-respuesta de ranolazina en segmentos venosos en condiciones de control (indometacina 10^{-5} M más L-NAME 10^{-4} M) y en presencia de TEA (10^{-3} M), apamina (10^{-6} M), caribdotoxina (10^{-7} M) y TRAM-34 (10^{-6} M). Valores expresados como media \pm EEM.

Tabla 5. Valores de pD_2 y E_{max} para ranolazina en segmentos de vena safena pre-contráidos con fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M).

Ranolazina	n	pD_2	E_{max}
Con endotelio (control)	15	6.55 ± 0.26	94 ± 2
Indometacina 10^{-5} M+L-NAME 10^{-4} M	10	$5.88 \pm 0.17^*$	88 ± 4
Indometacina 10^{-5} M+L-NAME 10^{-4} M+TEA 10^{-3} M	5	$4.89 \pm 0.11^{*‡}$	$66 \pm 7^{*‡}$
Indometacina 10^{-5} M+L-NAME 10^{-4} M+Apamina 10^{-6} M	6	5.60 ± 0.18	85 ± 8
Indometacina 10^{-5} M+L-NAME 10^{-4} M+TRAM 34 10^{-6} M	5	5.84 ± 0.08	89 ± 6
Indometacina 10^{-5} M+L-NAME 10^{-4} M+Caribdotoxina 10^{-7} M	5	$5.22 \pm 0.43^*$	$73 \pm 5^{*‡}$

n: número de pacientes; **pD_2 :** $-\log EC_{50}$; **E_{max} :** efecto máximo. Los datos se muestran como media \pm EEM. E_{max} se expresa como un porcentaje de respuesta a KCl 60 mM. * $p < 0,05$ vs control, ‡ $p < 0,05$ vs indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M).

1.4 En presencia de verapamilo

En la serie de experimentos realizados con verapamilo (10^{-6} M), la curva de relajación de la ranolazina (10^{-9} - 10^{-4} M) se desplazó hacia la derecha (Figura 16), disminuyendo el valor de pD_2 (de $6,55 \pm 0,26$ a $5,40 \pm 0,35$; $p = 0,02$) y sin cambios en el efecto máximo ($E_{max} = 94 \pm 2$ vs 93 ± 4 para control y verapamilo, respectivamente, $p = 0,68$) (Tabla 6). Se deduce, por tanto, que la relajación inducida por la ranolazina se debe en cierta medida a la participación de los canales ICaL.

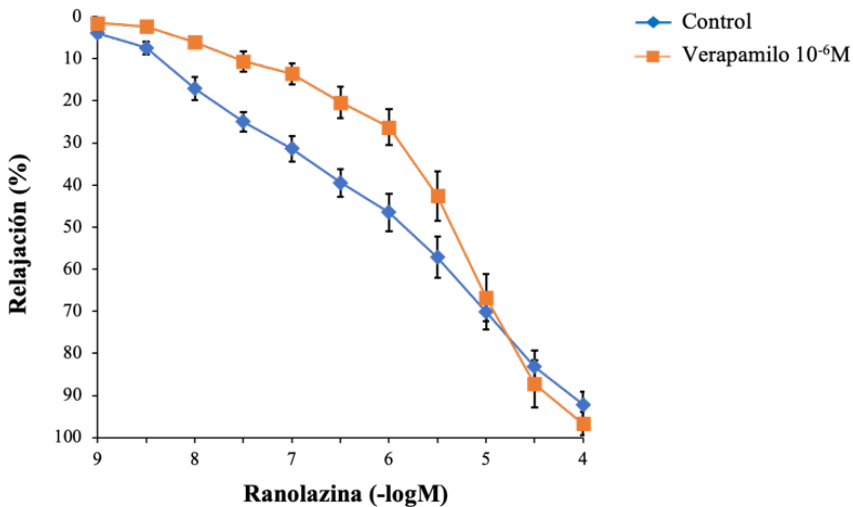


Figura 16. Curvas concentración-respuesta de ranolazina en segmentos venosos en presencia de verapamilo. *Valores expresados como media \pm EEM.*

Tabla 6. Valores de pD_2 y E_{max} para ranolazina en segmentos de vena safena precontraídos con fenilefrina (10^{-7} - 10^{-6} M).

Ranolazina	n	pD_2	E_{max}
Con endotelio (control)	15	6.55 ± 0.26	94 ± 2
Verapamilo 10^{-6} M	9	$5.40 \pm 0.35^*$	93 ± 4

n: número de pacientes; pD_2 : $-\log EC_{50}$; E_{max} : efecto máximo. Los datos se muestran como media \pm EEM. E_{max} se expresa como un porcentaje de respuesta a KCl 60 mM. * $p < 0,05$ vs control.

2 Efectos de la ranolazina sobre las respuestas inducidas por fenilefrina

La ranolazina (10^{-5} - 10^{-4} M) disminuyó las contracciones inducidas por fenilefrina en los segmentos venosos de manera dependiente de la concentración (Figura 17 y Tabla 7).

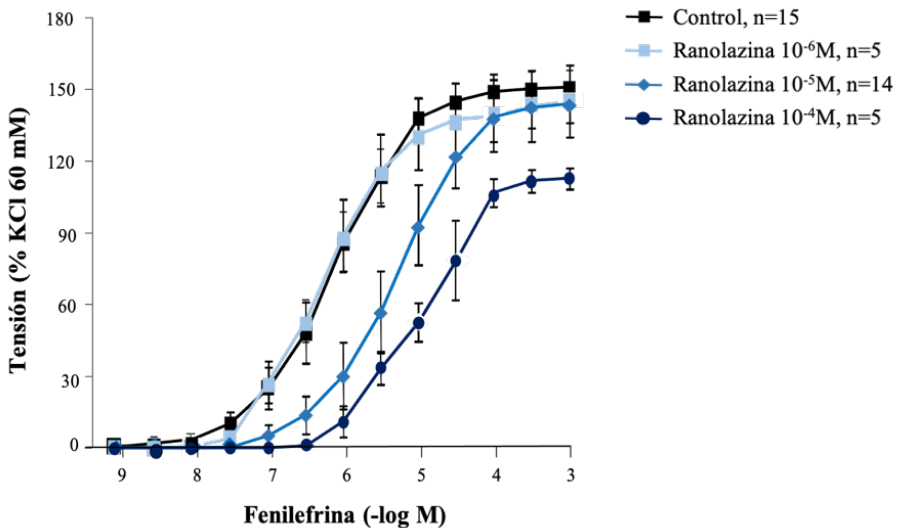


Figura 17. Curvas concentración-respuesta de fenilefrina en ausencia (control) y presencia de diferentes concentraciones de ranolazina (10^{-6} - 10^{-4} M). Valores expresados como media \pm EEM.

En presencia de ranolazina (10^{-5} M), el efecto relajante se mantuvo tras la adición de indometacina (10^{-5} M) y L-NAME (10^{-4} M) (Figura 18).

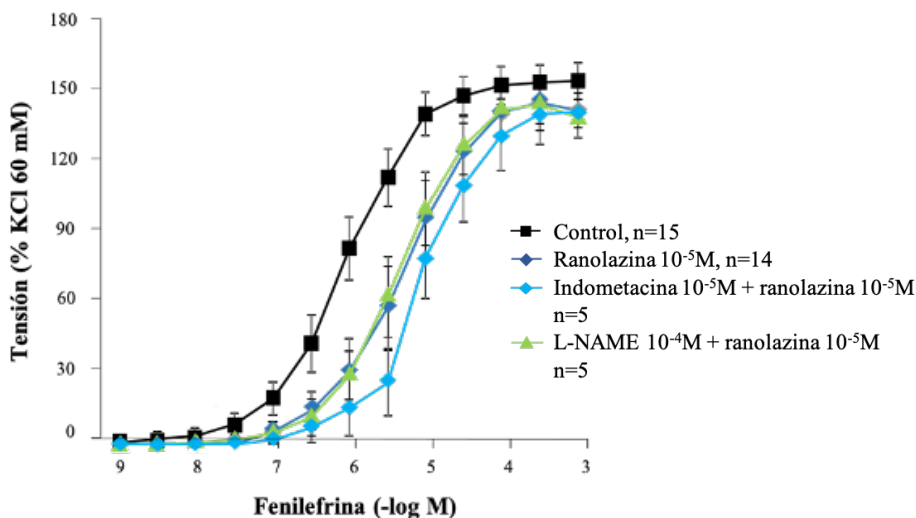


Figura 18. Curvas concentración-respuesta de fenilefrina en presencia de ranolazina (10^{-5} M) sola y asociada a indometacina (10^{-5} M) o L-NAME (10^{-4} M). Valores expresados como media \pm EEM.

La acción relajante de la ranolazina no varió en presencia de apamina (10^{-6} M) y TRAM-34 (10^{-6} M) mientras que la incubación con TEA (10^{-3} M) y caribdotoxina (10^{-7} M) redujo significativamente sus efectos (Figura 19) sugiriendo la participación de los canales de KCa de alta conductancia en el efecto de la ranolazina sobre la respuesta contráctil inducida por fenilefrina.

