

Efectos de irbesartán y losartán en conejos hipercolesterolémicos

E. Padilla, M. Sanz, P. Ganado y T. Tejerina

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid.

Introducción y objetivos. Este estudio se realizó para examinar los efectos a largo plazo de irbesartán y losartán, dos antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina, sobre el perfil lipídico y la reactividad vascular en vasos aislados de conejos hipercolesterolémicos.

Material y métodos. Se usaron cuatro grupos de conejos (n = 40): grupo 0 (grupo control; n = 10); grupo 1 (grupo hipercolesterolémico, alimentado con una dieta enriquecida en colesterol al 0,5% [p/p]; n=10); grupo 2 (hipercolesterolémico + irbesartán 10 mg/kg/día; n = 10), y grupo 3 (hipercolesterolémico + losartán 10 mg/kg/día; n = 10). Los animales se mantuvieron en este régimen durante 18 semanas.

Resultados. Tras 18 semanas de tratamiento los valores de colesterol total (CT) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en los grupos tratados con irbesartán y losartán fueron significativamente menores que en el grupo 1 ($\alpha = 0,05$; $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente). Además, los valores de lipoproteínas de alta densidad (HDL) fueron mayores en los grupos tratados que en el hipercolesterolémico ($\alpha = 0,05$; $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente) cuando consideramos la misma concentración de colesterol total en los grupos tratados y en el hipercolesterolémico. A pesar del efecto de los fármacos sobre los parámetros mencionados anteriormente, el tratamiento con irbesartán o losartán no mejoró la relajación dependiente ni independiente del endotelio en los anillos de las arterias aorta y mesentérica. El tratamiento con irbesartán y losartán disminuyó la contracción inducida por NA en anillos de aorta, con respecto al grupo hipercolesterolémico ($\alpha = 0,05$; $p < 0,05$). También se comprobó que el

tratamiento con irbesartán mejoraba el incremento de la contracción inducida por serotonina en las arterias coronarias proximales con respecto al grupo hipercolesterolémico ($\alpha = 0,05$; $p < 0,001$).

Conclusiones. Estos resultados indican que irbesartán y losartán restauran la contracción inducida por NA en arterias aisladas de conejo hipercolesterolémico y mejoran el perfil lipídico en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol.

Palabras clave:

Irbesartán. Losartán. Antagonista del receptor de angiotensina II. Conejos alimentados con dieta rica en colesterol. Arterias (aorta, coronaria, mesentérica [quinta rama]).

EFFECTS OF IRBESARTAN AND LOSARTAN IN CHOLESTEROL-FED RABBITS

Introduction and objectives. This study was performed to examine the long-term effects of irbesartan and losartan, two angiotensin (AT1) receptor antagonists, on lipoproteins and vascular responsiveness in vessels isolated from hypercholesterolemic rabbits.

Material and methods. Four groups of rabbits (n = 40) were used: group 0 (control group; n = 10); group 1 (hypercholesterolemic group, 0.5% [wt/wt] cholesterol-enriched diet; n = 10); group 2 (hypercholesterolemic + irbesartan 10 mg/kg/day; n = 10), and Group 3 (hypercholesterolemic + losartan 10 mg/kg/day; n = 10). The animals were maintained for 18 weeks

Results. After 18 weeks of treatment levels of total cholesterol (TC) and low density lipoproteins (LDL) in irbesartan and losartan treated groups were significantly lower than those of Group 1 ($\alpha = 0.05$; $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). Furthermore, levels of high density lipoproteins (HDL) were higher in the treated groups than in the hypercholesterolemic ($\alpha = 0.05$; $p < 0.05$ and

Correspondencia: Dra. T. Tejerina.
Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina.
Universidad Complutense. 28040 Madrid.
Correo electrónico: teje@med.ucm.es

$p < 0.01$, respectively) when we consider the same level of total cholesterol in the hypercholesterolemic and the treated groups. Despite the effect of the drugs on the above mentioned parameters, treatment with irbesartan or losartan did not improve endothelium-dependent and independent relaxation in aortic and mesenteric rings. Treatment with irbesartan and losartan decreased NA-induced contraction in aortic rings with respect to the hypercholesterolemic group ($\alpha = 0.05$; $p < 0.05$). In addition, irbesartan treatment improved the increase in serotonin-induced contraction in proximal coronary arteries with respect to the hypercholesterolemic group ($\alpha = 0.05$; $p < 0.001$).

Conclusions. These results indicate that irbesartan and losartan restore NA-induced contraction in hypercholesterolemic rabbit-isolated arteries and improve lipoprotein profile in cholesterol-fed rabbits.

Key words:

Irbesartan. Losartan. Angiotensin II receptor antagonist. Cholesterol-fed rabbit. Arteries (aorta, coronary, mesenteric [5th branch]).

Introducción

La arteriosclerosis es el resultado de una secuencia de sucesos en los vasos sanguíneos que conduce a una reorganización de la pared arterial y, como consecuencia de ello, a una reducción del tamaño de la luz vascular. El endotelio regula la estructura vascular y su función a través de la liberación de numerosos factores: óxido nítrico (NO), endotelina-1 (ET-1), derivados del ácido araquidónico, especies reactivas de oxígeno, moléculas de adhesión de monocitos, factores de crecimiento, agentes de coagulación y fibrinolíticos^{1,2}. En presencia de hipercolesterolemia, las células endoteliales pierden su papel en la homeostasis e intervienen en las alteraciones estructurales y funcionales asociadas con factores de riesgo cardiovascular³. La disfunción endotelial que se produce en la hipercolesterolemia se caracteriza por una disminución en la relajación dependiente del endotelio, sugiriendo que existe una disponibilidad reducida de NO^{4,5}.

