



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Efecto del licopeno en el desarrollo de la hipertensión y prevención del estrés oxidativo

Pedro Miguel Ferreira Santos

*Trabajo presentado en el Instituto Politécnico de Bragança y en la
Universidad de Salamanca para la obtención del título de Máster en
Farmacia y Química de Productos Naturales*

Tutorizado por:

Dra. M^a Ángeles Sevilla Toral

Dra. M^a José Montero Gómez

Dra. Rosalía Carrón de la Calle

Bragança/Salamanca

2013

Esta Tesis de Master ha sido financiada con las siguientes ayudas

Proyecto de Investigación en Biomedicina. BIO/SA86/13

“ANTIOXIDANTES DE ORIGEN NATURAL EN LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: HIPERTENSIÓN Y LICOPENO”.

Concedido por la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León.

Duración: 1 año

Resolución del 14 de noviembre de 2013 (BOCYL nº 222, de 18 de noviembre de 2013).

Beca del programa “Prácticas Erasmus. Mobilidade para Estagio Profissional” financiado por “Direcção Geral de Educação e Cultura” de la EU y pelo Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. 2013.

***"DIFICULTADES PREPARAN PERSONAS
COMUNES PARA DESTINOS EXTRAORDINARIOS"***

C. S Lewis

AGRADECIMENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis tutoras, **Dras. M^a José Montero, Rosalía Carrón y M^a Ángeles Sevilla** por apoyarme, enseñarme y ayudarme en la realización de este trabajo. También quiero agradecerles por la amistad y dedicación que me proporcionaron durante estos meses en que trabajamos juntos.

Agradecer también a las Dras. Asunción, Mónica, María Luisa, Ana Vega y al Dr. Luis San Román, profesores e investigadores del Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología por la disponibilidad y amistad que me ofrecieron, sin olvidar a Emilia, Javier, Rubén, Álvaro, “Cristinas” y José que de una forma u otra me ayudaron en cualquier situación.

Quiero agradecer al Departamento de Fisiología y Farmacología y también al Servicio de Histología y Banco de Tumores del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca, por la ayuda que me han dado en algunos aspectos del trabajo realizado.

A la profesora e investigadora Dra. Isabel Ferreira y al GRI del Instituto Politécnico de Bragança por la ayuda en la obtención de la beca del programa “Platicas Erasmus. Mobilidade para Estágio Profissional”, financiado por “Direcção Geral de Educação e Cultura” de la EU y pelo Instituto Politécnico de Bragança, un muchísimo “Obrigado”.

Agradecimiento a la Sociedad Española de Farmacología por la concesión del premio de mejor poster presentado en el XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacología, con algunos resultados de este trabajo.

A toda mi familia, principalmente a mis padres por estar siempre conmigo y por ser las personas más importantes en mi vida. “A eles um grande abraço e um agradecimento especial”.

Por último dar las gracias a todos mis amigos, principalmente a René, Patricio, Rudy, Ana, Marisa, Luana y Ana Paula por vivir y escuchar algunas de mis historias durante esta estancia en Salamanca.

A TODOS UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo (48%). También en España y Portugal estas patologías afectan a un número importante de individuos, con un 30,5% y un 31% respectivamente, siendo la hipertensión arterial (HTA) el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de estas enfermedades, con una prevalencia de 30-45% en la población general, y una tendencia a aumentar con la edad. La HTA se puede definir como una elevación de los valores de presión arterial por encima de los valores considerados normales ($PAD \geq 90$ mmHg y $PAS \geq 140$ mmHg) que provoca alteraciones morfológicas y funcionales a nivel de varios órganos como corazón, vasos sanguíneos y riñón.

Diversos estudios han demostrado el efecto beneficioso de los antioxidantes en algunos estados patológicos como la hipercolesterolemia y la diabetes mellitus, entre otros.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y también que la relación de la HTA con el estrés oxidativo, nos planteamos como objetivo investigar el efecto del licopeno, un antioxidante natural abundante en el tomate, algunas frutas y legumbres, sobre la hipertensión y la prevención y/o reversión de alteraciones asociadas a este estado patológico, en un modelo de hipertensión inducida por la infusión de angiotensina II (Ang II).

Los experimentos se realizaron con ratas Wistar machos divididas en tres grupos. A dos grupos se les implantó vía subcutánea una minibomba osmótica que libera Ang II (288 μ g/kg/día) durante 14 días (Ang II) y uno de ellos se trató con 10 mg/kg/día de licopeno por vía oral (Ang II + L). El tercer grupo, sin ningún tipo de tratamiento se utilizó como control. Semanalmente se midió la presión arterial y se controló el peso. Al final del tratamiento, los animales se sacrificaron y se extrajeron varios órganos para posteriores estudios.

Los resultados obtenidos en este estudio nos indican que la infusión de Ang II aumentó progresivamente la presión arterial sistólica de 120 ± 2 a 208 ± 5 mmHg. En el corazón verificamos desarrollo de fibrosis y también de los índices de hipertrofia cardiaca en los grupos con Ang II comparativamente con el control ($2,46 \pm 0,05$ vs $1,85 \pm 0,09$ mg/g respectivamente). El tratamiento con licopeno atenuó significativamente el incremento de la presión arterial (150 ± 5 mmHg), redujo la deposición de colágeno

cardiaco y el índice de hipertrofia cardíaca ($2,00 \pm 0,06$ mg/g). En los vasos observamos que en aortas, el tratamiento con licopeno redujo el grosor de la pared arterial y el área seccional de la capa media comparando con el grupo Ang II. Los ensayos de reactividad vascular mostraron una pérdida de respuesta relajante dependiente de endotelio, por la infusión de Ang II, en arterias de resistencia que el licopeno a las dosis ensayadas no fue capaz de prevenir. En relación al estrés oxidativo el licopeno mostró su potencial antioxidante sobre la peroxidación lipídica.

En conclusión los resultados obtenidos muestran que el licopeno previene la hipertensión y la hipertrofia cardiovascular inducida por Ang II.

Palabras clave: enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, angiotensina II, licopeno, hipertrofia, estrés oxidativo.

RESUMO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em todo mundo (48%). Também em Espanha e Portugal estas patologias afectam a um número importante de indivíduos, com 30,5% e 31% respectivamente, sendo a hipertensão arterial o principal factor de risco associado ao desenvolvimento destas doenças, com uma prevalência de 30-45% na população geral, com tendência a aumentar com a idade. A hipertensão arterial pode definir como uma elevação dos valores de pressão arterial por cima dos valores considerados normais ($PAD \geq 90$ mmHg y $PAS \geq 140$ mmHg) que provoca alterações morfológicas e funcionais a nível de vários órgãos como o coração, vasos sanguíneos e rins.

Vários estudos demonstraram o efeito benéfico dos antioxidantes em algumas patologias como hipercolesterolemia e diabetes mellitus.

Tendo em conta estes antecedentes e também que a hipertensão arterial está associada com o stress oxidativo, investigamos o efeito do licopeno, um antioxidante natural abundante em algumas frutas e legumes como no tomate, sobre a hipertensão e a prevalência e/ou reversão das alterações associadas a este estado patológico, num modelo de hipertensão induzida por infusão de angiotensina II (Ang II).

Os estudos realizaram-se com ratos Wistar machos divididos em três grupos. A dois grupos implantou-se por via subcutânea uma minibomba osmótica que libera Ang II (288 μ g/kg/dia) durante 14 dias (Ang II) e um deles tratou-se com 10 mg/kg/dia de licopeno por via oral (Ang II + L). O terceiro grupo, que não recebe nenhum tipo de tratamento utilizou-se como controlo. Semanalmente mediu-se a pressão arterial y controlou-se o peso corporal. No final do tratamento, os animais sacrificam-se y se extraíram vários órgãos para posteriores estudos.

Os resultados obtidos neste estudo indicam-nos que a infusão de Ang II aumentou progressivamente a pressão arterial sistólica de 120 ± 2 a 208 ± 5 mmHg. No coração verificamos um desenvolvimento de fibrose e dos índices de hipertrofia nos grupos com Ang II comparando com o grupo controlo ($2,46 \pm 0,05$ vs $1,85 \pm 0,09$ mg/g respectivamente). O tratamento com licopeno atenuou significativamente o desenvolvimento da pressão arterial (150 ± 5 mmHg), reduziu a deposição de colagénio cardíaco e os índices de hipertrofia cardíaca ($2,00 \pm 0,06$ mg/g). Nos vasos verificamos que em aortas, o tratamento com licopeno reduziu o grossor da parede arterial e a aria

seccional da capa media comparando com o grupo controlo. Os ensaios de reactividade vascular mostraram uma perda da resposta relaxante dependente do endotélio, por infusão de Ang II, em artérias de resistência que o licopeno com as doses ensaiadas não foi capaz de prevenir. Em relação ao stress oxidativo o licopeno demonstrou um potencial antioxidante na peroxidação lipídica.

Em conclusão os resultados obtidos mostram que o licopeno previne a hipertensão e a hipertrofia cardíaca induzida por Ang II.

Palavras chave: doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, angiotensina II, licopeno, hipertrofia, stress oxidativo.

ABSTRACT

Cardiovascular Diseases (CD) are the main cause of death in the world (48%). The rate of population affected by these diseases in Spain and Portugal is also high, 30% and 31% respectively. Hypertension is the highest risk factor associated with this condition, exhibiting an overall prevalence of 30-45% and a trending to increase with the age. Hypertension is defined as systolic blood pressure values ≥ 140 mmHg and diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg, causing morphological and functional disturbances in diverse organs including heart, peripheral vessels and kidneys.

Many studies have demonstrated the positive effect of antioxidants in diverse pathological diseases like hypercholesterolemia and diabetes mellitus. Bearing in mind not only these antioxidant effects but also the association of hypertension with oxidative stress, we conducted the present study to evaluate the effect of lycopene (a natural antioxidant found in tomatoes, some fruits and vegetables) on hypertension and prevention or regression of changes associated with this pathological condition, using a model of hypertension induced by angiotensin II (Ang II) infusion.

Male Wistar rats allocated in three groups were used for the experiment. Two groups were implanted with a subcutaneously osmotic minipump for Ang II infusion (288 μ g/kg/day) during 14 days (Ang II). One of these groups underwent oral administration of lycopene 10 mg/kg/day (Ang II + L). The remaining group (control group) did not receive any treatment. The systolic blood pressure and body weight was measured weekly. At the end of treatment, rats were sacrificed and organs were extracted for further studies.

Our results showed that Ang II infusion elicited a progressive increasing SBP (120 \pm 2 to 208 \pm 5 mmHg). Moreover, Ang II groups exhibited higher levels of fibrosis and higher index of cardiac hypertrophy than control group (2.46 \pm 0.05 vs 1.85 \pm 0.09 mg/g respectively). Lycopene treatment caused a significant reduction of blood pressure levels (150 \pm 5 mmHg), reduced fibrosis and cardiac hypertrophy index (2.00 \pm 0.06 mg/g). The histological study in aortic sample showed that lycopene treatment group exhibited lower arterial wall thickness and tunica media's cross sectional area than Ang II group. The reactivity assays carried out in mesenteric arteries indicated an impairment of endothelium dependent relaxation response in Ang II group that lycopene treatment was unable to prevent.