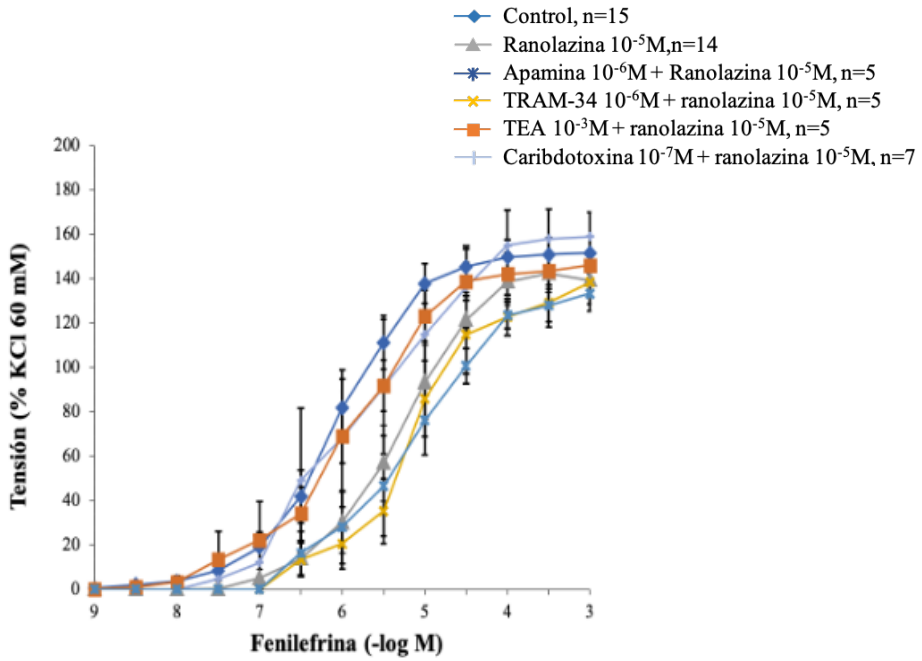


Figura 19. Curvas concentración-respuesta de fenilefrina en presencia de ranolazina (10^{-5} M) y ranolazina (10^{-5} M) en combinación con Apamina (10^{-6} M), TRAM-34 (10^{-6} M), TEA (10^{-3} M) y caribdotoxina (10^{-7} M). Valores expresados como media \pm EEM.

Tabla 7. Valores de pD_2 y E_{max} para fenilefrina en segmentos de vena safena humana en condiciones control y experimentales.

Fenilefrina	n	pD_2	E_{max}
Control	15	6.03±0.13	152±8
Ranolazina 10 ⁻⁶ M	5	6.22±0.11	146±10
Ranolazina 10 ⁻⁵ M	14	5.31±0.23*	139±7
Ranolazina 10 ⁻⁴ M	5	5.17±0.26*	110±4*
Ranolazina 10 ⁻⁵ M + indometacina 10 ⁻⁵ M	5	4.93±0.20	139±11
Ranolazina 10 ⁻⁵ M + L-NAME 10 ⁻⁴ M	5	5.34±0.20	138±2
Ranolazina 10 ⁻⁵ M + TEA 10 ⁻³ M	5	5.74±0.09	146±4
Ranolazina 10 ⁻⁵ M + Apamina 10 ⁻⁶ M	5	5.35±0.39	133±5
Ranolazina 10 ⁻⁵ M + TRAM-34 10 ⁻⁶ M	5	5.23±0.24	138±13
Ranolazina 10 ⁻⁵ M + Caribdotoxina 10 ⁻⁷ M	7	5.61±0.23	159±11

n: número de pacientes; **pD_2 :** $-\log EC_{50}$; **E_{max} :** efecto máximo. *Los datos se muestran como media ± EEM. E_{max} se expresa como un porcentaje de respuesta a KCl 60 mM. * $p < 0,05$ vs control*

3 Efectos de la ranolazina sobre las respuestas inducidas por estimulación eléctrica

Las contracciones adrenérgicas endógenas inducidas por estimulación del campo eléctrico fueron reducidas por la ranolazina (10⁻⁶-10⁻⁵ M) de manera dependiente de la concentración (Figura 20).

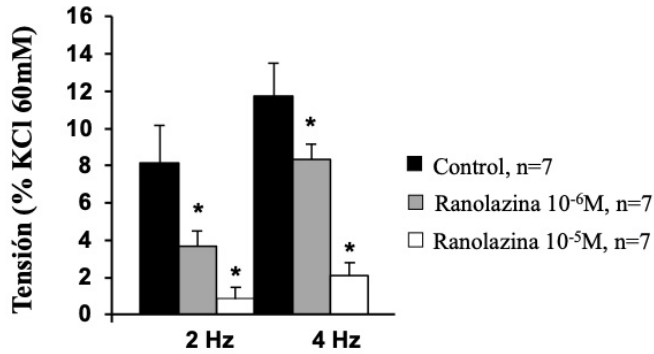


Figura 20. Respuesta contráctil a la estimulación del campo eléctrico a 2 y 4 Hz en condiciones de control y en presencia de ranolazina (10^{-6} - 10^{-5} M). $n = 7$ para cada grupo experimental. Valores expresados como media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control.

Se realizaron curvas frecuencia-respuesta tras la incubación con indometacina (10^{-5} M) y L-NAME (10^{-4} M) sin observarse cambios en los efectos inhibitorios de la ranolazina sobre la contracción neurogénica (Figura 21).

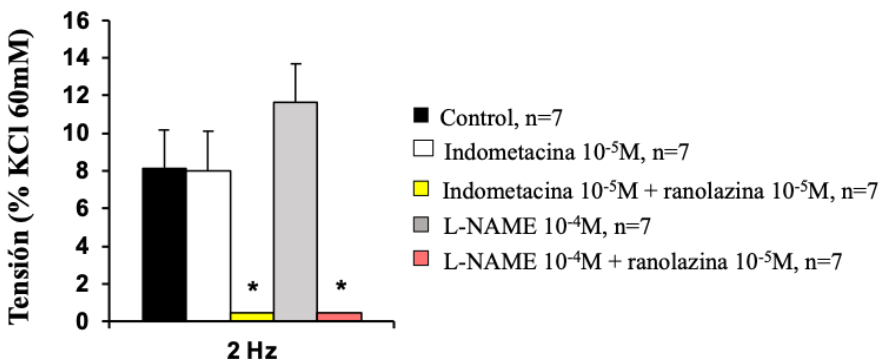


Figura 21. Respuesta contráctil a la estimulación del campo eléctrico (2 Hz) en condiciones de control y en presencia de indometacina (10^{-5} M) y L-NAME (10^{-4} M) solos y en combinación con ranolazina (10^{-5} M). $n = 7$ para cada grupo experimental. Valores expresados como media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control.

La apamina (10^{-6} M) y el TRAM-34 (10^{-6} M) tampoco modificaron sus efectos. No obstante, la caribdotoxina (10^{-7} M) evitó los efectos inhibidores de la ranolazina y produjo un aumento de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico (Figura 22). La ranolazina (10^{-4} M) eliminó la respuesta contráctil tanto en ausencia como en presencia de inhibidores.

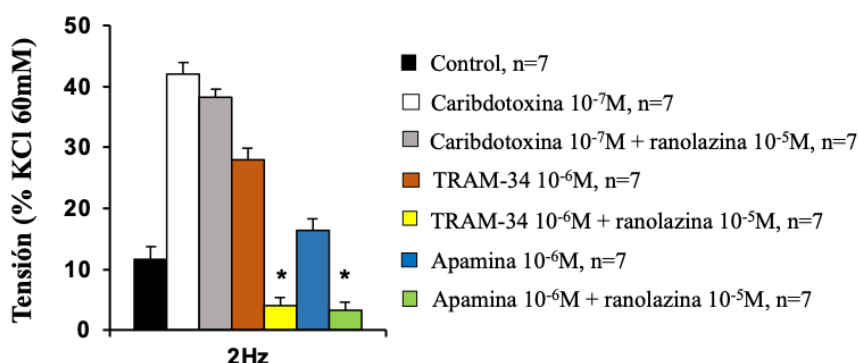


Figura 22. Respuesta contráctil a la estimulación del campo eléctrico (2 Hz) en condiciones de control y en presencia de diferentes inhibidores [caribdotoxina (10^{-7} M), TRAM-34 (10^{-6} M) y apamina (10^{-6} M)] solos o asociados a ranolazina (10^{-5} M). $n = 7$ para cada grupo experimental. Valores expresados como media \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control.

4 Efectos de la ranolazina sobre expresión proteica de la eNOS, el receptor adrenérgico $\alpha 1$ y la proteína del canal BKCa

La ranolazina aumentó la expresión de la proteína del canal de KCa de alta conductancia ($p = 0.02$, $n = 4$), disminuyó significativamente la expresión del receptor adrenérgico $\alpha 1$ ($p = 0.02$,

$n = 4$) y no modificó la expresión de la eNOS ($p = 0.7$, $n = 4$) (Figura 23).