Se ha demostrado clínicamente que el sistema renina-angiotensina (SRA) actúa tanto al comienzo y progresión como en las consecuencias de la arteriosclerosis. Todos los componentes del SRA se expresan en la pared vascular. La angiotensina II (AII) es un potente péptido vasoactivo y el principal componente del SRA. Los efectos de AII están mediados por re-

ceptores acoplados a proteínas G asociadas a receptores AT1 y AT2, pero la mayoría de los efectos celulares de la AII está mediada por el receptor AT1, el cual puede ser bloqueado por antagonistas específicos para ese receptor. La AII en la pared arterial produce un incremento en las moléculas de adhesión, que pueden actuar junto con moléculas quimiotácticas para inducir adherencia, invasión y proliferación de monocitos y linfocitos T⁶. Además, la AII induce la expresión de citocinas proinflamatorias, como la IL-6, que participan en la proliferación y la migración de las células musculares lisas y en la desestabilización de la placa fibrosa⁷. Así, la AII puede ser considerada como un agente proaterogénico, porque es capaz de estimular la mayoría de los procesos involucrados en el desarrollo de arteriosclerosis.

Se ha descrito que la hipercolesterolemia, especialmente las LDL oxidadas (oxLDL), produce un aumento de la AII mediante un aumento de la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA)⁸. Estos hechos justifican los efectos beneficiosos de los inhibidores de la ECA en animales y pacientes con arteriosclerosis⁹⁻¹⁴. Además, en conejos hipercolesterolémicos, la densidad de receptores AT1 en la capa media de vasos afectados era mayor en comparación con animales sanos¹⁵. Sin embargo, algunos estudios han indicado que el bloqueo del receptor de angiotensina II podría producir efectos similares a los observados con la inhibición de la ECA^{16,17}.

El presente trabajo se llevó a cabo para estudiar si los fármacos irbesartán y losartán, antagonistas del receptor de angiotensina II, tenían efectos antiarterioscleróticos, estudiando los perfiles lipídicos y la reactividad vascular en arterias aisladas de conejos alimentados con colesterol.

Material y métodos

Diseño experimental

En el estudio se han utilizaron cuatro grupos ($n = 40$) de conejos machos New Zealand White (Biocentre S.A., Barcelona, España), de $2,5 \pm 0,5$ kg de peso (3 meses de edad). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales y en una habitación acondicionada bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Cada grupo fue alimentado de acuerdo con el siguiente esquema: grupo 0 (control normal, dieta estándar; $n = 10$); grupo 1 (control hipercolesterolémico, dieta enriquecida con colesterol [0,5%] [U.A.R., París, Francia]; $n = 10$); grupo 2 (dieta enriquecida con colesterol [0,5%] + irbesartán [10 mg/kg/día] $n = 10$), y grupo 3 (dieta enriquecida con colesterol [0,5%] + losartán [10 mg/kg/día] $n = 10$). El experimento se llevó a cabo durante 18 semanas. Todos los animales fueron alimentados con una dieta estándar (Panlab S.L., Barcelona, España) durante al menos 7 días antes de comenzar el experimento. El agua estaba disponible *ad libitum* y la ingestión de alimentos fue monitorizada diariamente tanto en los grupos control como en los tratados.

El peso de los animales se determinó antes de comenzar el tratamiento y posteriormente en los días 15, 30, 60, 90 y 120. Se recogió una muestra de sangre de cada conejo antes de iniciar el tratamiento y también en los días 15, 30, 60, 90 y 120 de tratamiento. Se realizó la extracción de la arteria de la oreja y se determinaron las concentraciones de colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL), por reacción colorimétrica utilizando un equipo enzimático comercial (BioMerieux, Marcy, Francia).

Al cabo de 18 semanas de estudio, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (25 mg/kg i.v.) y sacrificados por exanguinación por corte de la yugular y las carótidas. La aorta torácica y las arterias coronarias proximales se extrajeron rápidamente y fueron puestas en solución Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): NaCl 119, KCl 4,7, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, CaCl₂ 2,5 y glucosa 11,1. Posteriormente, se limpiaron de grasas y adherencias y se seccionaron en anillos de 2-3 mm de longitud. Los anillos se introdujeron entre dos alambres finos y rígidos de acero en baños de órganos, que contenían 10 ml de solución Krebs-Henseleit, mantenidas a una temperatura constante de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y burbujeada con carbógeno (un 95% de O₂ y un 5% de CO₂) a un pH de $7,35 \pm 0,05$. Los anillos de aorta fueron sometidos a una tensión de 2 g y los de coronaria a 0,5 g. Los anillos se dejaron estabilizar durante un período de 90-120 min (aorta) o 30 min (coronaria proximal). Las respuestas contráctiles se midieron a través de transductores fuerza desplazamiento (Grass FT 03) y se recogieron en un polígrafo Grass¹⁸. Asimismo, la fuerza isométrica fue recogida en un convertidor MacLab A/D (Chart v3.2, A.D Instruments Pty. Ltd., Castle Hill, Australia), conectado a un ordenador Macintosh¹⁹.

La arteria mesentérica se diseccionó bajo microscopio, obteniéndose un segmento de arteria mesentérica de aproximadamente 2 mm de longitud y un diámetro interior aproximado de 175 μ , correspondiente a la quinta rama de la arteria mesentérica superior. Se introdujo en una solución salina fisiológica (PSS), de la siguiente composición (mM): NaCl 139, KCl 5, MgCl₂ 0,98, CaCl₂ 0,15, glucosa 9 y hepes 5. Las arterias se montaron en un miógrafo²⁰. A través de la luz del anillo se introdujeron dos hilos de tungsteno de 40 μ m, uno de los cuales se sujetaba a dos tornillos. El otro hilo se introdujo paralelamente al anterior, uniéndose a dos ganchos de fuerza de un transductor (U-gauge, Shinko Co., Ltd.) y cuya posición era ajustada con un micromanipulador.

Las preparaciones obtenidas se sometieron a la tensión que permitía obtener un diámetro de 0,9 veces el diámetro del vaso a una presión transmural de 100 mmHg²¹ y se dejaron estabilizar durante 30 min en una solución PSS previamente burbujeada con carbógeno (95% O₂-5% CO₂) y mantenida a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. La fuerza isométrica fue recogida en un convertidor MacLab A/D (Chart v3.2, A.D Instruments Pty. Ltd., Castle Hill, Australia), conectado a un ordenador Macintosh¹⁹.