Regarding the improvement of oxidative stress, lycopene demonstrated antioxidant capacity by its ability to prevent lipid peroxidation.

In conclusion, our results found that lycopene prevent hypertension and cardiovascular hypertrophy induced by Ang II.

Keywords: cardiovascular disease, hypertension, angiotensin II, lycopene, hypertrophy, oxidative stress.

ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico	HTA: hipertensión arterial
ACh: acetilcolina	HVI: hipertrofia ventricular izquierda
Ang II: angiotensina II	IC: insuficiencia cardiaca
BH₄: tetrahidrobiopterina	KPSS: solución hiperpotásica (120 mM)
CMLV: células del músculo liso vascular	LDL: lipoproteínas de baja densidad
COX: ciclooxigenasa	MDA: malondialdehído
CSA_m: área seccional de la capa media	MO: minibomba osmótica
ECA: enzima convertidora de angiotensina	MPO: mieloperoxidasa
ECV: enfermedad cardiovascular	NADPH: nicotinamida adenin-dinucleótido fosfato reducido
EEM: error estándar de la media	NO: óxido nítrico
E_{max}: efecto máximo	NOS: óxido nítrico sintasa
ERO: especies reactivas de oxígeno	eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
FE: fenilefrina	NTP: nitroprusiato sódico
FHDE: factor hiperpolarizante derivado del endotelio	O₂^{•-}: anión superóxido
FRCV: factores de riesgo cardiovascular	OH: radical hidroxilo
FRDE: factor relajante derivado del endotelio	PAS: presión arterial sistólica
GSH: glutatión reducido	RCV: riesgo cardiovascular
HDL-colesterol: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad	SOD: superóxido dismutasa
H₂O₂: peróxido de hidrógeno	SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona
HOCl: ácido hipocloroso	TGF-β: factor de crecimiento transformante β
HR: hipertrofia renal	W_m: grosor de la capa media
	XO: xantina oxidasa

Índice

Introducción

1. Enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo 3
2. Hipertensión arterial 7
3. Estrés oxidativo e hipertensión 13
4. Licopeno 17

Objetivos

23

Metodología

1. Diseño experimental 27
2. Control de la presión arterial sistólica 29
3. Peso corporal 30
4. Estudios morfo-histológicos en corazón y riñón 30
 - 4.1 Hipertrofia cardiaca y renal 30
 - 4.2 Fibrosis cardiaca 30
5. Determinación de colágeno en corazón 31
6. Estudios morfo-histológicos en arteria aorta 32
7. Estudios de funcionalidad: arterias mesentéricas 33
8. Estudios de funcionalidad: arteria aorta 35
9. Determinación de los indicadores de estrés oxidativo 37
 - 9.1 Peroxidación lipídica 37
 - 9.2 Determinación del anión superóxido 38
10. Expresión y análisis estadístico de los resultados 39

Resultados y discusión

1. Control de la presión arterial sistólica y peso corporal 43
2. Estudios morfo-histológicos en corazón y riñón 45
3. Determinación de colágeno en corazón 46
4. Estudios morfo-histológicos en arteria aorta 46
5. Estudios de funcionalidad: arterias mesentéricas 53
6. Estudios de funcionalidad: arteria aorta 56
7. Peroxidación lipídica 60
8. Determinación del anión superóxido 61

Conclusiones

65

Bibliografía

69

Anexos

77

Introducción

1. Enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo (48%), seguidas del cáncer (21%) y las enfermedades respiratorias crónicas (12%). Se calcula que los factores comportamentales, entre ellos, el consumo de tabaco, el sedentarismo, la dieta inadecuada y el uso nocivo de alcohol, son responsables de alrededor de 80% de las ECV. En 2011 se produjeron más de 16,5 millones de muertes por causa de ECV, atribuibles principalmente a valores de tensión arterial alta (13%), consumo de tabaco (9%), hiperglucemia (6%), sedentarismo (6%), sobrepeso y obesidad (5%) e hiperlipidemia (1).

También en España y Portugal las patologías cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte y presentan una morbilidad elevada. En España los últimos datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), referidos a 2011 muestran que las ECV ocupan el primer puesto como causa de muerte (30,5%) siendo la isquemia cardiaca la responsable del mayor número, seguidas de los tumores (28,2%) y las enfermedades del sistema respiratorio (10,9%) (Figura 1) (2).

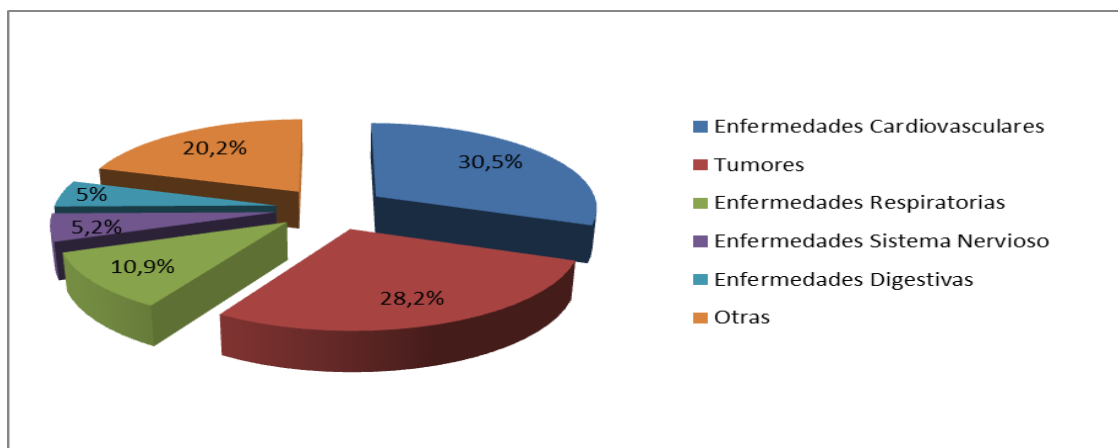


Figura 1. Principales causas de muerte en España en el año de 2011 (2).

Según las estadísticas del INE en Portugal, en el año de 2011 también destacan las ECV como la principal causa de muerte con un valor similar al de España (31%), obteniendo cifras más bajas de óbitos en las enfermedades tumorales (25%) (Figura 2) (3).

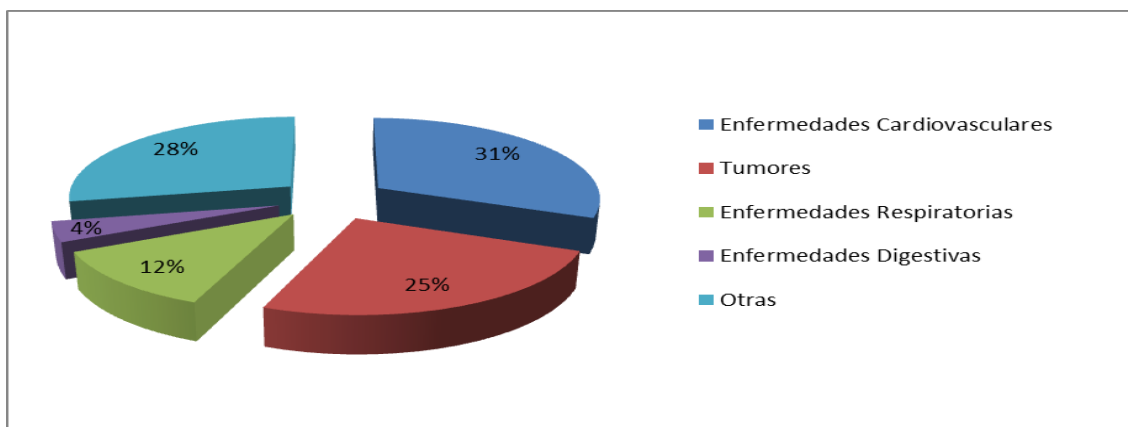


Figura 2. Principales causas de muerte en Portugal en el año de 2011 (3).

Si comparamos con nuestro entorno europeo, España y Portugal están por debajo de la media de la Unión Europea en defunciones debidas a enfermedades isquémicas del corazón (Figura 3). Una de las explicaciones para estos datos es nuestra alimentación con la llamada “dieta mediterránea”, caracterizada por un consumo elevado de frutas frescas, legumbres y verduras, pequeñas cantidades de grasas saturadas y una alta proporción de ácidos grasos insaturados, particularmente aceite de oliva y probablemente el consumo moderado de vino tinto, preferiblemente con las comidas, es también beneficioso (4,5). Estos datos se verifican en estudios estadísticos realizados en Europa, donde se establece la relación inversa entre la tasa de muerte por ECV y el consumo de frutas y verduras (6).

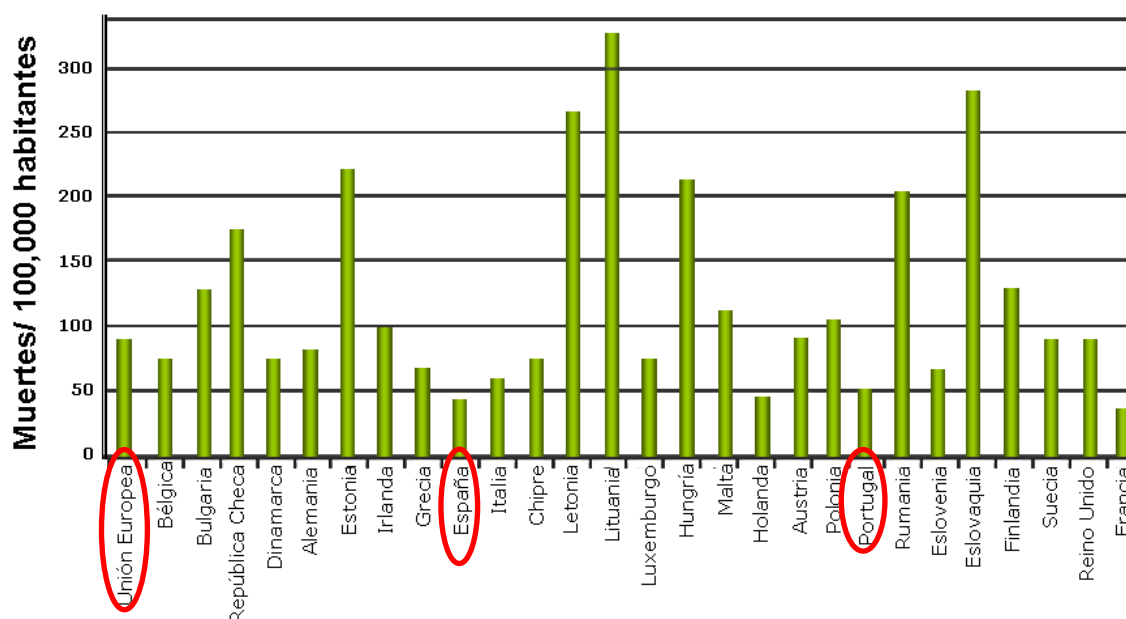


Figura 3. Defunciones debidas a enfermedades isquémicas del corazón en hombres y mujeres de diferentes países europeos (tomada de Eurostat, 2009) (6).