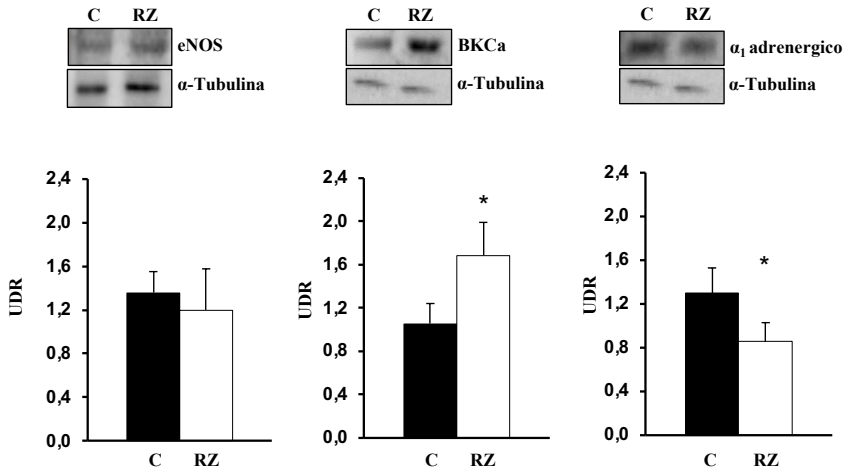


Figura 23. Efecto de la ranolazina (10^{-5} M) sobre la expresión proteica de la eNOS, el canal BKCa y el receptor adrenérgico α_1 . **C:** control; **RZ:** ranolazina; **eNOS:** óxido nítrico sintasa endotelial; **BKCa:** canal de potasio activado por calcio de alta conductancia; **UDR:** unidades densitométricas relativas. *Valores expresados como media \pm DE para experimentos independientes.* * $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

1. Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental

Los experimentos en baño de órganos son considerados una herramienta farmacológica muy útil y ampliamente utilizada en estudios preclínicos. Asociados a un sistema de registro de la tensión isométrica, permiten evaluar la respuesta de diferentes tejidos con capacidad contráctil siendo su aplicación más común estudiar la reactividad vascular. A diferencia de los estudios moleculares, los sistemas de baño de órganos permiten controlar los parámetros del estudio, analizar varias muestras en paralelo y obtener resultados en tiempo real. Además, el análisis de vasos aislados *in vitro* permite eliminar la influencia de los factores hormonales, neurohumorales y celulares que actuarían *in vivo*. Esto, a su vez, representa una ventaja y un inconveniente ya que, por un lado, permite identificar de forma directa los mecanismos metabólicos a través de los que actúa una determinada sustancia evitando factores de confusión que podrían sesgar los resultados obtenidos; pero, por otro lado, limita la extrapolación de los resultados obtenidos al entorno clínico. Por este motivo, es importante subrayar que el objeto de esta tesis es una investigación básica cuyos aspectos metodológicos se encuentran bastante alejados de la práctica clínica habitual. Así pues, su objetivo principal es estudiar los mecanismos vasculares que intervienen en la respuesta a la ranolazina en la vena safena humana y establecer las bases para futuros ensayos clínicos.

2. Justificación de la elección del vaso a estudio

La ranolazina ejerce un efecto vasodilatador en las arterias coronarias de los pacientes con cardiopatía isquémica mejorando el flujo sanguíneo del miocardio (6,103). La evidencia sobre su acción relajante en los vasos coronarios ha despertado el interés por estudiar sus efectos vasculares a nivel periférico.

A nivel experimental, se ha postulado que uno de los posibles mecanismos por los cuales la ranolazina podría reducir los efectos deletéreos asociados a la isquemia sería la mejora de la vasodilatación dependiente del endotelio (103,133). Adicionalmente, varios estudios en animales han evidenciado que también mejora la vasodilatación independiente del endotelio, disminuye el tono adrenérgico y modula el estado contráctil del músculo liso vascular (131,134). Se ha observado que la respuesta vascular a un mismo estímulo difiere entre distintos lechos vasculares y también entre especies. Uno de los primeros estudios llevados a cabo en este aspecto fue el de Nieminen *et al* (131), que analizó si la administración intracoronaria o intrafemoral directa de ranolazina en cerdos anestesiados producía vasodilatación local. Se observó un aumento en el flujo y una reducción de la resistencia vascular en ambos lechos sin asociar cambios en la frecuencia cardíaca ni en la presión arterial. El efecto vasodilatador fue atribuido principalmente al bloqueo adrenérgico α_1 ya que el tratamiento previo con prazosina (antagonista α_1 adrenérgico) eliminó estos efectos. Pese a que dichos hallazgos fueron alentadores, en un estudio similar realizado en perros (132) en los que la ranolazina se administró de forma sistémica, el aumento del flujo coronario fue

transitorio y no se apreciaron cambios significativos a nivel periférico en el lecho vascular femoral lo que conduce a pensar que dicho efecto probablemente se obtuviera como consecuencia de la elevada concentración local lograda con la administración intraarterial.

A nivel molecular, se ha evidenciado en varios estudios *in vitro* realizados con aorta de conejo (140), arterias intrarrenales (134) y aorta de rata (135) que la ranolazina se comporta como un antagonista de los receptores adrenérgicos α_1 y, parcialmente, de los ICaL. Además, este último estudio con aorta de rata, aportó nuevos datos sobre la posible implicación de los canales sodio dependientes de voltaje en los efectos vasorrelajantes del fármaco. También se ha obtenido evidencia a favor de que la vasodilatación inducida por ranolazina actúe a través de mecanismos endoteliales como la EDH (134) o el NO (133).

En el ser humano se han realizado estudios en diferentes lechos vasculares evaluando los efectos de la ranolazina. Lamendola *et al* cuantificaron su efecto de forma indirecta sobre el lecho braquial humano midiendo la dilatación mediada por el flujo a través de ultrasonografía (136), mientras que Virsolvy *et al* lo hicieron de forma directa sobre segmentos de arteria uterina humana mediante un experimento en baño de órganos (135). Sin embargo, la respuesta estrictamente vascular ha sido poco estudiada. En nuestro trabajo elegimos la vena safena interna humana porque continúa siendo el injerto más empleado en cirugía de revascularización miocárdica en todo el mundo. Su extracción se realiza en los pacientes que van a ser sometidos a cirugía coronaria y que representan un porcentaje bastante elevado dentro de los pacientes intervenidos de cirugía cardiovascular,

es relativamente sencilla y no entraña un riesgo adicional significativo ya que su longitud generalmente permite obtener un segmento sobrante al final del procedimiento. Además, la integridad de este injerto venoso condiciona el pronóstico de muchos pacientes por lo que los datos obtenidos sobre su comportamiento pueden arrojar mucha información sobre cómo mejorar su permeabilidad a largo plazo.

Existen varias limitaciones a tener en cuenta a la hora de interpretar las conclusiones de nuestro trabajo. En primer lugar, es importante recalcar que los resultados observados en la vena safena no reflejan necesariamente lo que pueda ocurrir en otros vasos sanguíneos del organismo. En segundo lugar, se debe tener en cuenta que por muy cuidadosa que sea la técnica quirúrgica, la manipulación de la vena safena durante su extracción puede producir cierto grado de daño en el endotelio, si bien, la mayoría de ocasiones, éste no llega a ser significativo. En tercer lugar, es importante considerar que los pacientes sometidos a cirugía coronaria son enfermos en los que generalmente coexisten varias patologías cardiovasculares (diabetes, hipertensión arterial, dislipemia, tabaquismo, etc.) y, por consiguiente, es probable que sufran en cierta medida disfunción endotelial y alteración de la homeostasis vascular en la mayoría de sus vasos.

3. Efectos de la ranolazina sobre la respuesta vascular de la vena safena humana

La evaluación de los efectos de la ranolazina sobre la respuesta contráctil de la vena safena humana inducida por diferentes agonistas, indica que la ranolazina produce relajación en los anillos previamente

contraídos con fenilefrina, pero no con KCl, vasopresina, endotelina-1 o análogo del tromboxano A₂. La fenilefrina produce contracción por su unión con los receptores adrenérgicos α_1 por lo que, en este contexto, el efecto relajante de la ranolazina podría explicarse por la inhibición de estos receptores. De hecho, en ensayos previos sobre distintos lechos vasculares (134,140) se ha descrito que la ranolazina antagonizaba la vasoconstricción inducida por metoxamina, un agonista selectivo del receptor adrenérgico α_1 , pero no por KCl sugiriendo una acción antagonista directa sobre estos receptores (141). En otro estudio realizado con segmentos de arteria uterina humana, la ranolazina (20 μ M) disminuyó la respuesta contráctil tras la administración de fenilefrina y desplazó la curva dosis-respuesta significativamente hacia la derecha, lo cual es compatible con un antagonismo competitivo con el receptor adrenérgico α_1 (135). Por lo tanto, nuestros resultados vienen a corroborar que la ranolazina produce un bloqueo de los receptores adrenérgicos α_1 en la vena safena humana.