Tras el período de estabilización, los anillos de aorta se contrajeron con noradrenalina 10^{-6} M. Después se realizaron cur-

vas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) (10^{-8} - 10^{-5} M) (relajación dependiente del endotelio) o a nitroprusiato sódico (NPS) (10^{-8} - 10^{-4} M) (relajación independiente del endotelio). Otros anillos de aorta se contrajeron con KCl 80 mM.

Las arterias coronarias proximales se contrajeron inicialmente con KCl 120 mM; tras lavar el agente vasoconstrictor, se realizó una curva concentración-respuesta a serotonina (5-hidroxitriptamina) (10^{-9} - 10^{-4} M).

Las arterias mesentéricas se contrajeron con KCl 80 mM y, tras lavar el agente vasoconstrictor durante 30 min, los anillos fueron expuestos a concentraciones submáximas de noradrenalina (10^{-5} M). Tras alcanzar en la respuesta contráctil una meseta estable, se realizaron curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) (10^{-8} - 10^{-4} M).

Fármacos

En nuestros experimentos hemos usado los siguientes fármacos y reactivos: acetilcolina (Sigma), bitartrato de noradrenalina (Sigma) y nitroprusiato sódico (Sigma). Irbesartán y losartán fueron donados por los laboratorios Bristol-Myers Squibb y Merck Sharp & Dohme, respectivamente. Las soluciones madre se prepararon diariamente en agua desionizada bidestilada y se mantuvieron en hielo durante el experimento y protegidas de la luz. Con el fin de prevenir la oxidación, se añadió ácido ascórbico a las soluciones madre de NA. Las soluciones de trabajo se realizaron en solución Krebs-Henseleit.

Análisis experimental

Los datos experimentales han sido expresados como media \pm error estándar de la misma para 10 animales en cada grupo de experimentos. La comparación entre los diferentes grupos, al valor correspondiente a la concentración máxima, se realizó con el test de Bonferroni y se consideraron diferencias significativas a un 95% de nivel de confianza ($1-\alpha = 0,95$).

La Universidad Complutense de Madrid (EEC registro oficial 28079-15ABC) aprobó todos los protocolos con los animales.

Resultados

Resultados generales

Durante el período experimental, de 18 semanas, la dieta fue bien aceptada y no se observaron diferencias significativas entre los pesos corporales de los conejos pertenecientes a los distintos grupos; los pesos iniciales eran de 2.500 ± 50 g, y al final del tratamiento (18 semanas) los pesos fueron de 3.556 ± 115 g (grupo control, grupo 0), 3.685 ± 93 g (grupo hipercolesterolémico, grupo 1), 3.710 ± 78 g (grupo hipercolesterolémico + irbesartán, grupo 2)

Tabla 1. Valores de CT, LDL y HDL entre los diferentes grupos

Grupo	CT (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
0 (control)	$39,8 \pm 6,2$	$33,3 \pm 5,2$	$13,8 \pm 2,1$
1 (hipercolesterolémico)	$1.121,0 \pm 104,0$	$946,1 \pm 129,0$	$17,4 \pm 5,0$
2 (irbesartán)	$762,0 \pm 114,0^*$	$503,0 \pm 109,0^*$	$18,0 \pm 1,0$
3 (losartán)	$674,3 \pm 112,0^*$	$329,0 \pm 105,8^*$	$17,4 \pm 1,7$

Los valores representan la media \pm error estándar de la media.

CT: colesterol total; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad.

*Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 2 y 3 frente al grupo 1 con un intervalo de confianza del 95%.

y 3.696 ± 66 g (grupo hipercolesterolémico + losartán, grupo 3).

La concentración sérica de colesterol total fue de $61,4 \pm 5,7$ mg/100 ml al comienzo del estudio y se incrementó gradualmente durante las primeras 8 semanas en todos los grupos, excepto en el grupo alimentado con dieta estándar. Encontramos diferencias estadísticamente significativas en el incremento de colesterol total en suero entre los grupos tratados, grupo 2 ($p < 0,05$) y grupo 3 ($p < 0,01$), y el grupo hipercolesterolémico (grupo 1) ($\alpha = 0,05$) (fig. 1, paneles A, B y C), y también hallamos algunos cambios en la distribución del colesterol en HDL o LDL (tabla 1).

Respuestas contráctiles a KCl o noradrenalina en los anillos de la aorta

En el primer grupo de experimentos estudiamos las contracciones inducidas por KCl (80 mM) o noradrenalina (10^{-6} M). En las arterias del grupo 0 (grupo control), KCl indujo una contracción de $9,1 \pm 0,4$ g, y en el grupo hipercolesterolémico (grupo 1) esta contracción fue de $9,5 \pm 0,5$ g. En los grupos 2 y 3 (grupos tratados con irbesartán y losartán) la contracción inducida por KCl no se modificó significativamente ($8,8 \pm 0,5$ g y $9,3 \pm 0,6$ g, respectivamente). En los grupos 0 y 1 NA (10^{-6} M) indujo una contracción de $5,2 \pm 0,3$ g y $6,5 \pm 0,4$ g, respectivamente ($\alpha = 0,05$; $p < 0,05$), mientras que en los conejos tratados con irbesartán y losartán disminuyó la hiperreactividad a NA encontrada en el grupo de los conejos hipercolesterolémicos, obteniéndose contracciones semejantes a las conseguidas en el grupo control ($5,0 \pm 0,4$ g y $5,21 \pm 0,3$ g, respectivamente) (fig. 2, paneles A y B).

Respuestas a acetilcolina en los anillos de la aorta

La acetilcolina (10^{-8} - 10^{-5} M) provocó una relajación dependiente del endotelio de forma concentración-respuesta en todos los grupos estudiados. La relajación dependiente del endotelio resultó significativamente disminuida en los conejos sometidos a una dieta hipercolesterolémica (grupo 1) con respecto al grupo control (grupo 0), con relajaciones máximas inducidas por ACh (10^{-5} M) del $65,0 \pm 4,0\%$ y el $24,0 \pm 9,4\%$ ($\alpha = 0,05$; $p < 0,001$), en los grupos 0 y 1, respectivamente. Irbesartán y losartán no mejoraron dicha relajación (relajación máxima, $13,5 \pm 4,5\%$ y $23,0 \pm 5\%$, respectivamente) (fig. 3).