Datos del 2008 a excepción de Dinamarca, Luxemburgo, Portugal (2006) Bélgica (2004) Polonia, Italia, Rumanía, Malta, Reino Unido.

Para que se pueda instaurar un proceso de prevención o de reducción de las ECV es necesario conocer los principales **factores de riesgo cardiovascular** (FRCV). Los estudios FRAMINGHAM y SCORE, quizás sean los modelos de estudio epidemiológicos más importantes que se han realizado sobre ECV y los factores de riesgo asociados a esas enfermedades (7,8). Estos estudios han sido una gran ayuda para la identificación de los FRCV más importantes como la hipertensión, hipercolesterolemia, tabaco, diabetes mellitus, obesidad, etc. y han aportado información valiosa sobre otros factores relacionados con la edad, sexo, disminución de HDL-colesterol, o ciertos factores dependientes del entorno, como puede ser la alimentación (9).

Los factores de riesgo pueden clasificarse como modificables y no modificables, los primeros son aquellos que pueden ser corregidos o eliminados con modificaciones del estilo de vida, como tabaquismo, hipertensión, dislipidemia, obesidad, diabetes mellitus y sedentarismo. Los no modificables son aquellos inherentes a la persona, como la edad, el sexo o la historia familiar (9).

Un meta análisis de 48 estudios transversales realizados en España entre 1990 y 2003, analiza la prevalencia de los diferentes FRCV en la población española (10), del estudio se destacan una serie de datos que se reflejan en la tabla 1.

	% Total	% Hombres	% Mujeres
Hipertensión arterial	33,9	34,8	33,0
Tabaquismo	32,7	41,1	24,3
Hipercolesterolemia	21,9	20,9	22,8
Obesidad	20,6	17,9	23,2
Diabetes	10,1	11,7	8,4

Tabla 1. Factores de riesgo cardiovascular en la población española (10).

Estos factores de riesgo están asociados a cambios estructurales y funcionales a nivel cardiovascular, incluyendo la disfunción endotelial, que si no se corrige terminará en daño vascular (11).

2. Hipertensión arterial

La prevalencia de la hipertensión arterial (HTA) se sitúa en un 30-45% de la población general, con un claro aumento con la edad. La HTA no tiene una etiología exacta conocida en el 95% de los casos (hipertensión esencial), solamente un 5% de los pacientes hipertensos tiene hipertensión secundaria (12).

Según la OMS en España la prevalencia de HTA en personas con más de 25 años es del 36,7% siendo un poco más elevada en Portugal donde alcanza el 41,9%, según datos del año de 2011 (1).

La HTA podría simplemente definirse como una elevación crónica de la presión arterial (sistólica y/o diastólica) por encima de los valores normales. En la práctica clínica resulta difícil saber que niveles tensionales deben considerarse normales y cuales son elevados, puesto que no se trata de valores fijos. Las cifras de tensión arterial se modifican con la edad, sexo, raza y otros muchos factores, además de modificarse a lo largo del día en cada individuo en relación con diferentes determinantes, como el ejercicio, el frío, la digestión o la carga emocional (12).

Diversos grupos de expertos en HTA han llegado a un consenso para hacer una clasificación en función de los valores de presión arterial como refleja la tabla 2 (12).

Categoría	Sistólica (mmHg)		Diastólica (mmHg)
Óptima	< 120	y	< 80
Normal	120-129	y/o	80-84
Normal-Alta	130-139	y/o	85-89
HTA grado 1	140-159	y/o	90-99
HTA grado 2	160-179	y/o	100-109
HTA grado 3	≥ 180	y	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	y	< 90

Tabla 2. Clasificación de la presión arterial (12).

Sin embargo es evidente que la elevación de la presión arterial implica a múltiples sistemas y órganos y la participación de multitud de factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos queremos resaltar la importancia de la dieta y las recomendaciones de las autoridades sanitarias en relación al consumo de frutas y verduras, como medida de prevención (13).

Los factores más importantes en el desarrollo de la HTA incluyen la activación del sistema nervioso simpático, regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y los procesos inflamatorios a nivel vascular. Estudios más recientes también implican el estrés oxidativo y el sistema inmunológico (14).

El **SRAA** (Figura 4) es un mecanismo fisiológico importante en la regulación homeostática de la presión arterial. Este sistema está constituido por varios péptidos entre los cuales el octapéptido angiotensina II (Ang II), se sintetiza a partir de Ang I por la acción de una enzima peptidil-dipeptidasa denominada enzima convertidora de angiotensina (ECA) (15,16).

La Ang II es conocida por causar aumento directo e indirecto de la presión arterial, lo cual es dosis-dependiente. La Ang II aumenta el volumen circulatorio estimulando la secreción de vasopresina y de aldosterona. El volumen circulatorio aumentado, asociado a un mayor estímulo simpático, proporciona una elevación del gasto cardiaco que junto con la acción vasoconstrictora provocada por Ang II elevan la presión arterial (17).

La Ang II también presenta efectos en la producción de radicales libres que generan una reacción inflamatoria vascular. La enzima NADPH oxidasa es una importante fuente de radicales libres y representa la principal fuente de radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en la hipertensión (18,19).

Este péptido actúa también como un factor de crecimiento. En particular, este estímulo proliferativo e hipertrófico en las células vasculares del músculo liso ocurre por medio de la activación de receptores AT_1 (20,21).

La Ang II también tiene efectos directos o indirectos sobre el corazón, los cuales afectan a la frecuencia cardiaca, la contracción y el crecimiento celular, induciendo cambios en la forma, composición y tamaño de este órgano. Estos cambios llevan a un proceso llamado remodelado cardiaco, con alteraciones que incluyen hipertrofia,

acúmulo de colágeno intersticial y perivascular que provocan fibrosis cardíaca y proceso de muerte celular miocárdica (22).

Los efectos promotores del crecimiento inducidos por Ang II están mediados por diferentes factores como el factor de crecimiento de los fibroblastos, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante de tipo beta (TGF- β) y factor de crecimiento del tejido conjuntivo (18).

Ang II provoca apoptosis de células musculares que se reduce bloqueando los receptores AT₁. En los vasos, en situaciones de agresión cardíaca provocada por la Ang II, también se identifican citocinas inflamatorias en los tejidos y en la circulación, en especial el TGF- β , por la activación del receptor AT₁ (23,24).

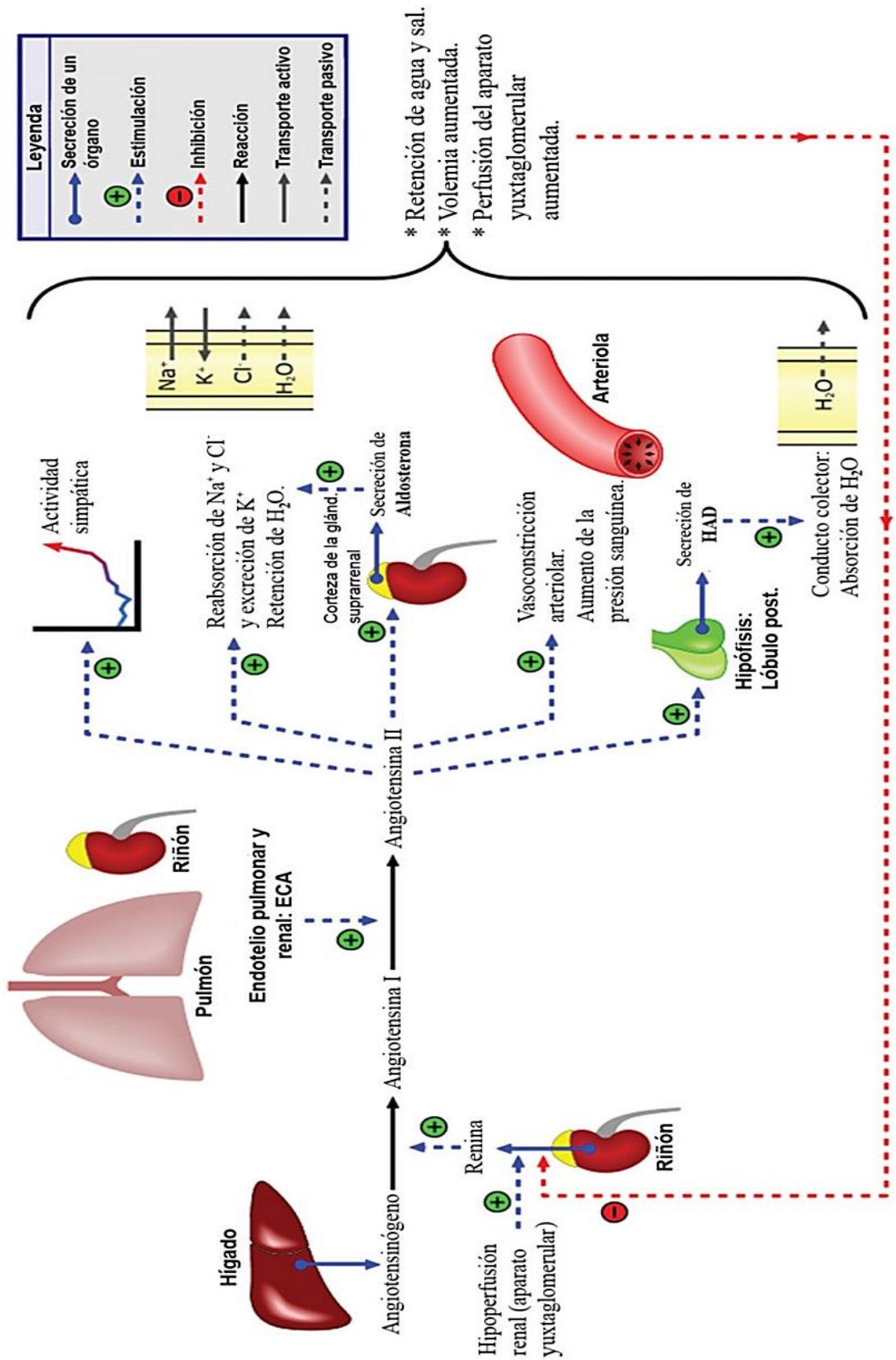


Figura 4. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Adaptada de la referencia 16.