Otro posible mecanismo que no podemos descartar es que la ranolazina actúe a nivel de las terminaciones nerviosas simpáticas perivasculares produciendo un bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje, cuyo efecto se traduciría en la disminución de la liberación de neurotransmisor a nivel presináptico y, por tanto, en la disminución de la activación de los receptores adrenérgicos α_1 postsinápticos (142). Estos canales han sido identificados en las células endoteliales microvasculares cardíacas, donde se ha descrito que modulan la respuesta del endotelio al *shear stress* (143); en los miocitos vasculares, donde promueven la contracción (135,141); y en las

terminaciones nerviosas perivasculares, donde inhiben la liberación de catecolaminas endógenas (135,142). La entrada de sodio a través de estos canales en las células de músculo liso vascular desencadena la entrada de calcio a través del modo inverso del intercambiador sodio-calcio promoviendo la contracción (135,141). Este efecto sobre el flujo de entrada de sodio y la homeostasis del calcio en los miocitos vasculares es muy similar al de los cardiomiocitos (100). En las terminaciones nerviosas simpáticas perivasculares la inhibición de los canales de sodio dependientes de voltaje produce un bloqueo en la liberación de catecolaminas endógenas y, por lo tanto, de la activación de los adrenorreceptores α_1 (135,142).

4. Efectos de la ranolazina sobre la respuesta adrenérgica

En nuestro estudio, la ranolazina a concentraciones equivalentes a las dosis terapéuticas (2-8 μM) disminuye tanto la contracción neurógena inducida por el estímulo eléctrico como la inducida por fenilefrina. En estudios previos en nuestro laboratorio, hemos demostrado que la contracción neurógena debida al estímulo eléctrico periarterial está mediada mayoritariamente por la liberación de neurotransmisor adrenérgico que, a su vez, activa los adrenorreceptores α_1 (144). Esta afirmación está basada en la evidencia de que la respuesta al estímulo eléctrico es inhibida por guanetidina, un bloqueante de la transmisión simpática; tetrodotoxina, un bloqueante de los canales neuronales de sodio; y por prazosina, un bloqueante de los receptores adrenérgicos α_1 . Dichos resultados indican que los efectos de la ranolazina probablemente tengan lugar durante la

interacción del neurotransmisor con el receptor postsináptico localizado en el músculo liso vascular más que durante la inhibición de la liberación del neurotransmisor desde las vesículas presinápticas. Además, nuestros hallazgos indican que la ranolazina disminuye la expresión proteica de los receptores adrenérgicos α_1 . En conjunto, estos resultados indican que la ranolazina actúa como un simpaticolítico en la vena safena humana y vienen a confirmar los hallazgos de estudios previos en modelos animales (134,135,145).

Evidentemente, estos resultados pueden tener una implicación clínica importante puesto que la vena safena puede sufrir vasoespasmos tras ser interpuesta como injerto en la circulación arterial, y la ranolazina podría limitar la contracción del músculo liso en respuesta a la estimulación adrenérgica contribuyendo así a proteger los injertos venosos cuando el tono adrenérgico está incrementado.

Además de este efecto sobre los receptores adrenérgicos, diversos mecanismos vasodilatadores pueden compensar la respuesta contráctil dependiendo del lecho vascular y del agonista contráctil utilizado. En este sentido, estudios previos en la vena safena humana han demostrado que la administración de vasopresina (146) o del análogo del TXA_2 , U-46619 (147) no induce la liberación de NO. Por tanto, este hecho puede explicar, al menos parcialmente, por qué la ranolazina sólo induce relajación cuando la vena es precontraída con fenilefrina.

Adicionalmente, observamos que la ranolazina disminuyó la contracción inducida por fenilefrina en los segmentos venosos de

manera dependiente de la concentración y que se mantuvo tras al bloqueo de los factores con indometacina y L-NAME.

5. Participación de factores endoteliales en la respuesta a la ranolazina

El papel de la integridad del endotelio en la regulación del tono vascular está ampliamente documentado (57,58,63,148) y puede ser de gran relevancia fisiopatológica en diversas enfermedades (39,136,149). La relajación del músculo liso vascular puede estar causada por la liberación de sustancias vasodilatadoras endoteliales (42). En este sentido, se ha descrito que la ranolazina mejora la relajación dependiente del endotelio en pacientes con y sin factores de riesgo cardiovascular (133,134,136). Además, se ha comprobado en diferentes modelos animales que también mejora la función vascular periférica en diversos lechos (131,134). En nuestro estudio la ranolazina induce relajación vascular dependiente de la concentración tanto en anillos con endotelio como en anillos sin endotelio lo que sugiere que es capaz de mejorar la función vascular incluso en pacientes que presenten disfunción endotelial. Ahora bien, la eliminación mecánica del endotelio disminuye significativamente la respuesta relajante de la ranolazina. Este efecto puede atribuirse a la eliminación de los factores relajantes endoteliales que en condiciones normales se oponen a la vasoconstricción adrenérgica mediada por los receptores α_1 en el músculo liso vascular. Estos resultados en la vena safena humana están en consonancia con estudios previos realizados en arteria cerebral (150) y gastroepiploica humanas (151). En consecuencia, parte del efecto

relajante de la ranolazina podría deberse a la participación de factores endoteliales y parte a un mecanismo independiente del endotelio.

Esta mayor relajación presente en anillos con endotelio intacto, puede estar mediada por la liberación endotelial de prostaglandinas (42). En este sentido, hemos estudiado la participación de derivados del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxygenasa en la modulación de la respuesta a ranolazina. La presencia de indometacina, un inhibidor no selectivo de la ciclooxygenasa, no afecta la respuesta a la ranolazina por lo que parece improbable que la liberación de prostaglandinas juegue un papel importante en la vasodilatación dependiente del endotelio.

La síntesis de NO a partir de la L-arginina por acción de la NOS puede ser bloqueada por diversos análogos de la L-arginina como el L-NAME o el L-NMMA (46,152). Nuestros resultados indican que la incubación con L-NAME, un inhibidor de la NOS, reduce parcialmente la relajación inducida por ranolazina en los vasos con endotelio igualando el efecto relajante que presentan los vasos sin endotelio. Asimismo, estos efectos se producen sin modificaciones de la expresión proteica de la NOS por parte de la ranolazina. Estos resultados sugieren que el NO liberado por las células endoteliales contribuye a la relajación mediada por la ranolazina y coinciden con estudios previos (133) realizados en pacientes con cardiopatía isquémica que habían requerido alguna estrategia de revascularización y que fueron randomizados a recibir tratamiento con ranolazina (1000 mg dos veces al día) o placebo durante 6 semanas. En este caso, se evaluó mediante tonometría arterial periférica el efecto de la ranolazina sobre la

vasodilatación dependiente del endotelio y sobre marcadores sistémicos inflamatorios y de disfunción endotelial. Tras el tratamiento, aumentó la vasodilatación y se observó una tendencia al aumento de los niveles de NO y un descenso significativo en los niveles de ADMA, sugiriendo que las acciones de la ranolazina podían estar mediadas por la vía del ADMA. Conclusiones similares se desprenden de un estudio en ratones (153).

6. Participación de los canales K_{Ca} en la respuesta a la ranolazina

La relajación residual tras la inhibición de la COX y de la NOS se ha atribuido a un mecanismo de hiperpolarización de las células del músculo liso vascular (57,58). Si la hiperpolarización se produce por vía endotelial, requiere de la apertura de los canales K_{Ca} localizados en el endotelio (60) mientras que si la hiperpolarización es independiente del endotelio, se produce tras la apertura de los canales K_{ATP} y de los canales K_{Ca} de alta conductancia (58,62,63). En cualquier caso, la hiperpolarización producida por la salida de potasio provocaría el cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje con la consiguiente disminución del calcio citosólico y relajación del músculo liso (68).

En nuestros resultados, la relajación remanente a la ranolazina tras la inhibición de la COX y de la NOS, se reduce todavía más cuando bloqueamos los canales de potasio. Estudios previos sugieren la participación de una hiperpolarización dependiente del endotelio inducida por ranolazina la cual está estrechamente relacionada con los

canales KCa (60,134). La incubación con caribdotoxina, bloqueante específico de los canales KCa de alta e intermedia conductancia, significativamente disminuye la relajación inducida por ranolazina en anillos con y sin endotelio lo que pone de manifiesto la participación de estos canales en los efectos vasculares de la ranolazina. Puesto que estos efectos se producen tanto en presencia como en ausencia de endotelio, probablemente estos canales KCa de alta conductancia se localicen principalmente en el músculo liso vascular y ejerzan su acción sobre el tono de los vasos a través de un mecanismo independiente del endotelio y por consiguiente pueden ser muy útiles en condiciones asociadas con disfunción endotelial. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado en muestras procedentes del mismo tipo de pacientes, que el bloqueo de los canales KCa de alta conductancia potencia significativamente la contracción adrenérgica, sugiriendo la participación de estos canales en la regulación del tono vascular de la vena safena humana (154). Resultados similares se han encontrado en aorta y arterias intrarrenales de rata (134,155).