Respuesta al nitroprusiato sódico en los anillos de la aorta

En todos los grupos estudiados el nitroprusiato sódico produjo una relajación. La curva concentra-

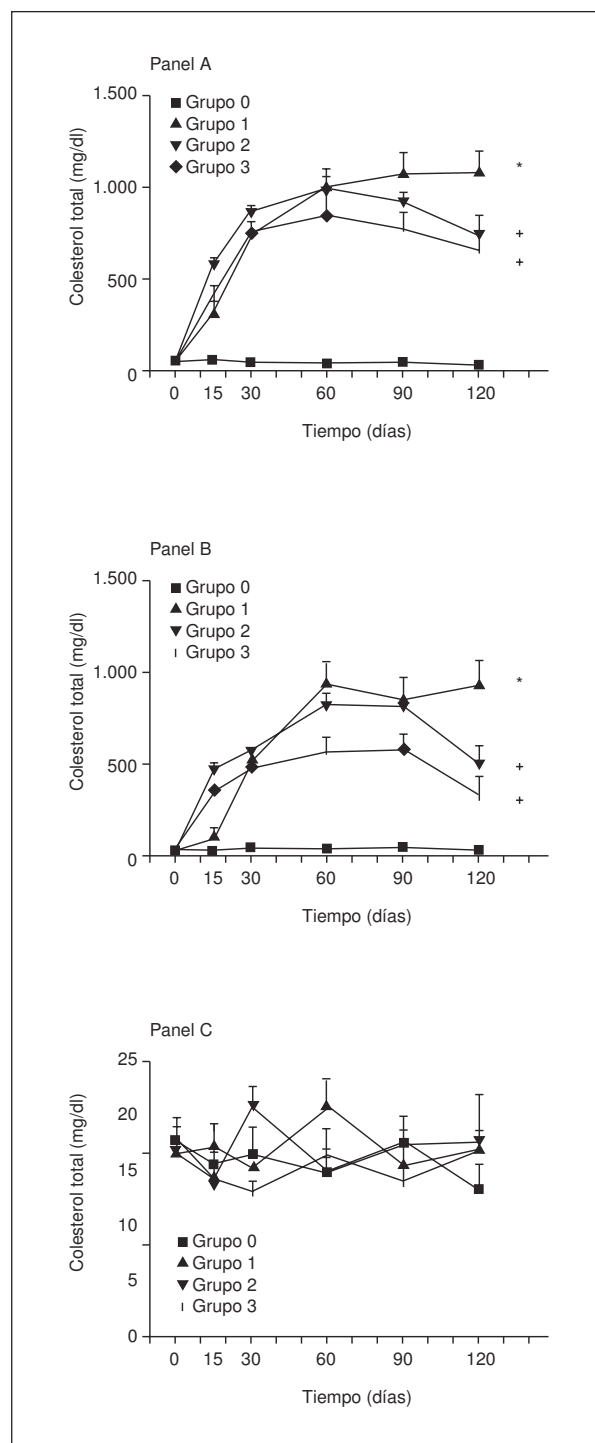


Figura 1. Concentración plasmática de colesterol total (panel A), LDL (panel B) y HDL (panel C). Grupo 0 (grupo control); grupo 1 (grupo hipercolesterolémico); grupo 2 (hipercolesterolémico + irbesartán 10 mg/kg/día); grupo 3 (hipercolesterolémico + losartán 10 mg/kg/día). Cada punto representa la media de 10 experimentos \pm error estándar de la media. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un intervalo de confianza del 95% entre el grupo 0 y el grupo 1 (*) y entre el grupo 2 o 3 y el grupo 1 (*).

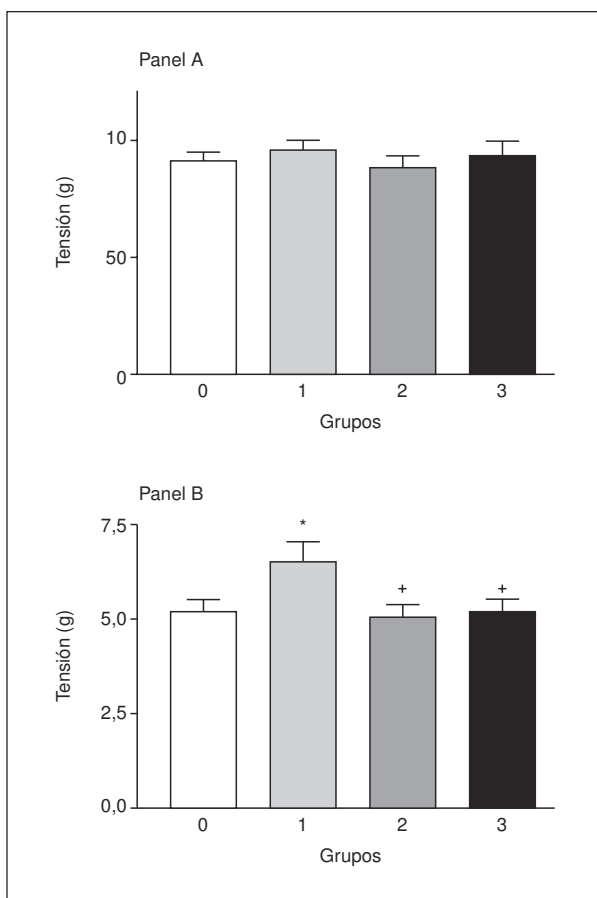


Figura 2. Contracciones inducidas por KCl 80 mM (panel A) o noradrenalina 10^{-6} M (panel B) en aorta de conejo. Grupo 0 (grupo control); grupo 1 (grupo hipercolesterolémico); grupo 2 (hipercolesterolémico + irbesartán 10 mg/kg/día); grupo 3 (hipercolesterolémico + losartán 10 mg/kg/día). Cada punto representa la media de 10 experimentos \pm error estándar de la media. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un intervalo de confianza del 95% entre el grupo 0 y el grupo 1 (*) y entre el grupo 2 o 3 y el grupo 1 (*).

ción-respuesta a nitroprusiato sódico se desplazó hacia la derecha en el caso del grupo hipercolesterolémico (grupo 1) respecto al grupo control ($\alpha = 0,05$; $p < 0,05$). En los grupos tratados no se mejoró esta relajación (fig. 4).