➤ **Repercusiones orgánicas de la HTA**

Las cifras elevadas de presión arterial no determinan ningún tipo de sintomatología, sin embargo la HTA va produciendo daño en órganos diana como el corazón, los vasos sanguíneos y el riñón. Estos órganos son los elementos más importantes de la regulación de la presión arterial y quizás por ello son los que sufren de forma más directa el impacto de la hipertensión (12).

• **Repercusiones cardiacas**

El conjunto de alteraciones que sufre el corazón como consecuencia de HTA se conoce como cardiopatía hipertensiva. Todos los componentes del miocardio (células, matriz extracelular,...) se ven afectados, siendo la hipertrofia miocitaria, la fibrosis intersticial y el remodelado de las arterias coronarias las lesiones histológicas más importantes. Los principales criterios de diagnóstico de cardiopatía hipertensiva son la insuficiencia cardiaca y la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) (25).

La HVI supone un aumento de masa miocárdica que no se acompaña de un incremento paralelo de los vasos coronarios, lo cual supone una reducción de la reserva coronaria. La HVI es un proceso adaptativo, que constituye un mecanismo compensador para mantener el volumen minuto adecuado, frente al aumento de la resistencia periférica, pero cuando se sobrepasa una determinada masa crítica en el ventrículo izquierdo, se transforma en un proceso patológico (25).

• **Repercusiones sobre los vasos y disfunción endotelial**

La elevación crónica de la presión arterial se asocia a cambios en la morfología y función de los elementos del sistema vascular, dando lugar a la readaptación vascular. Este fenómeno relativo responde a la necesidad de mantener constante la tensión de la pared.

El endotelio, está constituido por una única capa de células planas situado en la capa íntima de la pared arterial (Figura 5), lo que le permite actuar como receptor y transmisor de señales entre la sangre y el músculo liso vascular, es capaz de detectar variaciones químicas (presión de oxígeno), mecánicas (cambios hemodinámicos de presión) y humorales (modificaciones de factores circulantes o locales y sus

interacciones con las plaquetas o los leucocitos), respondiendo a estos cambios, mediante la síntesis de numerosos factores biológicamente activos (vasoconstrictores y vasodilatadores) que regulan la angiogénesis, las respuestas inflamatorias, la hemostasis, así como el tono y la permeabilidad vascular. Cuando el endotelio no consigue modular estas funciones hablamos de **disfunción endotelial** (11,26).

La pared vascular también recibe señales a través de los *vasa vasorum* (pequeños vasos sanguíneos que se encuentran alrededor de las paredes de los grandes vasos) y de la inervación de su capa adventicia.

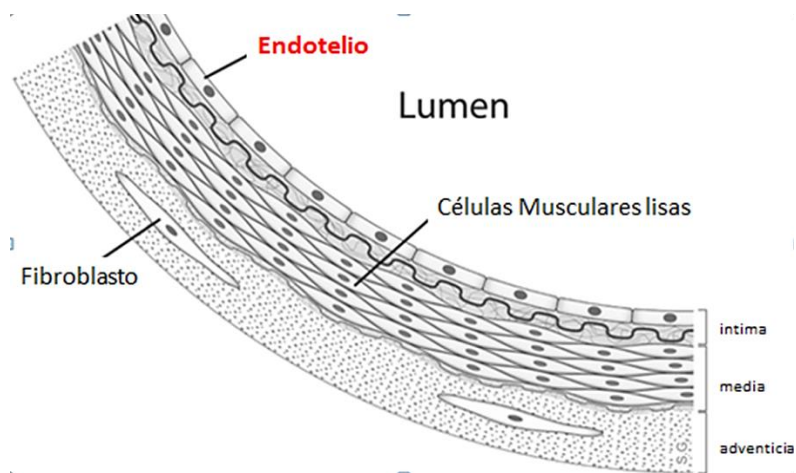


Figura 5. Anatomía de la pared arterial. Adaptado de la referencia 27.

- **Repercusiones sobre los riñones**

Los riñones como consecuencia de una presión arterial elevada, pueden padecer de varias disfunciones, tales como microalbuminuria, fibrosis tubulointersticial del parénquima renal, isquemia renal crónica, reducción de la tasa de filtrado glomerular por la pérdida de nefronas, pudiendo desencadenar insuficiencia renal crónica (12).

3. Estrés oxidativo e hipertensión

La relación entre el desarrollo de la hipertensión y el **estrés oxidativo**, debido a una mayor biodisponibilidad de especies reactivas de oxígeno (ERO), una reducción de la capacidad antioxidante del organismo, o ambas circunstancias, se ha demostrado en numerosos modelos de hipertensión en animales y humanos (28,29).

Fisiológicamente las ERO regulan procesos celulares, tales como la diferenciación, la proliferación, la apoptosis, el ciclo celular, la migración, la secreción, la organización del citoesqueleto, la activación de factores de transcripción y la expresión de genes. En el sistema vascular las ERO juegan un papel fisiológico en el control de la función endotelial y del tono vascular. Niveles fisiopatológicos de ERO dan lugar a una serie de efectos nocivos en el organismo humano (Figura 6). En el cerebro aumentan la producción y liberación de neurotransmisores vasoactivos, lo que a su vez, puede aumentar o disminuir la resistencia vascular, un efecto que influye en la presión arterial. En el riñón las ERO aumentan la producción y la liberación de muchos agentes vasoactivos, incluyendo la Ang II y aldosterona, lo que a su vez, influye en la función cardíaca, vascular y renal a través de procesos redox-sensibles. Las ERO influyen en procesos que están involucrados en el remodelado vascular, disfunción endotelial, fibrosis e inflamación, que son rasgos característicos en la hipertensión. Por otra parte, en el corazón, las ERO también se relacionan con un aumento de la contractilidad, fibrosis y remodelado cardíaco, dando lugar a un aumento del gasto cardíaco y de la presión arterial (14).

Todos estos efectos de las ERO están relacionados con el desarrollo de la hipertensión y el daño a órganos diana, lo que predispone al riesgo de accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca y enfermedad renal crónica (14,30,31).

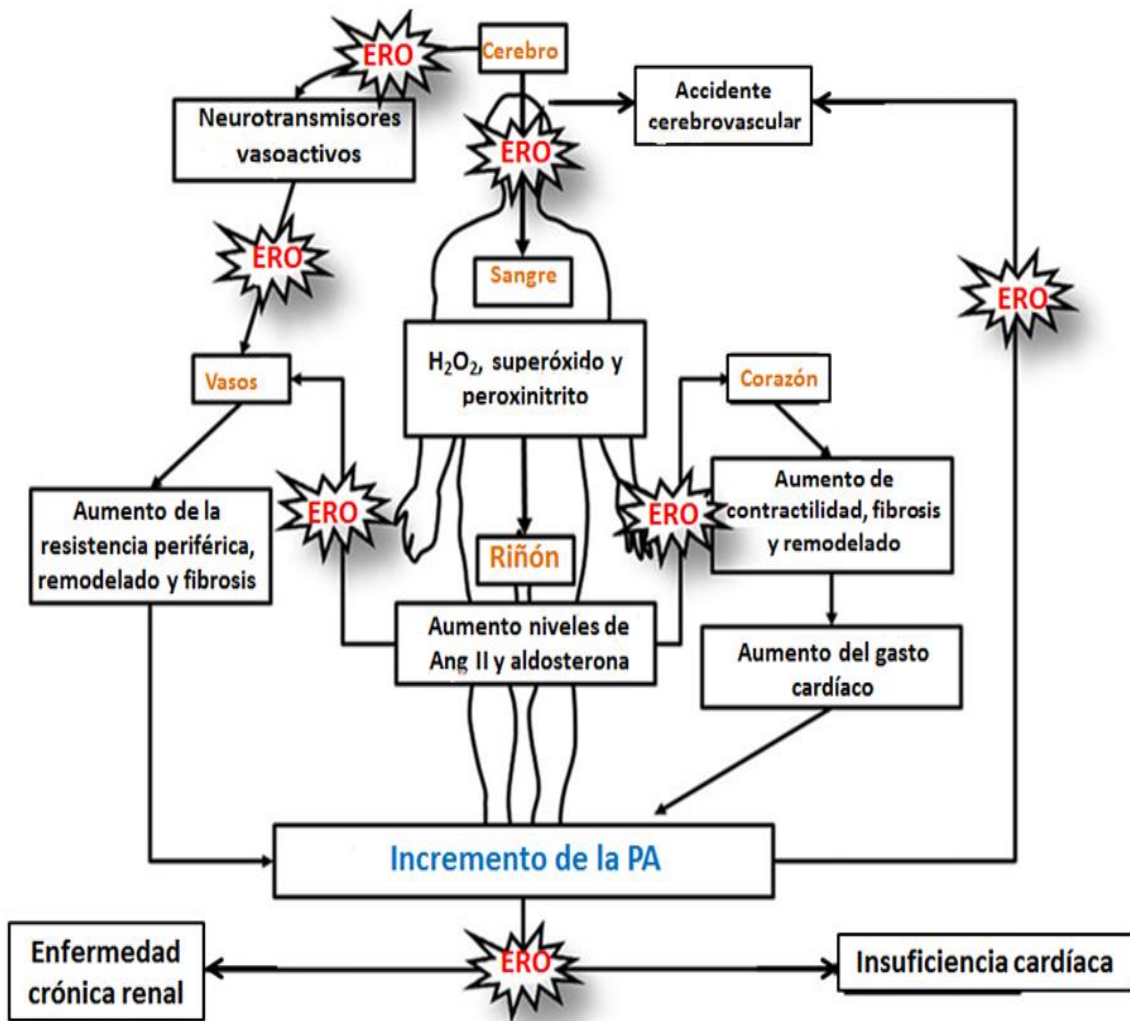


Figura 6. Estrés oxidativo sistémico en los seres humanos: implicaciones en hipertensión. Adaptado de la referencia 14.

En las células hay múltiples fuentes celulares de formación de ERO y diferentes enzimas que las producen en función de diversas circunstancias. Además de la cadena respiratoria en las mitocondrias, los radicales O_2^- pueden producirse por la ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa, el citocromo P₄₅₀, la xantina-oxidasa (XO), la NO sintasa endotelial (eNOS) desacoplada y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa (NADPH-oxidasa) (Figura 7). El O_2^- se puede convertir en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Posteriormente el H_2O_2 puede convertirse espontáneamente en radical hidroxilo (OH^\cdot) extremadamente reactivo a través de la reacción de Fenton. El H_2O_2 puede también transformarse a través de la glutatión peroxidasa (GSH), catalasa o tioredoxina peroxidasa a H_2O y O_2 . La mieloperoxidasa (MPO) puede utilizar H_2O_2 para oxidar el cloruro a ácido hipocloroso

oxidante (HOCl) que puede clorar y así inactivar diferentes biomoléculas incluyendo las lipoproteínas o L-arginina, el sustrato de eNOS. Además de la generación de HOCl, MPO también puede oxidar (y por lo tanto inactivar) el óxido nítrico (NO) a nitrito (NO_2^-) en los vasos (32-34).