Además, la incubación con apamina, bloqueante de los canales KCa de baja conductancia; o con TRAM-34, bloqueante de los canales KCa de intermedia conductancia, no modificó la respuesta relajante de la ranolazina. En parte estos resultados difieren con los descritos en un estudio en arterias intrarrenales de rata donde apamina e iberiotoxina (bloqueante de los canales KCa de alta conductancia) reducen los efectos de la ranolazina, sugiriendo también su participación en el mecanismo de acción (134). Estas discrepancias con nuestros

resultados pueden justificarse por el hecho de tratarse de especies y lechos vasculares distintos.

Además del análisis de la participación de los canales KCa en la respuesta relajante a la ranolazina, nuestros resultados indican que la caribdotoxina también bloquea los efectos de la ranolazina sobre la respuesta adrenérgica tanto exógena, mediada por la fenilefrina, como endógena, mediada por el estímulo neurógeno. Por otra parte, el estudio de la expresión proteica indica que la ranolazina aumenta la expresión de la proteína de los canales KCa de alta conductancia. En su totalidad, estos resultados sugieren que este tipo de canal contribuye a los efectos relajantes y antiadrenérgicos de la ranolazina en la vena safena humana.

7. Participación de canales ICaL en la respuesta a la ranolazina

Los canales de calcio activados por voltaje son necesarios para funciones clave en las células excitables, como la liberación de transmisores, la secreción de hormonas, el acoplamiento de excitación-transcripción y el acoplamiento de excitación-contracción (156).

La entrada de calcio a través de los canales ICaL es un factor clave en la generación del tono vascular de forma que, en ausencia de calcio se elimina el tono mientras que se reduce con el uso de bloqueantes de los canales ICaL como el verapamilo (157). Su mecanismo de acción es mediar la entrada de calcio inducida por la despolarización y la consiguiente vasoconstricción.

Se han realizado estudios en modelos animales que demuestran que la ranolazina a concentraciones elevadas (mayores de 30 μ M)

consiguió inhibir las contracciones inducidas por calcio y bloquear los canales ICaL en células de músculo liso aisladas (134,135,140).

En nuestros experimentos, el verapamilo disminuye significativamente la relajación inducida por ranolazina a las concentraciones utilizadas evidenciando una participación activa de los canales ICaL en la vasodilatación inducida por ranolazina, no solo a altas concentraciones sino también a concentraciones terapéuticas.

8. Consideraciones finales

Los resultados del estudio han demostrado que la ranolazina dentro del rango de concentraciones terapéuticas, mejoró la respuesta relajante de la vena safena humana *ex vivo*. Este efecto se produjo a través de dos mecanismos: el primero, dependiente de la producción de NO endotelial; y el segundo, independiente del endotelio, relacionado con la función de los canales KCa de alta conductancia y los ICaL. Del mismo modo, se obtuvieron datos a favor de un tercer mecanismo relacionado con la acción antagonista de la ranolazina sobre los receptores adrenérgicos α_1 del vaso venoso, sin poder descartar que se produzca a través del bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje de las células musculares lisas de los vasos en las terminaciones nerviosas simpáticas perivasculares.

Como se ha mencionado anteriormente, el endotelio desempeña un papel fundamental en la regulación del tono vascular y su disfunción se asocia a múltiples patologías cardiovasculares (39). Durante la preparación quirúrgica del injerto el endotelio venoso sufre lesiones focales que comprometen su funcionalidad y alteran su respuesta

vasodilatadora promoviendo la trombosis, la hiperplasia intimal y la aterosclerosis (23). A lo anterior se suma el daño endotelial causado por la exposición del injerto a presiones arteriales elevadas y la isquemia-reperfusión que sufre al ser implantado, y que todavía promueve más la proliferación celular en forma de hiperplasia intimal. El grado de hiperplasia intimal se relaciona inversamente con la relajación dependiente del endotelio y directamente con el aumento de la respuesta contráctil en los pacientes sometidos a cirugía coronaria (26). Si la integridad del endotelio no está preservada, sus efectos protectores contra la proliferación celular se pierden. En este aspecto, la ranolazina mejora la relajación dependiente del endotelio en pacientes con y sin factores de riesgo cardiovascular (133,136).

Asimismo, los injertos venosos tienden a sufrir vasoespasmo cuando el tono adrenérgico se encuentra aumentado siendo este uno de los principales factores que contribuye a su deterioro temprano tras la cirugía coronaria. La ranolazina podría resultar útil en este aspecto al disminuir el tono adrenérgico modulando el estado contráctil del músculo liso vascular y prolongando la viabilidad de estos vasos.

Adicionalmente, a partir del primer año la causa primaria de fallo de los injertos venosos es la aterosclerosis (24) que, cuando condiciona una estenosis significativa, aumenta el riesgo de sufrir un infarto de miocardio, de necesitar una nueva terapia de revascularización y de mortalidad cardiovascular (158). A este respecto, la capacidad antiinflamatoria e inhibidora de la adhesión plaquetaria de la ranolazina la convierten en un fármaco que podría resultar útil para prolongar la vida útil de los injertos de vena safena.

De hecho se ha visto que la ranolazina disminuye los niveles de proteína C reactiva en pacientes con cardiopatía isquémica estable (133), siendo ésta un marcador inflamatorio y predictor independiente de eventos cardíacos (159).

Si además se consideran sus efectos antiarrítmicos, antisquémicos y sobre el control glucémico sus beneficios no sólo se limitarían a prolongar la vida útil de los injertos sino también a mejorar las comorbilidades de un subgrupo muy importante de pacientes en los que coexisten varias patologías como la cardiopatía isquémica y la diabetes mellitus.

En conclusión, los hallazgos de nuestro estudio aportan evidencia sobre la utilidad de la ranolazina en el tratamiento de los pacientes sometidos a bypass coronario por su capacidad de disminuir la vasoconstricción adrenérgica y mejorar la relajación vascular, así como por sus propiedades inflamatorias y antiagregantes; y a la ausencia de efectos adversos cardiovasculares y hemodinámicos significativos.

CONCLUSIONES

1. La ranolazina produjo relajación en los anillos precontraídos con fenilefrina, pero no con KCl, vasopresina, endotelina-1 ni el análogo del tromboxano A₂.
2. La ranolazina reduce la respuesta adrenérgica contráctil actuando como un antagonista de los receptores α_1 adrenérgicos.
3. La relajación inducida por la ranolazina en la vena safena depende en parte del NO endotelial.
4. La relajación inducida por la ranolazina depende de la participación de canales de KCa de alta conductancia sensibles a la caribdotoxina y de canales ICaL sensibles al verapamilo.
5. La ranolazina aumentó la expresión de la proteína del canal BKCa, disminuyó significativamente la expresión del receptor adrenérgico α_1 y no modificó la expresión de la eNOS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades cardiovasculares [Internet]. 2017 . Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Panza JA, Ellis AM, Al-Khalidi HR, Holly TA, Berman DS, Oh JK, et al. Myocardial viability and long-term outcomes in ischemic cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2019 ago 22;381(8):739-48.
3. Dégano IR, Salomaa V, Veronesi G, Ferrières J, Kirchberger I, Laks T, et al. Twenty-five-year trends in myocardial infarction attack and mortality rates, and case-fatality, in six European populations. *Heart*. 2015 sep 1; 101(17):1413-21
4. Gil M, Martí H, Elosúa R, Grau M, Sala J, Masiá R, et al. Análisis de la tendencia en la letalidad, incidencia y mortalidad por infarto de miocardio en Girona entre 1990 y 1999. *Rev Esp Cardiol*. 2007 abr;60(4): 349-356.
5. Álvarez C, Romero M, Álvarez C, Vaquero M. Incidencia de cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular en trabajadores de una administración local del sur de España a lo largo de diez años de seguimiento. *Rev Esp Salud Publica* [Internet]. 2020 ene 7;94. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL94/ORIGINALES/RS94C_202001001.pdf
6. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and

- management of chronic coronary syndromes. Vol. 41, Eur Heart J. 2020 Jan 14;41(3):407-477
7. Stefanadis C, Antoniou C, Tsiachris D, Pietri P. Coronary Atherosclerotic Vulnerable Plaque: Current Perspectives. J Am Heart Assoc. 2017 mar 17; 6(3):e005543
 8. Sen PK, Udawadia TE, Kinare SG, Parulkar GB. Transmyocardial acupuncture: a new approach to myocardial revascularization. J Thorac Cardiovasc Surg. 1965;50:181-9.
 9. Vallejo Ruiz JL. Breve historia de la cirugía coronaria. Cir Cardio. 2006 oct;13(4):239-44.
 10. Sones FM, Shirey EK. Cine coronary arteriography. Mod Concepts Cardiovasc Dis. 1962 jul;31:735-8.
 11. Goetz R, Rohman M, Haller Y, Dee R, Rosenar S. Internal mammary coronary artery anastomosis. J Thorac Cardiovasc Surg. 1961;41:378-86.
 12. Favalaro RG. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion. Ann Thorac Surg. 1968;5:334-9.
 13. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary Saphenous Vein Graft Disease Pathogenesis, Predisposition, and Prevention. 1998 mar 10;97(9):916-31.
 14. Calafiore AM, Contini M, Vitolla G, di Mauro M, Mazzei V, Teodori G, et al. Bilateral internal thoracic artery grafting: Long-term clinical and angiographic results of in situ versus Y grafts. J Thorac Cardiovasc Surg. 2000;120(5):990-8.