Respuestas contráctiles a KCl y 5-hidroxitriptamina en la arteria coronaria proximal

En el grupo tratado con irbesartán (grupo 2) la contracción inducida por KCl 120 mM en las arterias coronarias proximales no fue significativamente diferente del grupo hipercolesterolémico (grupo 1) (fig. 5, panel A).

Por otro lado, en el grupo hipercolesterolémico, la curva concentración-respuesta a serotonina fue significativamente mayor con respecto al grupo

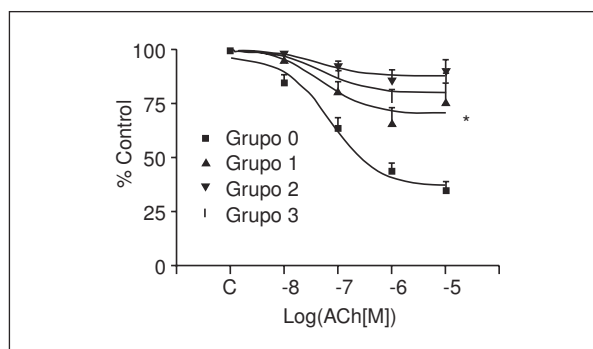


Figura 3. Relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina (10^{-8} - 10^{-5} M) en anillos de aorta precontractados con noradrenalina. Grupo 0 (grupo control); grupo 1 (grupo hipercolesterolémico); grupo 2 (hipercolesterolémico + irbesartán 10 mg/kg/día); grupo 3 (hipercolesterolémico + losartán 10 mg/kg/día). Cada punto representa la media de 10 experimentos \pm error estándar de la media. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un intervalo de confianza del 95% entre el grupo 0 y el grupo 1 (*).

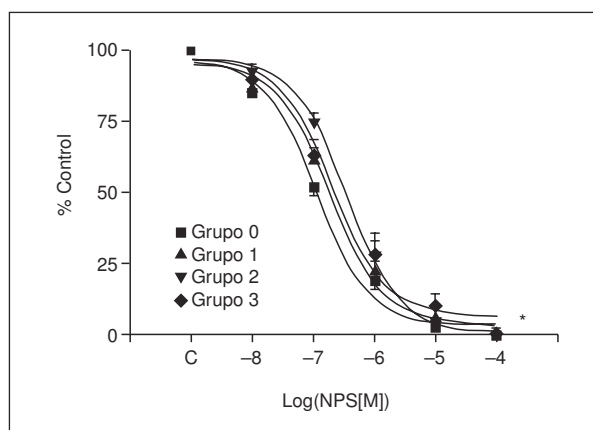


Figura 4. Relajación independiente del endotelio inducida por nitroprusiato sódico (10^{-8} - 10^{-4} M) en anillos de aorta precontractados con noradrenalina. Grupo 0 (grupo control); grupo 1 (grupo hipercolesterolémico); grupo 2 (hipercolesterolémico + irbesartán 10 mg/kg/día); grupo 3 (hipercolesterolémico + losartán 10 mg/kg/día). Cada punto representa la media de 10 experimentos \pm error estándar de la media. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un intervalo de confianza del 95% entre el grupo 0 y el grupo 1 (*).

control (grupo 0). El tratamiento con irbesartán restauró parcialmente esta contracción a valores normales. Así, la máxima contracción inducida por serotonina 10^{-4} M fue del $14,0 \pm 10,0\%$ (porcentaje de la contracción inducida por KCl 120 mM), y del $71,0 \pm 8,0\%$ y el $25,0 \pm 9,0\%$ en los grupos 0, 1 y 2, respectivamente (fig. 5, panel B). Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 0 y 1 ($p < 0,001$) y entre el 1 y el 2 ($\alpha = 0,05$; $p < 0,001$).

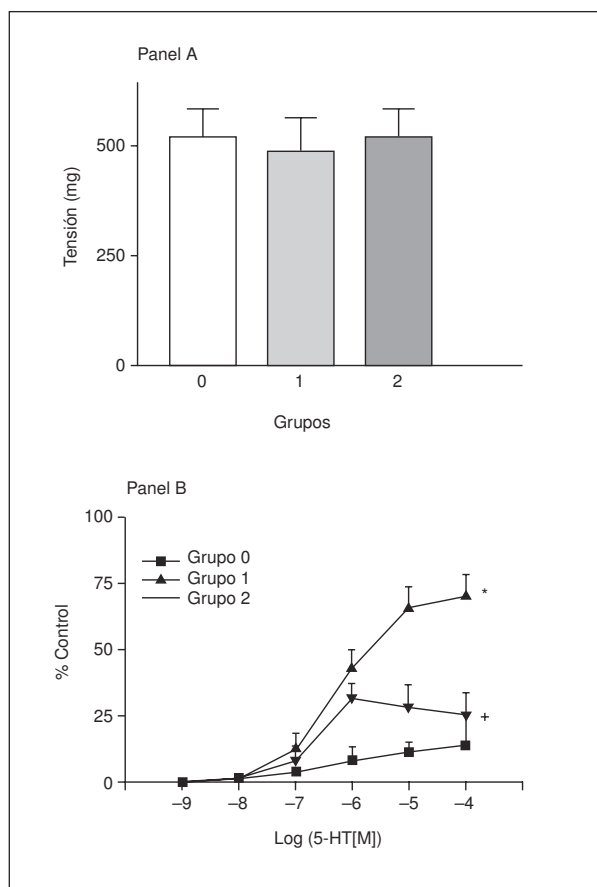


Figura 5. Contracción inducida por KCl (120 mM) (panel A), curva concentración-respuesta inducida por 5-hidroxitriptamina (10^{-9} - 10^{-4} M) (panel B) en las arterias coronarias proximales. Grupo 0 (grupo control); grupo 1 (grupo hipercolesterolémico); grupo 2 (hipercolesterolémico + irbesartán 10 mg/kg/día). Cada punto representa la media de 10 experimentos \pm error estándar de la media. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un intervalo de confianza del 95% entre el grupo 0 y el grupo 1 (*) y entre el grupo 2 y el grupo 1 (+).