NADPH-oxidasa: numerosos estudios han identificado una oxidasa asociada a la membrana plasmática como la principal fuente de ERO en los vasos, situada tanto en el endotelio como en las capas media y adventicia. La activación de esta enzima produce gran cantidad de señales intracelulares que pueden desembocar en disfunción endotelial, proliferación de las células del músculo liso vascular, expresión de genes pro-inflamatorios y síntesis de la matriz extracelular (34-36).

La actividad y la expresión de la NADPH-oxidasa está regulada por citocinas, hormonas y factores físicos tradicionalmente implicados en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. En particular, la Ang II es un importante activador de la NADPH-oxidasa vascular e induce también un aumento en la expresión de sus subunidades, tanto en células endoteliales como musculares. Así, mediante la infusión continua de Ang II en ratas, se observa como la producción vascular de O_2^- y la actividad de la NADPH-oxidasa se ven notablemente incrementadas (34,36,37).

XO: es una óxido-reductasa que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina durante el metabolismo de las purinas. Reduce el oxígeno molecular para formar radicales O_2^- y H_2O_2 (34,38).

eNOS desacoplada: la eNOS puede generar O_2^- en lugar de NO cuando hay deficiencias en la concentración de su sustrato, L-arginina, o de su cofactor, BH_4 . Este cofactor es fundamental para la actividad de la eNOS pues estabiliza la enzima en su forma dimerica y participa en los procesos de transferencia de electrones durante los procesos catalíticos. Su ausencia produce cambios en la eNOS, se altera su estructura como dímero y se favorece la generación de O_2^- (34,39,40).

Fisiológicamente, la generación de ERO está estrechamente regulada por antioxidantes celulares endógenos, que incluyen SOD, catalasa, tiorredoxina, glutatión, y vitaminas antioxidantes como se indicó anteriormente y se presenta en la figura 7 (34).

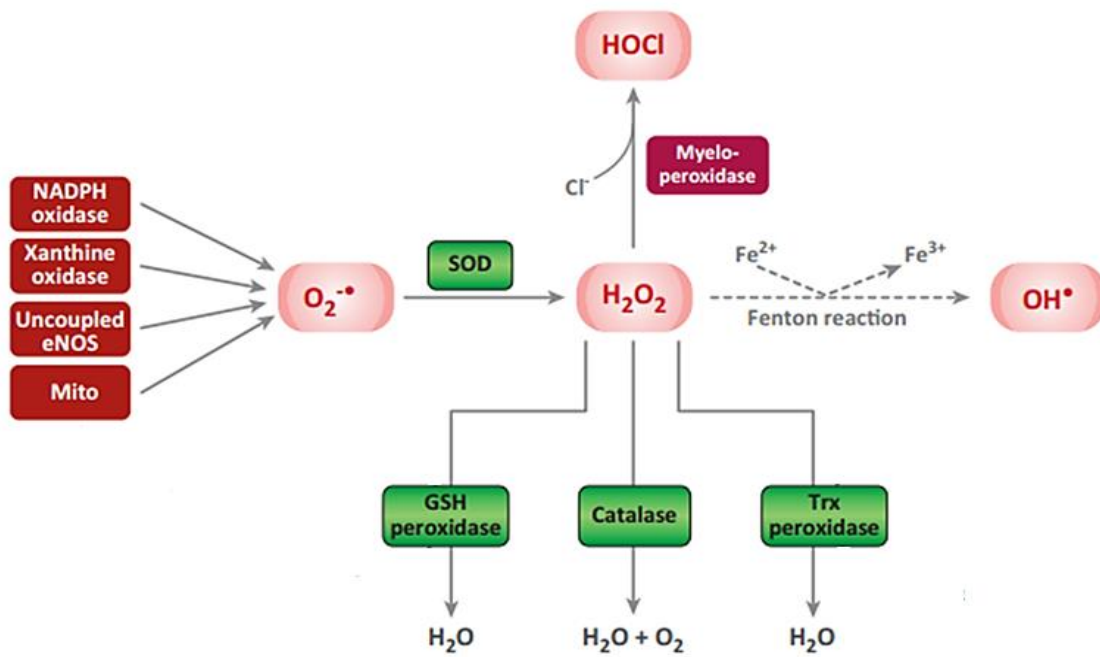


Figura 7. Enzimas implicadas en la generación y la inactivación de las especies reactivas de oxígeno. Adaptada de la referencia 34.

En los últimos años se han descrito una serie de asociaciones entre diferentes estados patológicos como la hipertensión, la arteriosclerosis o la diabetes con una mayor producción de ERO, en particular de radicales $O_2^{\bullet-}$, por parte de la NADPH-oxidasa (41).

En el organismo humano, como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen **radicales libres** que pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. Esta peroxidación lipídica juega un papel importante en la patogénesis de diversas enfermedades, como la hipertensión (42,43).

4. Licopeno

Un gran número de ensayos epidemiológicos, clínicos y farmacológicos sugieren que dietas que contienen concentraciones significativas de **antioxidantes** naturales reducen la presión arterial y el riesgo cardiovascular (44-46). Antioxidante es una sustancia que, a concentraciones bajas en el organismo, es capaz de prevenir o retrasar significativamente la oxidación de sustratos susceptibles, o sea evita el daño causado por los radicales libres, ayudando en la prevención del estrés oxidativo (47).

Los tomates, principalmente la piel, y sus productos derivados son las mayores fuentes naturales de licopeno y se consideran una fuente importante de carotenoides en la dieta humana. Normalmente los tomates contienen entre 3 y 5 mg por 100 gramos de material crudo. Otras fuentes de licopeno son la sandía, la guayaba rosa, el pimiento rojo y la papaya (48,49).

El **licopeno** cuya fórmula molecular es $C_{40}H_{56}$, es uno de los 600 carotenoides encontrados en la naturaleza y uno de los 25 encontrados en el plasma y tejidos humanos. Es un carotenoide responsable de la coloración roja de varias frutas y hortalizas que se sintetiza exclusivamente por microorganismos y plantas y que carece de actividad pro-vitamina A por no contar con la estructura de anillo β -ionona (Figura 8) (49).

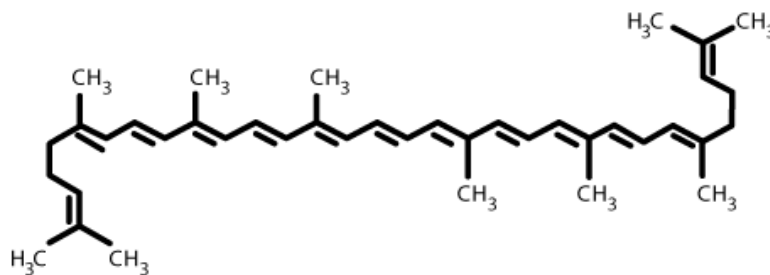


Figura 8. Estructura química del licopeno.

Respecto a los mecanismos de protección de las ECV se ha observado que el licopeno presenta las siguientes acciones: antiagregante plaquetaria *in vivo* e *in vitro* al inhibir la agregación inducida por adenosín difosfato (ADP) y colágeno, acción protectora del endotelio por su acción antioxidante al neutralizar las ERO reduciendo el daño oxidativo y acciones antioxidantes y antiaterogénica reduciendo la peroxidación de los lípidos y la oxidación de las LDL, disminuyendo los índices de LDL-colesterol. También se ha demostrado que estas moléculas con capacidad antioxidante son importantes en la prevención de los procesos oxidativos que se desencadenan en la oncogénesis, a través las siguientes actividades: antioxidante, activación de la apoptosis, disminución de la proliferación celular y disminución de la angiogénesis y metástasis (56).

Objetivos

Con todos los datos de mortalidad y morbilidad referidos anteriormente y sabiendo que la Ang II es un péptido que está implicado en el proceso hipertensivo, nos planteamos estudiar el efecto del licopeno en el desarrollo de la hipertensión y en la prevención y/o reversión de alteraciones asociadas a este estado patológico, en un modelo de hipertensión animal inducido por Ang II.

Nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar los efectos del tratamiento con licopeno sobre la presión arterial en ratas hipertensas por infusión de Ang II.
2. Investigar los efectos del tratamiento sobre el remodelado cardiovascular ocasionado por el proceso hipertensivo.
3. Investigar los efectos del tratamiento sobre la reactividad vascular, tanto de vasos de conductancia (arteria aorta) como de resistencia (arterias mesentéricas).
4. Determinar el efecto del tratamiento sobre el estrés oxidativo.

Metodología

1. Diseño experimental

Los experimentos se han realizado teniendo en cuenta las disposiciones legales existentes referidas a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos:

- a) Real Decreto 1201/2005. BOE 21 octubre 2005.
- b) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010.

Se utilizan ratas Wistar procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. El estudio comienza cuando los animales tienen 7 semanas de vida. Durante 1 semana se controla el peso y la ingesta de agua, datos que sirven posteriormente para calcular la concentración de licopeno que hay que preparar para administrar la dosis deseada (10 mg/kg/día).

Después de este periodo los animales se anestesian con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y a continuación se procede a la implantación subcutánea de una minibomba osmótica (MO) (Modelo 1002, Alzet, CA, USA). Para ello se realiza una pequeña incisión de la piel en la región dorsal y se introduce este dispositivo capaz de liberar de manera constante, mediante un mecanismo de intercambio osmótico, su contenido a velocidad controlada. Para este estudio se utilizaron MO que se rellenan con Ang II disuelta en una solución de ácido acético 0,01 N en suero fisiológico. Seleccionamos la dosis de Ang II de 288 µg/kg/día según referencias de trabajos experimentales previos de nuestro grupo (57).

El licopeno (Redivivo®, DMS NUTRICIONAL PRODUCTS, Suiza. Suministrado por la delegación de México), se administra disuelto en el agua de bebida, ajustando la concentración semanalmente en función del peso corporal y el consumo diario de agua. La disolución de licopeno se protege de la luz en frascos topacio para evitar su degradación.

Los animales se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales:

- ❖ **Control.** Ratas Wistar sometidas a la intervención quirúrgica necesaria para implantar la MO ($n=7$).
- ❖ **Ang II.** Ratas Wistar que reciben una infusión de Ang II (288 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) mediante una MO implantada durante 2 semanas ($n=7$).
- ❖ **Ang II+L.** Ratas Wistar que reciben una infusión de Ang II (288 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) mediante una MO implantada durante 2 semanas y durante este periodo reciben en el agua de bebida el tratamiento con licopeno (10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$) ($n=7$).

Una vez finalizados los tratamientos, las ratas se anestesian con pentobarbital sódico a la dosis de 60 mg/kg por vía intraperitoneal y se extraen muestras de sangre a partir del seno orbital. A continuación los animales se sacrifican y se procede a la extracción de la arteria aorta y del árbol vascular mesentérico, para la realización de estudios de funcionalidad. También se extraen el corazón y los riñones que se pesan y se congelan a -80°C para determinaciones posteriores. Durante el procesamiento de los órganos estos se mantienen en solución Krebs a 4°C , cuya composición se detalla en el anexo.