15. Calafiore A, di Giammarco G, Teodori G, di Mauro M, Lorena Iacò A, Bivona A, et al. Late results of first myocardial revascularization in multiple vessel disease: Single versus bilateral internal mammary artery with or without saphenous vein grafts. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004 sep;26(3):542-8
16. Lytle BW, Blackstone EH, Loop FD, Houghtaling PL, Arnold JH, Akhrass R, et al. Two internal thoracic artery grafts are better than one. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117(5):855-72.
17. Rizzoli G, Schiavon L, Bellini P. Does the use of bilateral internal mammary artery (IMA) grafts provide incremental benefit relative to the use of a single IMA graft? A meta-analysis approach. *Eur J Cardiothorac.* 2002 nov;22(5):781-6.
18. Cuerpo G, Muñoz C, López J. Injertos en cirugía coronaria. Revisión «realista» de la bibliografía. *Cir Cardiovasc.* 2017 may;24(3): 170-174.
19. Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR. Coronary bypass graft fate and patient outcome: Angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol.* 1996 sep;28(3):616-26.
20. Solymoss BC, Leung TK, Pelletier LC, Campeau L. Pathologic changes in coronary artery saphenous vein grafts and related etiologic factors. *Cardiovasc Clin.* 1991;21(2):45-65.
21. Hall JE. Guyton y Hall: Compendio de fisiología médica. 14^a ed. Philadelphia: Elsevier; 2021.

22. Allaire E, Clowes AW. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann Thorac Surg.* 1997 feb;63(2):582-91.
23. Osgood MJ, Hocking KM, Voskresensky I v., Li FD, Komalavilas P, Cheung-Flynn J, et al. Surgical vein graft preparation promotes cellular dysfunction, oxidative stress, and intimal hyperplasia in human saphenous vein. *J. Vasc. Surg.* 2014 jul;60(1):202-11.
24. Parang P, Arora R. Coronary vein graft disease: pathogenesis and prevention. *Can J Cardiol.* 2009 feb;25(2):e57-62.
25. Gaudino M, Antoniadis C, Benedetto U, Deb S, di Franco A, di Giammarco G, et al. Mechanisms, consequences, and prevention of coronary graft failure. *Circulation.* 2017 oct 1;136(18):1749-64.
26. Ku DD, Caulfield JB, Kirklin JK. Endothelium-dependent responses in long-term human coronary artery bypass grafts. *Circulation.* 1991 feb;83(2):402-11.
27. McKavanagh P, Yanagawa B, Zawadowski G, Cheema A. Management and prevention of saphenous vein graft failure: a review. *Cardiol Ther.* 2017 dic; 6(2):203-223.
28. Velthuis H, Jansen P, Oudemans-van Straaten H, van Kamp G, Sturk A, Eijssman L, et al. Circulating endothelin in cardiac operations: influence of blood pressure and endotoxin. *Ann Thorac Surg.* 1996 mar; 61(3):904-8.
29. Shi Y, O'Brien JE, Mannion JD, Morrison RC, Chung W, Fard A, et al. Remodeling of autologous saphenous vein grafts: the

- role of perivascular myofibroblasts. *Circulation*. 1997 jun 17; 95(12):2684-93.
30. Eikemo H, Sellevold OFM, Videm V. Markers for endothelial activation during open heart surgery. *Ann Thorac Surg*. 2004 Jan;77(1):214-9.
31. Ihnken K, Winkler A, Schlensak C, Sarai K, Neidhart G, Unkelbach U, et al. Normoxic cardiopulmonary bypass reduces oxidative myocardial damage and nitric oxide during cardiac operations in the adult. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998 Aug;116(2):327-34.
32. Verrier ED, Boyle EM. Endothelial Cell Injury in Cardiovascular Surgery. *Ann Thorac Surg*. 1996 sep;62(3):915-22.
33. Nair S, Iqbal K, Phadke M, Jadhav U, Khandekar J, Khandeparkar J. Effect of cardiopulmonary bypass on tissue injury markers and endothelial activation during coronary artery bypass graft surgery. *J Postgrad Med*. 2012;58(1):8-13.
34. Yang Z, Ruschitzka F, Rabelink T, Noll G, Julmy F, Joch H, et al. Different effects of thrombin receptor activation on endothelium and smooth muscle cells of human coronary bypass vessels: implications for venous bypass graft failure. *Circulation*. 1997 abr;95(7):1870-6.
35. Rosenfeldt FL, He GW, Buxton BF, Angus JA. Pharmacology of coronary artery bypass grafts. *Ann Thorac Surg*. 1999 mar;67(3):878-88.

36. Vestergaard LP, Benhassen L, Modrau IS, de Paoli F, Boedtkjer E. Increased contractile function of human saphenous vein grafts. harvested by “no-touch” technique. *Front Physiol.* 2018 ene 12;8.
37. Goldstein DJ, Puskas JD, Alexander JH, Chang HL, Gammie JS, Marks ME, et al. External support for saphenous vein grafts in coronary artery bypass surgery. *JAMA Cardiol.* 2022 ago 1;7(8):808-816.
38. Mawhinney JA, Mounsey CA, Taggart DP. The potential role of external venous supports in coronary artery bypass graft surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2018 Jun 1;53(6):1127-1134.
39. Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney Int.* 2006 sep;70(5):840-53.
40. Sumpio BE, Timothy Riley J, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 dic;34(12):1508-12.
41. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004 jul;93(1):105-13.
42. Félétou M. The Endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells. Focus on endothelium-derived vasoactive mediators. En: Granger DN, Granger JP (eds). *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease.* San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences Publisher; 2011.

43. Barret KE, Barman SM, Brooks HL, Yuan JXJ. Ganong Fisiología Médica. 26ª ed. New York (NY): McGraw Hill; 2020.
44. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med.* 2003 oct; 35(7):790-6.
45. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 2004 jun;75(6):639-53.
46. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol Rev.* 2009 mar;61(1):62-97.
47. Bairey-Merz CN, Handberg EM, Shufelt CL, Mehta PK, Minissian MB, Wei J, et al. A randomized, placebo-controlled trial of late Na current inhibition (ranolazine) in coronary microvascular dysfunction (CMD): impact on angina and myocardial perfusion reserve. *Eur Heart J.* 2016 may 14;37(19):1504-13.
48. San Miguel A, San Miguel R, Iglesias R, Alonso N, Martín FJ. Utilidad clínica de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), en diferentes patologías: aterosclerosis, hipertensión y enfermedad renal. *Diálisis y Traspl.* 2008 ene;29(1):29-41.
49. Schulze F, Lenzen H, Hanefeld C, Bartling A, Osterziel KJ, Goudeva L, et al. Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: Results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination

- investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. *Am Heart J.* 2006 sep;152(3):493.e1-493.e8.
50. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev.* 2005 jun;57(2):217-52.
51. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 2011 oct;164(3):894-912.
52. Liu Q, Xi Y, Terry T, So SP, Mohite A, Zhang J, et al. Engineered endothelial progenitor cells that overexpress prostacyclin protect vascular cells. *J Cell Physiol.* 2012 jul;227(7):2907-16.
53. Leung SWS. The vascular impact of IP-TP receptor interactions. *Acta Physiol.* 2021 feb 19;231(2):e13577.
54. García JA, Gómez JJ. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Rev Esp Reumatol.* 2000;27(1):33-5.
55. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Vasoconstrictor prostanoids. *Pflugers Arch.* 2010 may; 459(6):941-50.
56. Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *The Lancet.* 2000 feb;355(9204):646-8.
57. Bellien J, Thuillez C, Joannides R. Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008 ago;22(4):363-77.
58. Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci.* 2009 jul; 117(4):139-55.

59. Godo S, Shimokawa H. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2017 ago;109:4-10.
60. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda).* 2006 feb;21(1):69-78.
61. Edwards G, Félétou M, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch.* 2010 may 11;459(6):863-79.
62. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2009 feb;202(2):330-44.
63. Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012 jun;90(6):713-38.
64. Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, et al. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decrease in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996 nov;28(5):703-11.
65. Félétou M. EDHF: new therapeutic targets? *Pharmacol Res.* 2004 jun;49(6):565-80.
66. Matsumoto T, Kobayashi T, Wakabayashi K, Kamata K. Cilostazol improves endothelium-derived hyperpolarizing

- factor-type relaxation in mesenteric arteries from diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 nov;289(5):H1933-40.
67. More AS, Mishra JS, Hankins GDV, Yallampalli C, Sathishkumar K. Enalapril normalizes endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in mesenteric artery of adult hypertensive rats prenatally exposed to testosterone. *Biol Reprod*. 2015 jun 1;92(6):155.
68. Aiello EA. Canales de potasio (K⁺) y calcio (Ca²⁺) en músculo liso vascular. En: Gómez Llambí H, Piskorz D (eds). *Hipertensión Arterial, Epidemiología, Fisiología, Fisiopatología, Diagnóstico y Terapéutica*. 1ªed. Buenos Aires: Inter-Médica; 2013. 87-92.
69. Comes N, Serrano A, Capera J, Serrano C, Condom E, Ramón y Cajal S, et al. Involvement of potassium channels in the progression of cancer to a more malignant phenotype. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2015 oct;1848(10):2477-92.
70. Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska M v., et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature*. 1993 mar 1;362(6415):31-8.
71. Adams DJ, Hill MA. Potassium channels and membrane potential in the modulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2004 abr 30;15(5):598-610.

72. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1995 abr 1;268(4):C799-822.
73. Neylon CB, Lang RJ, Fu Y, Bobik A, Reinhart PH. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca-2+-activated K⁺ channel in vascular smooth muscle. *Circ Res.* 1999 oct 29;85(9):e33-43.
74. Lu Y, Hanna ST, Tang G, Wang R. Contributions of Kv1.2, Kv1.5 and Kv2.1 subunits to the native delayed rectifier K⁺ current in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Life Sci.* 2002 ago;71(12):1465-73.
75. Cole WC, Walsh MP. Delayed rectifier K⁺ channels of vascular smooth muscle: characterization, function, and regulation by phosphorylation. En: Archer, S.L., Rusch, N.J. (eds). *Potassium Channels in Cardiovascular Biology.* Boston (MA): Springer US; 2001. 485-503.
76. Robertson BE, Nelson MT. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K⁺ currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1994 dic 1;267(6):C1589-97.
77. Rucker D, Dhamoon AS. *Physiology, Thromboxane A2* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.; 2021. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539817>

78. Nakahata N. Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* 2008 abr;118(1):18-35.
79. Bauer J, Ripperger A, Frantz S, Ergün S, Schwedhelm E, Benndorf RA. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A₂ receptor activation. *Br J Pharmacol.* 2014 jul;171(13):3115-31.
80. Smyth EM. Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clin Lipidol.* 2010 abr;5(2):209-19.
81. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988 mar;332(6163):411-5.
82. Duboscq C. Rol de la heterogeneidad endotelial en la regulación de la hemostasia. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2006;40(3):317-25.
83. Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists. *Circulation.* 2000 nov 7;102(19):2434-40.
84. Rich S, McLaughlin V. Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation.* 2003 nov 4;108(18):2184-90.
85. Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008 ago;86(8):485-98.

86. Tsuru H, Tanimitsu N, Hirai T. Pharmacology and physiology of perivascular nerves regulating vascular function. *Jpn J Pharmacol.* 2002;88(1):9-13.
87. Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.* 2001 jun;53(2):319-56.
88. Ahlquist RP. A study of the adrenergic receptors. *Am J Physiol.* 1948 jun 1;153(3):586-600.
89. Altamirano JH, Cacharrón JL, Hernández G, Altamirano V. Antagonistas de los receptores alfa adrenérgicos. Bloqueantes selectivos alfa 1 adrenérgicos. En: Gómez Llambí H, Piskorz D (eds). *Hipertensión Arterial, Epidemiología, Fisiología, Fisiopatología, Diagnóstico y Terapéutica.* 1ªed. Buenos Aires: Inter-Médica; 2013. 538-41.
90. Docherty JR. The pharmacology of α 1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 2019 jul;855:305-20.
91. Conti V, Russomanno G, Corbi G, Izzo V, Vecchione C, Filippelli A. Adrenoreceptors and nitric oxide in the cardiovascular system. *Front Physiol.* 2013;4:321.
92. Osswald W, Guimarães S. Adrenergic mechanisms in blood vessels: Morphological and pharmacological aspects. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1983;96:53-122.
93. Bevan RD, Dodge J, Nichols P, Penar PL, Walters CL, Wellman T, et al. Weakness of sympathetic neural control of human pial compared with superficial temporal arteries reflects low innervation density and poor sympathetic responsiveness. *Stroke.* 1998 ene;29(1):212-21.

94. Bohr DF. Adrenergic receptors in coronary arteries. *Ann N Y Acad Sci.* 1967 feb 10;139(3):799-807.
95. Schena G, Caplan MJ. Everything you always wanted to know about β -AR * (* But Were Afraid to Ask). *Cells.* 2019 abr 16;8(4):357.
96. Wehrwein EA, Orer HS, Barman SM. Overview of the anatomy, physiology, and pharmacology of the autonomic nervous system. *Compr Physiol.* 2016 jun 13;6(3):1239-78.
97. Tamargo J, Amorós I, Barana A, González M, Dolz P, Gómez R, et al. Clinical pharmacology of ranolazine, a novel compound for treating chronic stable angina. *Rev Esp Cardiol.* 2010;10(suppl.2)(41-54).
98. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Prospecto Ranexa 375 mg comprimidos de liberación prolongada [Internet]. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. 2013. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/08462001/P_08462001.html
99. Antzelevitch C, Belardinelli L, Zygmunt AC, Burashnikov A, Di Diego JM, Fish JM, et al. Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation.* 2004 ago 24;110(8):904-10.
100. Sossalla S, Maier LS. Role of ranolazine in angina, heart failure, arrhythmias, and diabetes. *Pharmacol. Ther.* 2012;133(311-23).

101. Chaitman BR. Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions. *Circulation*. 2006 may 23;113(20):2462-72.
102. Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF. Braunwald Tratado de Cardiología. Texto de Medicina Cardiovascular. 11ª ed. Madrid: Elsevier; 2019.
103. Stone PH, Chaitman BR, Stocke K, Sano J, DeVault A, Koch GG. The anti-ischemic mechanism of action of ranolazine in stable ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2010 sep;56(12):934-42.
104. Belardinelli L. Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart*. 2006 jul 1;92(suppl_4):iv6-14.
105. Banerjee K, Ghosh RK, Kamatam S, Banerjee A, Gupta A. Role of ranolazine in cardiovascular disease and diabetes: Exploring beyond angina. *Int J Cardiol*. 2017 ene 15;227:556-64.
106. Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, Hanley P, Meluzin J, Kuch J, et al. Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina. *J Am Coll Cardiol*. 2004 abr;43(8):1375-82.
107. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Ranexa (Ranolazine) Extended-Release [Internet]. Drug Approval Package. 2006. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021526_s000_Ranexa.cfm

108. Alexander KP, Weisz G, Prather K, James S, Mark DB, Anstrom KJ, et al. Effects of ranolazine on angina and quality of life after percutaneous coronary intervention with incomplete revascularization. *Circulation*. 2016 ene 5;133(1):39-47.
109. Schwemer TF, Radziwolek L, Deutscher N, Diermann N, Sehner S, Blankenberg S, et al. Effect of Ranolazine on Ischemic Myocardium IN Patients with acute cardiac Ischemia (RIMINI-Trial): a randomized controlled pilot trial. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2019 ene 24;24(1):62-9.
110. Fihn SD, Gardin JM, Abrams J, Berra K, Blankenship JC, Dallas AP, et al. 2012 ACCF/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS Guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2012 dic;60(24):e44-164.
111. Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI. Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability. *Eur J Heart Fail*. 2007 mar;9(3):219-27.
112. Maier LS, Layug B, Karwadowska-Prokopczuk E, Belardinelli L, Lee S, Sander J, et al. RAnoLazIne for the treatment of Diastolic Heart Failure in patients with preserved ejection fraction: the RALI-DHF proof-of-concept study. *JACC Heart Fail*. 2013 abr;1(2):115-22.
113. Morrow DA, Scirica BM, Karwadowska E, Murphy SA, Andrzej B, Varshavsky S, et al. Effects of ranolazine on recurrent cardiovascular events in patients with non-ST-elevation acute

- coronary syndromes: the MERLIN-TIMI 36 randomized trial. *JAMA*. 2007 abr 25;297(16):1775-83
114. Hwang H, Arcidi JM, Hale SL, Simkhovich BZ, Belardinelli L, Dhalla AK, et al. Ranolazine as an adjunct to cardioplegia: a potential new therapeutic application. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2009 jun 27;14(2):125-33.
115. Mehta PK, Goykhman P, Thomson LEJ, Shufelt C, Wei J, Yang Y, et al. Ranolazine improves angina in women with evidence of myocardial ischemia but no obstructive coronary artery disease. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011 may;4(5):514-22.
116. Saad M, Mahmoud A, Elgendy IY, Richard Conti C. Ranolazine in cardiac arrhythmia. *Clin Cardiol*. 2016 mar;39(3):170-8.
117. Scirica BM, Morrow DA, Hod H, Murphy SA, Belardinelli L, Hedgepeth CM, et al. Effect of ranolazine, an antianginal agent with novel electrophysiological properties, on the incidence of arrhythmias in patients with non-ST-segment-elevation acute coronary syndrome. *Circulation*. 2007 oct 9;116(15):1647-52.
118. Fragakis N, Koskinas KC, Katritsis DG, Pagourelis ED, Zografos T, Geleris P. Comparison of effectiveness of ranolazine plus amiodarone versus amiodarone alone for conversion of recent-onset atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2012 sep;110(5):673-7.
119. Reiffel JA, Camm AJ, Belardinelli L, Zeng D, Karwatowska-Prokopczuk E, Olmsted A, et al. The HARMONY Trial. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015 oct;8(5):1048-56.