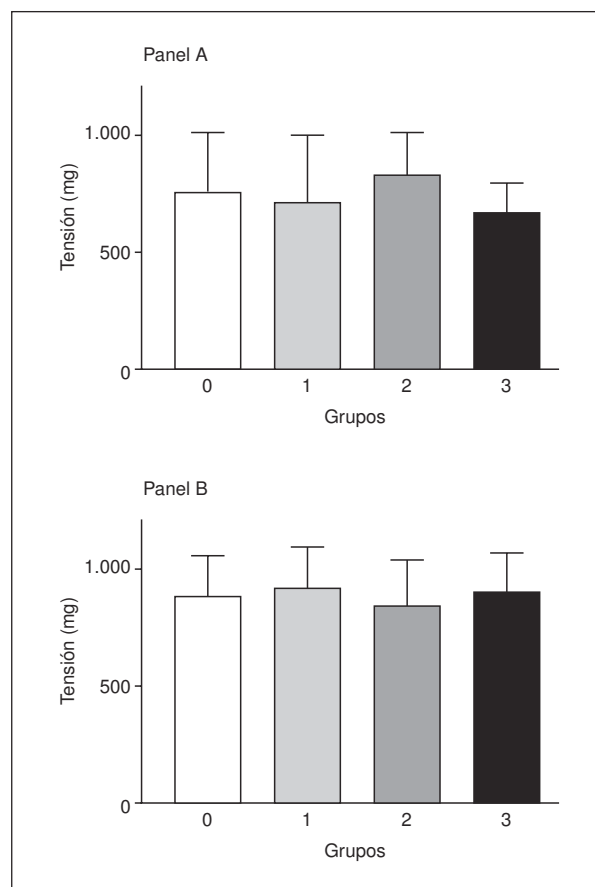


Figura 6. Contracciones inducidas por KCl 80 mM (panel A) o noradrenalina 10^{-5} M (panel B) en las arterias mesentéricas (quinta rama). Grupo 0 (grupo control); grupo 1 (grupo hipercolesterolémico); grupo 2 (hipercolesterolémico + irbesartán 10 mg/kg/día); grupo 2 (hipercolesterolémico + irbesartán 10 mg/kg/día); grupo 3 (hipercolesterolémico + losartán 10 mg/kg/día). Cada punto representa la media de 10 experimentos \pm error estándar de la media.

Respuestas contráctiles inducidas por KCl y noradrenalina en la arteria mesentérica

En la figura 6 (paneles A y B) se incluyen los valores de las contracciones inducidas por KCl o por una concentración submáxima de noradrenalina (10^{-5} M) en los diferentes grupos estudiados. Las contracciones obtenidas fueron similares en todos los grupos cuando la contracción se indujo por KCl (753 ± 250 g, 700 ± 285 g, 812 ± 176 g y 669 ± 115 , en los grupos 0, 1, 2 y 3, respectivamente). Asimismo, cuando se indujeron las contracciones con noradrenalina (10^{-5} M) fueron similares en todos los grupos estudiados (870 ± 180 g, 913 ± 172 g, 843 ± 193 g y 894 ± 173 g, en los grupos 0, 1, 2 y 3, respectivamente).

Respuestas a acetilcolina en la arteria mesentérica

La adición de manera acumulativa de acetilcolina indujo una relajación sostenida y dependiente de la concentración en las arterias precontraídas con noradrenalina (10^{-5} M). La curva concentración-respuesta a acetilcolina se desplazó hacia la derecha de forma significativa en las arterias mesentéricas pertenecientes al grupo hipercolesterolémico, comparado con el grupo control (fig. 7) ($\alpha = 0,05$, $p < 0,001$).

El tratamiento con irbesartán restauró completamente la relajación dependiente del endotelio en las arterias mesentéricas con respecto al grupo control ($\alpha = 0,05$; $p < 0,001$).

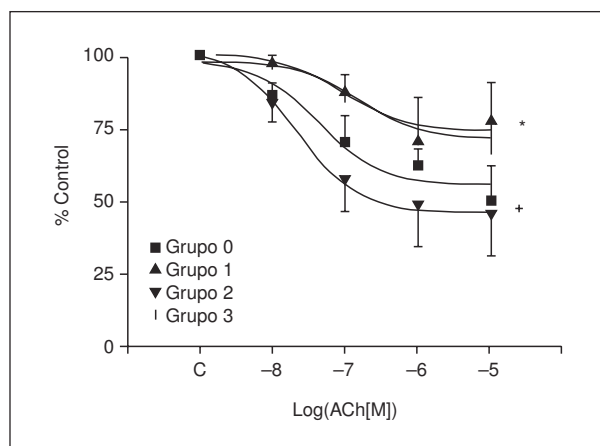


Figura 7. Relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina (10^{-8} - 10^{-5} M) en anillos de aorta precontraídos con noradrenalina en las arterias mesentéricas (quinta rama). Grupo 0 (grupo control); grupo 1 (grupo hipercolesterolémico); grupo 2 (hipercolesterolémico + irbesartán 10 mg/kg/día); grupo 3 (hipercolesterolémico + losartán 10 mg/kg/día). Cada punto representa la media de 10 experimentos \pm error estándar de la media. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un intervalo de confianza del 95% entre el grupo 0 y el grupo 1 (*) y entre el grupo 2 o 3 y el grupo 1 (*).

Discusión

En este estudio, los conejos alimentados con una dieta al 0,5% de colesterol durante 18 semanas desarrollaron una acusada hiperlipidemia. Asimismo, irbesartán y losartán disminuyeron los valores séricos de colesterol total y LDL, e incrementaron los valores de HDL. Los estudios preliminares de Li et al con valsartán han obtenido resultados similares²².