2. Control de la presión arterial sistólica

La presión arterial sistólica (PAS) se mide en la arteria caudal mediante un método incruento. Este método tiene la ventaja de ser simple, reproducible, no traumático y además permite trabajar con el animal despierto. Para obtener buenos resultados es conveniente habituar al animal a este tipo de manipulación antes de realizar las medidas definitivas, para lo cual a los animales se les mide la PAS al menos una semana antes del inicio de los tratamientos. Las medidas se realizan a la misma hora y en el mismo lugar, con una temperatura, ruido y limpieza adecuados para el bienestar de los animales.

Se utiliza un equipo CODA non-invasive blood pressure system (Kent Scientific Corporation, USA) que mediante un software y un equipo informático adecuado permite la obtención de valores de PAS (Figura 10). Las ratas se sitúan en un cepo de manera que la cola quede libre para poder colocar el manguito y el transductor que mide el volumen de sangre en la arteria caudal. El equipo dispone de una plataforma de temperatura controlada que permite la dilatación de la arteria caudal para captar mejor la señal.

Se determina el valor de PAS justo antes de comenzar el tratamiento y a los 7 y 14 días después del comienzo del mismo.

Los resultados relativos a la PAS se expresan en mmHg.

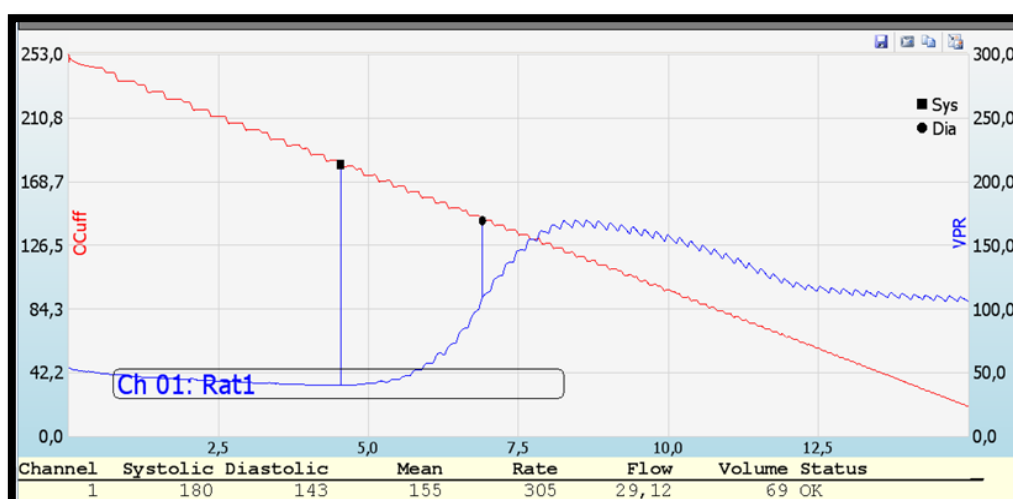


Figura 10. Detalle de un registro original de la presión arterial.

3. Peso corporal

Semanalmente se controla el peso de los animales, este valor sirve para realizar el ajuste de la concentración del fármaco según la dosis deseada y para evaluar los efectos del tratamiento sobre este parámetro. El peso en el momento del sacrificio se utiliza para la obtención de diversos índices de hipertrofia.

4. Estudios morfo-histológicos en corazón y riñón

4.1 Hipertrofia cardiaca y renal

Con el fin de evaluar el efecto de licopeno sobre dos de los órganos que se ven más afectados por la hipertensión, el corazón y los riñones, se evalúa la hipertrofia cardiaca y la hipertrofia renal.

Después de sacrificar los animales se extrae el corazón y el riñón izquierdo, el corazón se coloca inmediatamente en Krebs a 37 °C, aireado con carbógeno para mantener el latido y eliminar los restos de sangre y posteriormente se coloca en Krebs frío. Se eliminan cuidadosamente los restos de tejido graso, se separan las aurículas, se diseccionan el ventrículo derecho y el izquierdo dejando el septum interventricular como parte del ventrículo izquierdo. Sobre un papel de filtro se elimina el exceso de líquido y se pesa. Con el riñón se procede de igual forma después de separar la grasa que lo rodea.

La relación entre el peso del ventrículo izquierdo o del riñón y el peso corporal se utiliza como índice de HVI o hipertrofia renal (HR) respectivamente.

4.2 Fibrosis cardiaca

Una sección transversal del ventrículo izquierdo se fija en formol tamponado al 4%. Posteriormente se envían las muestras al Laboratorio de Histología del Servicio de Patología Molecular y Banco de Tumores del Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Universidad de Salamanca, donde se hace la inclusión de los tejidos, los cortes de 4-5 µm y la tinción con rojo sirio. Estos cortes se observan al microscopio óptico (Olympus

BX51, Japón) y las imágenes se captan mediante una cámara de alta resolución (Olympus DP70, Japón). Las imágenes tomadas con un objetivo de 20X se utilizan para la determinación de la fibrosis intersticial.

En los cortes teñidos con rojo sirio el colágeno aparece de color rojo. Se determina el colágeno intersticial utilizando el programa Adobe Photoshop CS2 (Microsoft). Se contabilizan los píxeles que ocupa el área de fibrosis y los que ocupa la imagen completa de un mínimo de 5 imágenes por corte.

La fibrosis cardiaca se expresa como % del área de fibrosis con respecto al área total de la imagen.

5. Determinación de colágeno en corazón

El proceso de formación de colágeno se inicia a partir de una molécula con estructura de triple hélice, con una secuencia de aminoácidos que se repite: glicina-prolina-hidroxiprolina, y un peso molecular de 300.000 Da (58). El contenido en prolina es mayor que en otras proteínas y la 4-hidroxiprolina es un aminoácido exclusivo del colágeno, por ello la cuantificación del colágeno de los tejidos puede hacerse de forma indirecta determinando el contenido de hidroxiprolina.

El método utilizado para la cuantificación de la hidroxiprolina en corazón se basa en la técnica descrita por Fort y cols. (59), modificado por Jamall y cols. (60). Esta técnica consiste en la liberación de hidroxiprolina de los homogeneizados tisulares por hidrólisis ácida. La hidroxiprolina libre se oxida por la cloramina T y la adición de reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído) da lugar a la formación de un cromóforo cuyo máximo de absorción está en 560 nm.

El tejido se homogeneiza en agua destilada obteniendo una relación peso/volumen del 10%. A continuación se mezcla una alícuota del homogeneizado con HCl 12 N en proporción 1:1 y se hidroliza durante 24 horas a 115 °C en un termobloque (Stuart SBH200D/3, Bibby Sterilin LTD, UK).

Se toman 100 µL del hidrolizado y se añaden 100 µL de NaOH (6 N) y 1000 µL de isopropanol al 50%. A continuación se añaden 200 µL de cloramina T (23,24 mM) y

después de 5 minutos se añaden 460 μL del reactivo Ehrlich (1,66 M). La mezcla obtenida se incuba durante 30 minutos a 60 °C y finalmente se lee la absorbancia a 560 nm. La concentración de hidroxiprolina en cada muestra se determinó a partir de una recta patrón elaborada con concentraciones conocidas de hidroxiprolina.

El contenido de colágeno se expresa en μg de hidroxiprolina/g tejido.

6. Estudios morfo-histológicos en arteria aorta

Las muestras de aorta se fijan en formol tamponado al 4% y se procesan de forma similar a como se describe para el ventrículo izquierdo en el apartado 4.2.

Una vez realizada la tinción, los cortes se observan al microscopio óptico (Olympus BX51, Japón), ajustando el objetivo a 4X para cada muestra de modo que se obtenga una visión completa de los anillos de aorta. Las imágenes se captan con la ayuda de una cámara de alta resolución (Olympus DP70, Japón) adaptada al sistema y posteriormente, utilizando el programa de procesamiento de imagen, *ImageJ* (US National Institutes of Health), se miden los siguientes parámetros:

Área interna (A_i), área del lumen del vaso.

Área externa (A_e), área delimitada por el margen exterior de la capa media.

Grosor de la capa media (W_m).

Cada medida se realiza por duplicado por un mismo observador, dando como valor de medida la media de ambos valores. A partir de estos valores se calculan los siguientes parámetros morfométricos:

Área seccional de la capa media. $CSA_m=(A_e-A_i)$

Radio interno. $R_i=\sqrt{\frac{A_i}{\pi}}$

Lumen. $L=(2 \times R_i)$

Los resultados para el lumen y el grosor de la capa media se expresan en μm y para el área seccional de la capa media en mm^2 .

7. Estudios de funcionalidad en arterias mesentéricas

Para los estudios de funcionalidad en arterias mesentéricas se utilizó un miógrafo de alambre (Multiwire Myograph System, DMT Modelo 610M, Dinamarca) (Figura 11). Después de extraer el mesenterio se localiza la tercera rama del árbol vascular mesentérico y se procede a la eliminación del tejido conectivo y graso que rodea esta arteria y, a continuación, se corta en anillos de aproximadamente 2 mm de longitud. A través de la luz de cada segmento se introducen dos alambres de acero inoxidable de 40 μm de diámetro, uno se coloca en la parte fija correspondiente al transductor, mientras que el otro se une a la parte móvil, que a su vez está unida a un tornillo micrométrico. Una vez que los anillos están montados en los baños, con solución Krebs a 37 °C y aireados con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂, Air Liquide España SA., España), se deja un periodo de estabilización de 20-30 minutos y posteriormente, se normalizan a una tensión equivalente a 90 mmHg según la técnica descrita por Mulvany (61).