120. Rayner-Hartley E, Sedlak T. Ranolazine: a contemporary review. *J Am Heart Assoc.* 2016 mar 15;5(3):e003196.
121. de Ferrari GM, Maier LS, Mont L, Schwartz PJ, Simonis G, Leschke M, et al. Ranolazine in the treatment of atrial fibrillation: Results of the dose-ranging RAFFAELLO (Ranolazine in Atrial Fibrillation Following An Electrical Cardioversion) study. *Heart Rhythm.* 2015 may;12(5):872-8.
122. Hammond DA, Smotherman C, Jankowski CA, Tan S, Osian O, Kraemer D, et al. Short-course of ranolazine prevents postoperative atrial fibrillation following coronary artery bypass grafting and valve surgeries. *Clin Res in Cardiol.* 2015 may 22;104(5):410-7.
123. Kumar K, Nearing BD, Bartoli CR, Kwaku KF, Belardinelli L, Verrier RL. Effect of ranolazine on ventricular vulnerability and defibrillation threshold in the intact porcine heart. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008 oct;19(10):1073-9.
124. Zareba W, Daubert JP, Beck CA, Huang DT, Alexis JD, Brown MW, et al. Ranolazine in high-risk patients with implanted cardioverter-defibrillators. *J Am Coll Cardiol.* 2018 ago;72(6):636-45.
125. Timmis AD, Chaitman BR, Crager M. Effects of ranolazine on exercise tolerance and HbA1c in patients with chronic angina and diabetes. *Eur Heart J.* 2006 ene 1;27(1):42-8.
126. Chisholm JW, Goldfine AB, Dhalla AK, Braunwald E, Morrow DA, Karwatowska-Prokopczuk E, et al. Effect of ranolazine on A1C and glucose levels in hyperglycemic patients with non-ST

- elevation acute coronary syndrome. *Diabetes Care*. 2010 jun 1;33(6):1163-8.
127. Eckel RH, Henry RR, Yue P, Dhalla A, Wong P, Jochelson P, et al. Effect of ranolazine monotherapy on glycemic control in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2015 jul 1;38(7):1189-96.
128. Ning Y, Zhen W, Fu Z, Jiang J, Liu D, Belardinelli L, et al. Ranolazine increases β -cell survival and improves glucose homeostasis in low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011 abr;337(1):50-8.
129. Dhalla AK, Yang M, Ning Y, Kahlig KM, Krause M, Rajamani S, et al. Blockade of Na⁺ channels in pancreatic-cells has antidiabetic effects. *Diabetes*. 2014 oct 1;63(10):3545-56.
130. Venkataraman R, Belardinelli L, Blackburn B, Heo J, Iskandrian AE. A study of the effects of ranolazine using automated quantitative analysis of serial myocardial perfusion images. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2009 nov;2(11):1301-9.
131. Nieminen T, Tavares CAM, Pegler JRM, Belardinelli L, Verrier RL. Ranolazine injection into coronary or femoral arteries Exerts marked, transient regional vasodilation without systemic hypotension in an intact porcine model. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011 oct 1;4(5):481-7
132. Zhao G, Walsh E, Shryock JC, Messina E, Wu Y, Zeng D, et al. Antiadrenergic and hemodynamic effects of ranolazine in conscious dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 jun;57(6):639-47.

133. Deshmukh SH, Patel SR, Pinassi E, Mindrescu C, Hermance E v., Infantino MN, et al. Ranolazine improves endothelial function in patients with stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2009 ago;20(5):343-7.
134. Deng CY, Kuang SJ, Rao F, Yang H, Fang XH, Shan ZX, et al. Effect of ranolazine on rat intrarenal arteries in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2012 may;683(1-3):211-6.
135. Virsolvy A, Farah C, Pertuit N, Kong L, Lacampagne A, Reboul C, et al. Antagonism of Nav channels and α 1-adrenergic receptors contributes to vascular smooth muscle effects of ranolazine. *Sci Rep.* 2016 nov 10;5(1):17969.
136. Lamendola P, Nerla R, Pitocco D, Villano A, Scavone G, Stazi A, et al. Effect of ranolazine on arterial endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 2013 ene;226(1):157-60.
137. Gould HJ, Soignier RD, Cho SR, Hernandez C, Diamond I, Taylor BK, et al. Ranolazine attenuates mechanical allodynia associated with demyelination injury. *Pain Medicine.* 2014 oct 1;15(10):1771-80.
138. Kahlig KM, Lepist I, Leung K, Rajamani S, George AL. Ranolazine selectively blocks persistent current evoked by epilepsy-associated NaV1.1 mutations. *Br J Pharmacol.* 2010 nov;161(6):1414-26.
139. Aldasoro M, Guerra-Ojeda S, Aguirre-Rueda D, Mauricio MD, Vila JM, Marchio P, et al. Effects of ranolazine on astrocytes and

- neurons in primary culture. PLoS One. 2016 mar 7;11(3):e0150619.
140. Malavaki C, Hatziefthimiou A, S. Daskalopoulou S, Stefanidis I, Karatzaferi C, Aidonidis I. Ranolazine enhances nicardipine-induced relaxation of alpha1-adrenoceptor-mediated contraction on isolated rabbit aorta. *Acta Cardiol.* 2015 abr 23;70(2):157-62.
141. Ho WSV, Davis AJ, Chadha PS, Greenwood IA. Effective contractile response to voltage-gated Na⁺ channels revealed by a channel activator. *Am. J Physiol Cell Physiol.* 2013 abr 15;304(8):C739-47.
142. Miles RH, Passman R, Murdock DK. Comparison of effectiveness and safety of ranolazine versus amiodarone for preventing atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol.* 2011 sep;108(5):673-6.
143. Traub O, Ishida T, Ishida M, Tupper JC, Berk BC. Shear stress-mediated extracellular signal-regulated kinase activation is regulated by sodium in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999 jul;274(29):20144-50.
144. Juez López M. Estudio de la respuesta adrenérgica de la vena safena humana. Tesis doctoral. Universitat de València; 2014.
145. Fu Z, Zhao L, Chai W, Dong Z, Cao W, Liu Z. Ranolazine recruits muscle microvasculature and enhances insulin action in rats. *J Physiol.* 2013 oct 15;591(20):5235-49.
146. Aldasoro M, Medina P, Vila JM, Otero E, Martínez-León JB, Lluch S. Endothelium-dependent relaxation of human saphenous

- veins in response to vasopressin and desmopressin. *J Vasc Surg.* 1997 abr;25(4):696-703.
147. Vila J, Martínez-León J, Medina P, Segarra G, Ballester R, Otero E. U-46619-induced potentiation of noradrenergic constriction in the human saphenous vein: antagonism by thromboxane receptor blockade. *Cardiovasc Res.* 2001 dic;52(3):462-7.
148. Félétou M. The Endothelium, Part II: EDHF-Mediated Responses «The Classical Pathway». En: Granger DN, Granger JP (eds). *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease.* San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences Publisher; 2011.
149. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 jun;43(2):109-42.
150. Aldasoro M, Martínez C, Vila JM, Medina P, Lluch S. Influence of endothelial nitric oxide on adrenergic contractile responses of human cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 jul 31;16(4):623-8.
151. Medina P, Segarra G, Peiro M, Flor B, Martínez-León J, Vila J, et al. Influence of nitric oxide on neurogenic contraction and relaxation of the human gastroepiploic artery. *Am J Hypertens.* 2003 ene;16(1):28-32.
152. Andresen J, Shafi NI, Bryan RM. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol.* 2006 ene;100(1):318-27.
153. Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tasaki H, Ueno S, Nakata S, et al. Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in

- endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 sep;24(9):1682-8.
154. Mauricio MD, Serna E, Cortina B, Novella S, Segarra G, Aldasoro M, et al. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels on adrenergic responses of human saphenous vein. *Am J Hypertens.* 2007 ene;20(1):78-82.
155. Paredes MC, Monsalvo I, Hernández C, Regla I, Demare P, Mascher D. Effects of ranolazine on vasomotor responses of rat aortic rings. *Arch Med Res.* 2013 ene;44(1):8-12.
156. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev.* 2015 oct;67(4):821-70.
157. Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev.* 1999 abr 1;79(2):387-423.
158. Halabi AR, Alexander JH, Shaw LK, Lorenz TJ, Liao L, Kong DF, et al. Relation of early saphenous vein graft failure to outcomes following coronary artery bypass surgery. *Am J Cardiol.* 2005 nov;96(9):1254-9.
159. Verma S, Badiwala M v, Weisel RD, Li SH, Wang CH, Fedak PWM, et al. C-reactive protein activates the nuclear factor- κ B signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 dic;126(6):1886-91.