Se han observado alteraciones en la reactividad vascular durante el proceso arteriosclerótico, incluyendo una disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio y un aumento de la respuesta frente a agonistas vasoconstrictores²³.

Los datos encontrados sugieren que tanto la elevación de cHDL o la disminución de cLDL encontrada en presencia de los fármacos estudiados podrían actuar sobre el tejido, preservando la integridad de la función endotelial. Por otra parte, Orlov et al²⁴ han demostrado que existe un incremento del calcio intracelular mediado por las LDL. Así, podríamos postular que cuando se inhiben los efectos de la AII, con la administración de irbesartán y losartán, así como la entrada de calcio mediada por esta sustancia, el número de receptores de LDL podría verse incrementado para captar calcio, disminuyendo así los valores plasmáticos de LDL.

En nuestro estudio con trandolapril (inhibidor de la ECA), al igual que en el de Sanz et al¹⁴, no se

encontraron efectos significativos sobre el colesterol plasmático, las HDL o las LDL entre el grupo hipercolesterolémico y el grupo tratado con el fármaco. Estos datos sugieren, junto con los presentados en este trabajo, que los efectos sobre las LDL deben estar más relacionados con el receptor AT1 que con la acción de la angiotensina por sí misma.

Nuestros datos confirman los de estudios previos, que demuestran la disfunción endotelial provocada por la hipercolesterolemia^{4,5,25}. En estos estudios, la relajación en respuesta a la acetilcolina, un vasodilatador dependiente del endotelio, está claramente afectada en las arterias de animales con hipercolesterolemia experimental. Resultados comparables han sido demostrados en animales de experimentación y en humanos, lo que indica que durante la hipercolesterolemia y los primeros estadios de la arteriosclerosis, la alteración funcional vascular más común es una reducción en la relajación dependiente del endotelio²⁶⁻²⁸. Este resultado podría depender de una disminución de la disponibilidad del NO, ya que ha sido demostrada la reducción de la expresión de NO sintasa en las células endoteliales²⁹. Otra alteración que podría contribuir a la reducida respuesta relajante a ACh en conejos hipercolesterolémicos es el engrosamiento de la íntima, que constituye una barrera, evitando que el NO alcance las células lisas musculares³⁰. Sin embargo, irbesartán y losartán, antagonistas del receptor AT1, no fueron capaces de normalizar esta disfunción endotelial en los anillos de la aorta.

Algunos estudios han demostrado que la hipercolesterolemia disminuye la relajación dependiente del endotelio en las arterias pequeñas, vasos que no desarrollan lesiones arterioscleróticas^{31,32,27}. Sin embargo, Simonsen et al³³ encontraron que la relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina en las pequeñas arterias cerebrales, la femoral y la mesentérica de conejos *in vitro* no se encontraba afectada por la dieta rica en colesterol. En nuestro trabajo, la dieta hipercolesterolémica disminuyó la relajación dependiente del endotelio en los anillos de la arteria mesentérica. En vasos de resistencia, la relajación dependiente del endotelio ha sido atribuida al factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF)³⁴, y este mecanismo podría estar alterado en la hipercolesterolemia. Nosotros encontramos que el tratamiento con irbesartán normalizó la relajación dependiente del endotelio en las pequeñas arterias.

En nuestro modelo de hipercolesterolemia también encontramos que la relajación dependiente del endotelio inducida por nitroprusiato sódico estaba

significativamente disminuida en los anillos de la aorta, en contra de lo encontrado por Finta et al¹⁰. El nitroprusiato sódico libera NO que actúa a través de GMPc provocando la relajación del músculo liso, y podemos concluir con nuestros datos que esta parte de la cascada está alterada en conejos alimentados con una dieta aterogénica. Sin embargo, tanto el tratamiento con losartán como irbesartán no pudieron normalizar esta disfunción.

En este estudio encontramos un aumento de las respuestas vasoconstrictoras a NA en los anillos de la aorta de animales hipercolesterolémicos. El incremento en la producción de endotelina podría desempeñar un papel, pero una parte importante del incremento en la respuesta vasoconstrictora parece ser independiente del endotelio. El mecanismo que provocaría ese aumento de la respuesta vasoconstrictora podría ser debido a la estimulación de la entrada de calcio en las células musculares vasculares por las LDLox^{24,35}. Los cambios a corto plazo en los valores de LDL, y probablemente el alcance de la oxidación de las LDL podrían modificar las respuestas vasoconstrictoras alteradas. Así, el tratamiento con irbesartán y losartán restauraba la respuesta constrictora a valores normales.

Las arterias coronarias proximales de los conejos hipercolesterolémicos examinados en este trabajo presentaron una respuesta aumentada a 5-HT. Esto está de acuerdo con estudios previos en conejos hipercolesterolémicos^{36,37} y primates no humanos³⁸. La respuesta anormal a 5-HT en las arterias coronarias proximales se ha asociado con un incremento en el número de receptores de 5-HT debido a la presencia de lesiones ateroscleróticas³⁹. El tratamiento con irbesartán disminuyó la contracción con 5-HT hasta valores normales, probablemente como resultado de una disminución en el desarrollo de la placa.

Conclusión

El presente trabajo de investigación demuestra que los principales cambios tras el tratamiento con irbesartán y losartán en un modelo hipercolesterolémico tienen lugar sobre los valores de colesterol, reduciendo el colesterol total y el cLDL y aumentando el cHDL, y en las contracciones inducidas por NA y 5-HT en la aorta y las arterias coronarias proximales, respectivamente, que fueron restauradas hasta valores normales.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado con una ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias, expediente 96/2047.