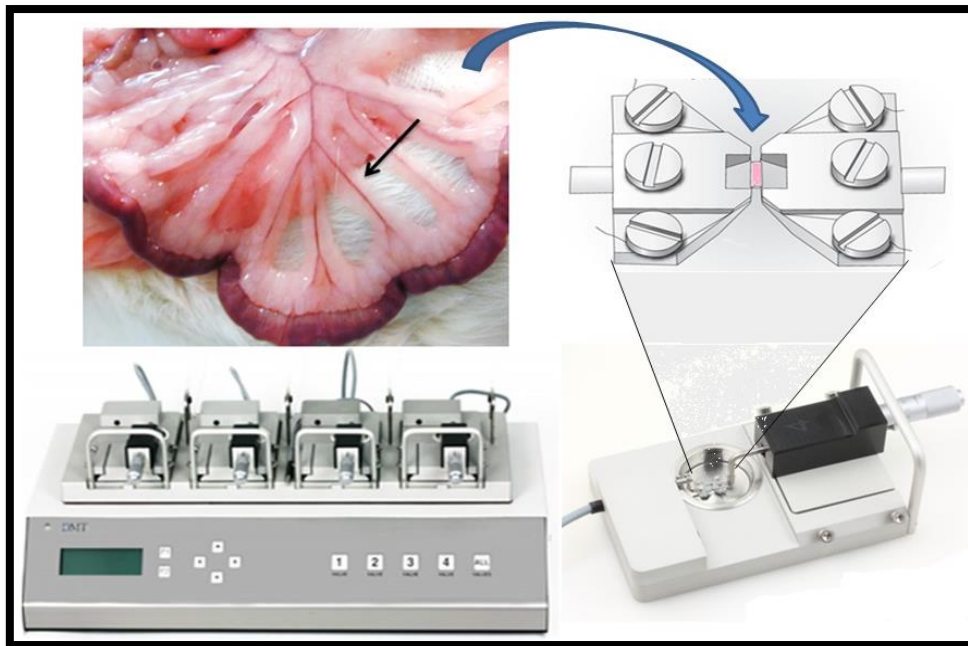


Figura 11. Aislamiento y montaje de arterias mesentéricas en el miógrafo de alambre.

Después de 15 minutos de estabilización se comprueba la funcionalidad del tejido añadiendo al baño una solución hiperpotásica (KPSS, 120 mM) cuya composición está descrita en el anexo. La respuesta contracturante se registra durante 5 minutos, después a continuación se lavan los anillos varias veces y se dejan estabilizar durante 20 minutos para que recuperen la tensión basal. En este momento se procede a la realización de los siguientes experimentos:

- **Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes**

Previa contracción de los anillos con fenilefrina (FE, 10^{-5} M) y una vez alcanzada una meseta de contracción estable, se realizan curvas acumulativas concentración-respuesta de los siguientes agentes relajantes: acetilcolina (ACh, 10^{-8} - 10^{-4} M), cuya acción relajante es endotelio dependiente o nitroprusiato sódico (NTP, 10^{-8} - 10^{-4} M) cuya acción relajante es independiente de la presencia del endotelio (Figura 12).

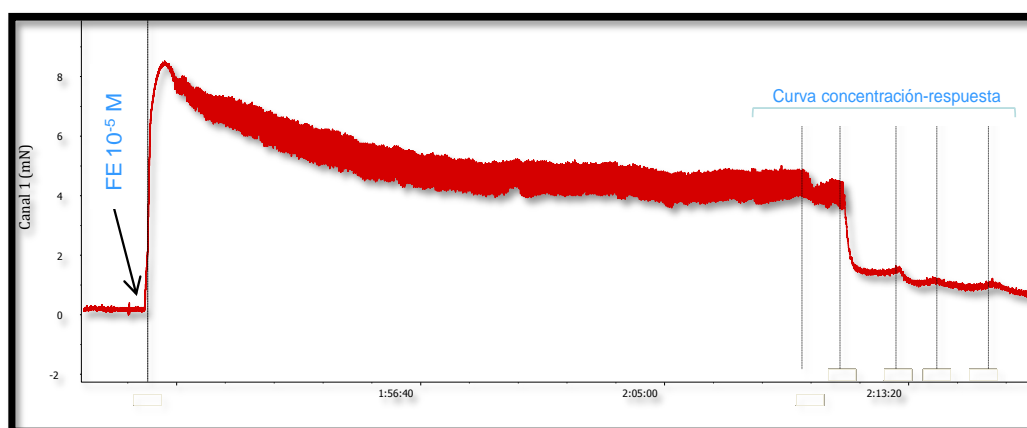


Figura 12. Registro original de una curva de relajación con ACh en arteria mesentérica de rata precontraída con FE.

- **Curvas concentración-respuesta a agentes contracturantes**

Se añaden al baño, de forma acumulativa, concentraciones crecientes de FE (10^{-6} - 3×10^{-4} M), antes de añadir la siguiente concentración, se espera el tiempo suficiente para obtener una meseta estable de contracción, como se muestra la figura 13.

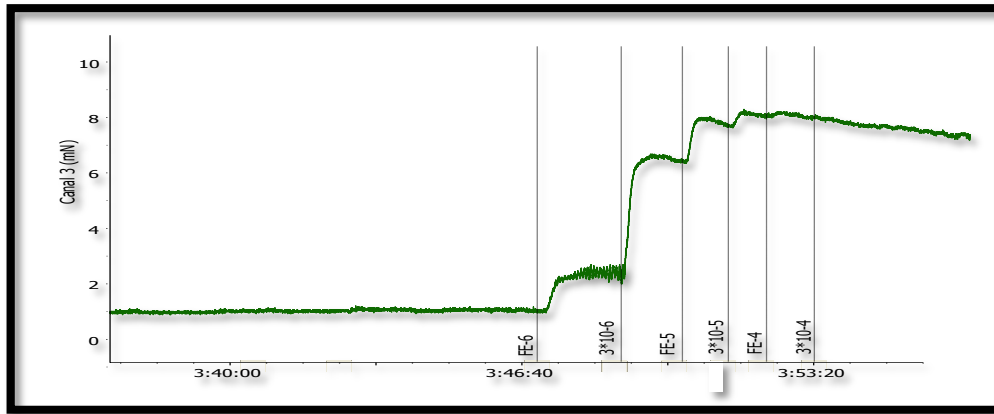


Figura 13. Registro original de una curva de contracción a FE en arteria mesentérica de rata.

El efecto provocado por ACh y NTP se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE. La respuesta a FE en las curvas de contracción y a KCl se expresa en mN.

En todas las curvas concentración-respuesta se obtuvo el E_{max} (valor de efecto máximo) y pD_2 (logaritmo cambiado de signo de la concentración del agonista que provoca el 50% del efecto máximo (-log EC_{50})). Este último parámetro se obtiene mediante el ajuste de las curvas a un modelo logístico no lineal, utilizando el programa Graph Pad Prism versión 5.0 (GraphPad software Inc, USA).

8. Estudios de funcionalidad en arteria aorta

Se utilizan baños para órgano aislado como el que se presenta en la figura 14. Poseen una doble pared de vidrio delimitando una cámara, que a su vez se encuentra conectada a un circuito cerrado por cuyo interior circula agua mantenida a una temperatura constante de 37 °C, mediante una bomba termostática (TECTRON 4373200 Selecta, España). La parte inferior del baño tiene un orificio a través del cual se hace llegar de manera controlada la cantidad deseada de carbógeno. El interior del baño contiene una cantidad conocida de líquido nutricio que asegura la inmersión completa del tejido. Este líquido se elimina por una salida situada en la pared inferior de la copa e

inmediatamente se rellena con solución nutriticia nueva a 37 °C, de forma que los cambios de temperatura sean mínimos.

Una vez extraída la arteria aorta se procede a la eliminación del tejido conectivo y grasa que la rodea, cortándola en segmentos de 3 mm mediante un sistema de cuchillas ideado en nuestro laboratorio. A través de la luz de los anillos se introducen dos alambres finos de acero inoxidable y se colocan en los baños que contienen 5 mL de solución Krebs oxigenada. Uno de los alambres se fija al baño de órganos y el otro se conecta al transductor isométrico (UF-1, Harvard Apparatus Inc., USA). Los cambios de tensión se registran mediante un sistema de adquisición de datos PowerLab/800 (AD Instruments, Reino Unido).

Todos los anillos se someten a una tensión de 2 g y se dejan estabilizar 1 hora, renovando la solución nutriticia cada 30 minutos. Si es necesario, la tensión se reajusta a 2 g. En este momento se realizan curvas concentración-respuesta a ACh (10^{-8} - 10^{-4} M) y NTP (10^{-9} - 10^{-4} M) en arterias precontraídas con FE (10^{-7} M) y curvas de contracción con FE (10^{-6} - 3×10^{-5} M).

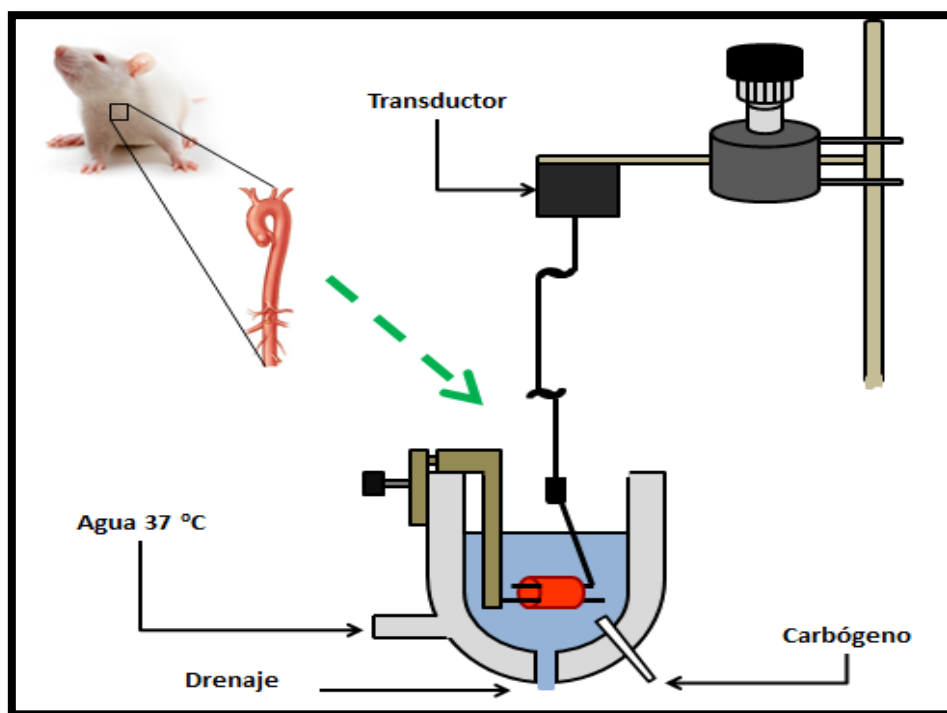


Figura 14. Baño de órganos y transductor isométrico.

El efecto provocado por ACh y NTP se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE. La respuesta a FE en las curvas de contracción se expresa en mg de contracción.

9. Determinación de indicadores de estrés oxidativo

9.1 Peroxidación lipídica

La determinación de la peroxidación lipídica se puede llevar a cabo por la medida de los aldehídos reactivos formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos. El malondialdehído (MDA) es el aldehído más importante obtenido en la dicha degradación. El método del TBARS es el más utilizado para valorar la peroxidación lipídica, se basa en la capacidad del MDA para reaccionar, a pH ácido y alta temperatura, con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un producto coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente.

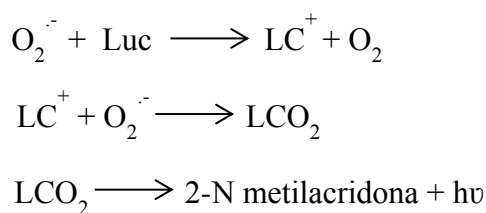
Con el fin de determinar el grado de peroxidación lipídica en los distintos grupos de ratas, determinamos la producción de MDA en plasma.