Bibliografía

1. Rubanyi GM. The role of endothelium on cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;2 (Suppl) 4:1-14.
2. Jaffe EA. Physiologic functions of normal endothelial cells. En: Loscalzo J, Crager MA, Dzau V, editors. *Vascular medicine. A textbook of vascular biology and diseases*. Boston: Little, Brown & Co., 1996; p. 3-46.
3. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms: oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-96.
4. Jayakody RL, Senaratne MPJ, Thomson ABR, Kappagoda CT. Cholesterol feeding impairs endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Can J Physiol Pharmacol* 1985;63:1206-9.
5. Chappel S, Lewis M, Henderson A. Effect of lipid feeding on endothelium dependent relaxation in rabbit aortic preparations. *Cardiovasc Res* 1987;21:34-7.
6. Sasayama S, Okada M, Matsumori A. Chemokines and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2000;45:267-9.
7. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappaB transcription factors. *Circ Res* 1999;84:695-703.
8. Gibbons GH. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. *Am J Cardiol* 1997;79:3-8.
9. Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, Drago R. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 1990;15:327-31.
10. Finta KM, Fischer MJ, Lee L, Gordon D, Pitt B, Webb RC. Ramipril prevents impaired endothelium-dependent relaxation in arteries from rabbits fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis* 1993;100:149-56.
11. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease: The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 1996;94:258-65.
12. Hoshida S, Nishida M, Yamashita N, Igarashi J, Aoki K, Hori M, et al. Vascular angiotensin-converting enzyme activity in cholesterol-fed rabbits: effects of enalapril. *Atherosclerosis* 1997;130:53-9.
13. Hernández A, Barberi L, Ballerio R, Testini A, Ferioli R, Bolla M, et al. Delapril slows the progression of atherosclerosis and maintains endothelial function in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1998;137:71-6.
14. Sanz M, Ganado P, Ruiz E, Tejerina T. Effect of trandolapril on vascular responsiveness in cholesterol-fed rabbit-isolated arteries. *Eur J Pharmacol* 2000;397:359-65.
15. Yang BC, Phillips MI, Mohuczy D, Meng H, Shen L, Mehta P. Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 1998;18:1433-9.
16. Hope H, Brecher P, Chobanian AV. Comparison of the effects of AT1 receptor blockade and angiotensin converting enzyme inhibition on atherosclerosis. *Am J Hypertens* 1999;12:28-34.
17. De las Heras N, Aragoncillo P, Maeso R, Vázquez-Pérez S, Navarro-Cid J, DeGasparo M. AT1 receptor antagonism reduces endothelial dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Hypertension* 1999;34:969-75.
18. Tejerina T, Sesin J, Delgado C, Tamargo J. Effect of milrinone contractility and ⁴⁵Ca²⁺ movements in the isolated rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* 1988;148:239-45.
19. Ruiz E, Tejerina T. Relaxant effects of L-citrulline in rabbit vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1998;125:186-92.
20. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 1977;41:19-26.
21. Mulvany M, Warshaw D. The active tension-length of vascular smooth muscle related to its cellular components. *J Gen Physiol* 1977;74:85-104.
22. Li J, Hirose N, Kawamura M, Arai Y. Antiatherogenic effect of angiotensin converting enzyme inhibitor (benazepril) and angiotensin II receptor antagonist (valsartan) in the cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1999;143:315-26.

23. Howes LG, Abbot D, Straznicky NE. Lipoproteins and cardiovascular reactivity. *Br J Clin Pharmacol* 1997;44:319-24.
24. Orlov S, Resink T, Bernhardt J, Ferracin F, Buhler F. Vascular smooth muscle cell calcium fluxes. Regulation by angiotensin II and lipoproteins. *Hypertension* 1993;21:195-203.
25. Verburen TJ, Jordens FH, Zonnekeyn LL, VanHove CE, Coene MC, Herman AG. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. *Circ Res* 1986;58:552-64.
26. Jayakody L, Senaratne M, Thompson A, Kappagoda T. Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in the rabbit. *Circ Res* 1987;60:251-64.
27. Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans: progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1991;83:391-401.
28. Chowieńczyk PJ, Wats GF, Cockcroft JR, Ritter JM. Impaired endothelium-dependent vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemia. *Lancet* 1992;340:1430-2.
29. Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Navarro-Antolín J, Sánchez-Pascuala R, Hernández G, Díaz C, et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:2711-9.
30. Ross R. Atherosclerosis. An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
31. Yamamoto H, Bossaller C, Cartwright J, Henry PD. Videomicroscopic demonstration of defective cholinergic arteriolar vasodilation in atherosclerotic rabbit. *J Clin Invest* 1988;81:1752-8.
32. Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation* 1990;81:1586-93.
33. Simonsen U, Prieto D, Mulvany MJ, Ehrnrooth E, Korsgaard N, Nyborg NCB. Effect of induced hypercholesterolemia in rabbits on functional responses of isolated large proximal and small distal coronary arteries. *Atherosclerosis Thromb* 1992;12:380-92.
34. Harasawa UL, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 1997;100:2793-9.
35. Thorin E, Hamilton C, Prunczak A, Reid J. Change in endothelial cell membrane properties after chronic exposure to oxidised low density lipoproteins. *J Hypertens* 1994;12 (Suppl 3):180-3.
36. Vrints C, Verbeuren T, Snoeck J, Herman AG. Effects of hypercholesterolemic on coronary vascular reactivity: impaired endothelium-dependent vasodilatation leads to unmasking of 5-HT₂-serotonergic vasoconstriction in hypercholesterolemic rabbits. En: Rubanyi GM, Vanhoutte P, editors. *Endothelium-derived contracting factors*. Basel: S Karger, AG., 1990; p. 162-9.
37. Simonsen U, Ehrnrooth E, Gerdes LU, Faergemann O, Buch J, Andreasen F, et al. Functional properties in vitro of systemic small arteries from rabbits fed a cholesterol-rich diet for 12 weeks. *Clin Sci (Lond)* 1991;80:119-29.
38. Chilian WM, Dellsprenger KC, Layne SM, Eastman CL, Armstrong MA, Marcus ML, et al. Effects of atherosclerosis on the coronary microcirculation. *Am J Physiol* 1990;258:H529-39.
39. Nanda V, Henry PD. Increased serotonergic and alpha-adrenergic receptors in aortas from rabbits fed a high cholesterol diet. *Clin Res* 1982;30:A209.