La concentración plasmática de MDA se determinó siguiendo el método de Ohkawa y cols. (62). El procedimiento consiste en mezclar el plasma con suero fisiológico (1:1). A continuación se añaden 2 mL de una solución que contiene ácido tricloroacético al 15%, TBA al 0,37% y HCl 0,25 N. Después de incubar 30 minutos a 90 °C, se ponen las muestras en hielo durante 10 minutos para parar la reacción, se centrifuga a 3000 r.p.m durante 25 minutos y se recoge el sobrenadante para, finalmente, leer la absorbancia a 535 nm. Para calcular la concentración plasmática de MDA se utiliza su coeficiente de extinción molar ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). El MDA se utiliza como patrón.

La concentración plasmática de MDA se expresa en nmol/mL de plasma.

9.2 Determinación del anión superóxido

El anión superóxido se puede cuantificar mediante quimioluminiscencia con lucigenina (Luc). Este método se basa en la formación de un catión de lucigenina (LC^+) en presencia de O_2^- , a partir del cual se forma un dioxetano de lucigenina (LCO_2) también en presencia de O_2^- , posteriormente para estabilizar la lucigenina, el dioxetano cede su energía en forma de ondas electromagnéticas que pueden medirse por un fotoamplificador y un fotodetector, de acuerdo a las siguientes reacciones:



La principal fuente de producción de O_2^- en el sistema cardiovascular es la NADPH-oxidasa. Con el fin de determinar el efecto del tratamiento con licopeno sobre la actividad de esta enzima se han llevado a cabo ensayos preliminares en homogeneizados de riñón. Las muestras de riñón se homogeneizan en tampón ROS (1 mL ROS/100 mg tejido), cuya la composición se detalla en anexo. 10 μ L de las muestras se incuban en un tubo especial para luminómetro con ROS a 37 °C, durante 15 minutos, con oxigenación continua y en presencia de dietilditiocarbamato de amonio (DDC, 10^{-2} M) para inhibir la SOD. A continuación se añade lucigenina (5 μ M) y NADPH (10^{-4} M) y se lee la luminescencia en un luminómetro (LB-9507 LUMAT, Berthold Technologies, Alemania) a intervalos de 10 segundos durante 400 segundos.

Con las muestras del homogeneizado de riñón se procede a la determinación de proteínas mediante el método de Bradford utilizando una recta patrón elaborada con concentraciones conocidas de albumina.

Los resultados del experimento se expresan en unidades relativas de luminescencia (URL) con respecto a la cantidad de proteínas del tejido (URL/ μ g proteínas).

10. Expresión y análisis estadístico de los resultados

Todos los resultados se expresan como media aritmética \pm el error estándar de la media (EEM) de un mínimo de 4 experimentos. Para comparar los valores obtenidos entre los diferentes grupos se realiza un análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías según corresponda, seguido del test de Bonferroni, considerándose diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados y discusión

1. Control de la presión arterial sistólica y peso corporal

En los animales que recibieron la infusión continua de Ang II observamos un incremento gradual de los valores de PAS de 120 ± 2 a 208 ± 5 mmHg mientras que en los animales control la presión arterial no se modificó durante las 2 semanas que duró este estudio. El tratamiento con licopeno redujo significativamente el incremento de la PA provocada por Ang II (Figura 15).

La Tabla 3 muestra los resultados correspondientes a la evolución del peso corporal en los diferentes grupos experimentales. La ganancia de peso fue similar en el grupo control y en el tratado con licopeno. En el grupo Ang II los animales mostraron menor incremento durante la segunda semana.

Un meta análisis realizado por Ried y cols. (52) demuestra una ligera acción antihipertensora del licopeno en individuos que presentaban valores de presión arterial superiores a 140 mmHg. En nuestro estudio el tratamiento retrasó significativamente el efecto de la infusión de Ang II sobre el incremento de la presión arterial sistólica lo que puede resultar beneficioso para prevenir los daños asociados a la hipertensión.

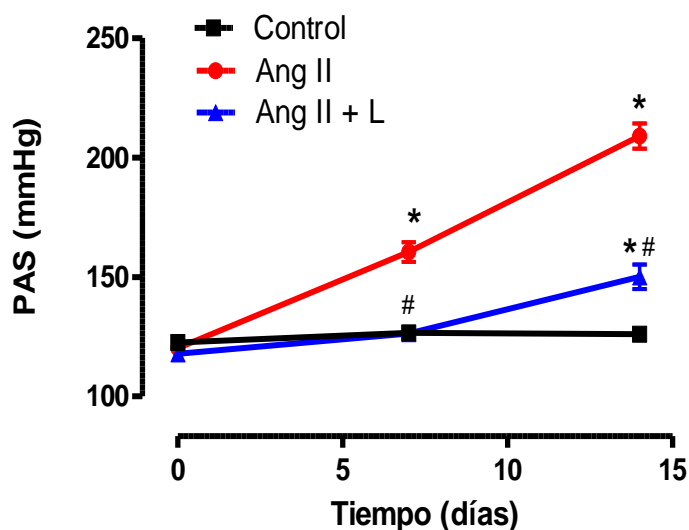


Figura 15. Evolución de la presión arterial sistólica (PAS, mmHg) a lo largo del estudio en ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L). * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs Ang II.

Tiempo (días)	Peso corporal (g)		
	Control	Ang II	Ang II + L
0	256 ± 4	258 ± 3	253 ± 3
7	274 ± 6	274 ± 3	267 ± 3
14	305 ± 6	286 ± 6 *	294 ± 6

Tabla 3. Peso corporal (g) a lo largo del estudio en ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L). * $p < 0,05$ vs control.

2. Estudios morfo-histológicos en corazón y riñón

➤ *Hipertrofia cardiaca y renal*

Como muestra la figura 16 A, la relación entre el peso del ventrículo izquierdo (VI) y el peso corporal aumentó un 33% tras la infusión de Ang II ($2,46 \pm 0,05$ mg/g), comparando con el grupo control ($1,85 \pm 0,09$ mg/g), lo que nos indica el desarrollo de hipertrofia cardiaca.

A pesar de no observar diferencias significativas en los pesos de los riñones en los 3 grupos (Control, 884 ± 30 mg; Ang II, 896 ± 18 mg; Ang II + L, 842 ± 30 mg), la figura 16 B muestra un incremento en la hipertrofia renal, debido a la disminución del peso corporal provocada por la infusión de Ang II.

El tratamiento con licopeno evitó significativamente el incremento de estos índices, obteniendo resultados similares a los del grupo control.

➤ *Fibrosis cardiaca*

En nuestros experimentos pudimos comprobar que la infusión de Ang II produce un incremento muy importante de la fibrosis cardiaca, como podemos apreciar en las imágenes de los cortes histológicos teñidos con rojo sirio y en la gráfica que muestra la cuantificación del área de fibrosis (Figura 17). La administración de licopeno produjo una reducción significativa del % de la fibrosis cardiaca en relación con el grupo Ang II.

3. Determinación de colágeno en corazón

Los resultados de este trabajo muestran que la infusión de Ang II incrementó la concentración de hidroxiprolina cardiaca, o sea un aumento en la deposición de colágeno, comparando con el grupo control. En los animales que reciben tratamiento simultáneo con licopeno este incremento es menos importante mostrando una disminución significativa respecto al grupo de Ang II de los niveles de hidroxiprolina como se observa en la figura 18.

4. Estudios morfo-histológicos en arteria aorta

Nuestros resultados en arteria aorta indican que la infusión crónica de Ang II provoca un incremento significativo del lumen, W_m y CSA_m . El tratamiento con licopeno previene los cambios provocados por la Ang II sobre estos parámetros como se muestran en las figuras 19 y 20.

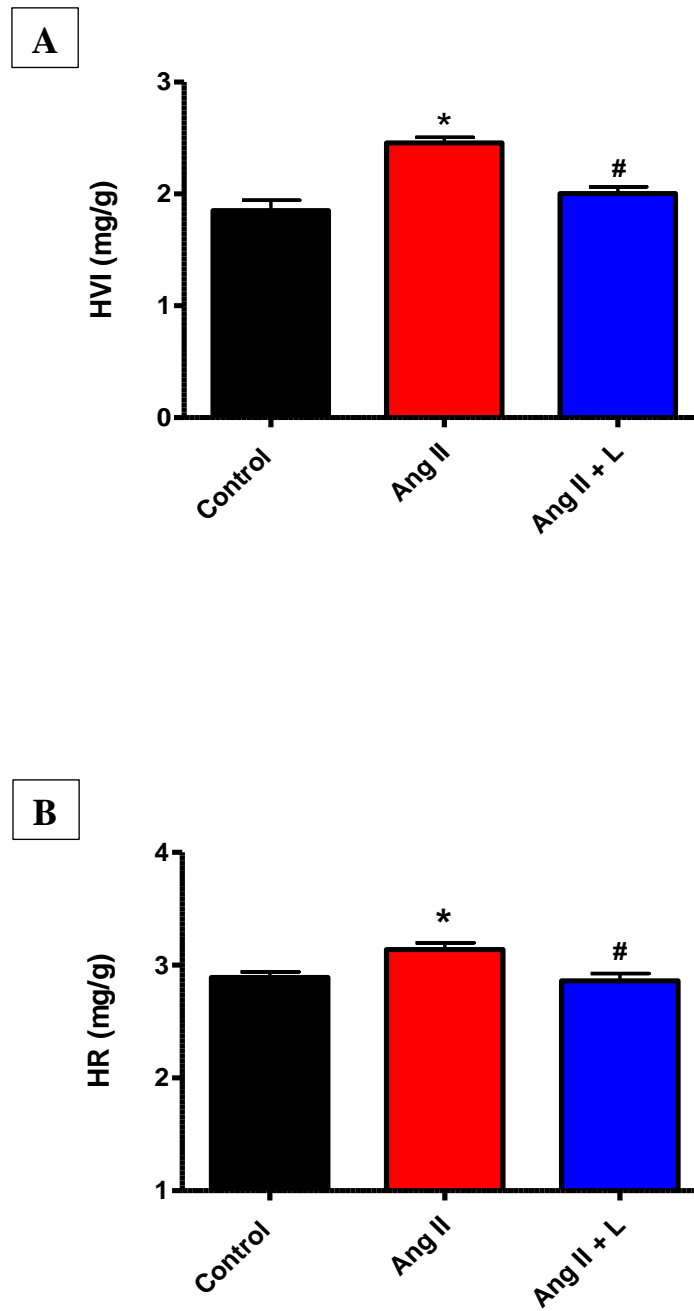


Figura 16. Hipertrofia ventricular izquierda (HVI, mg/g) (A) e hipertrofia renal (HR, mg/g) (B) en ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L). * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs Ang II.

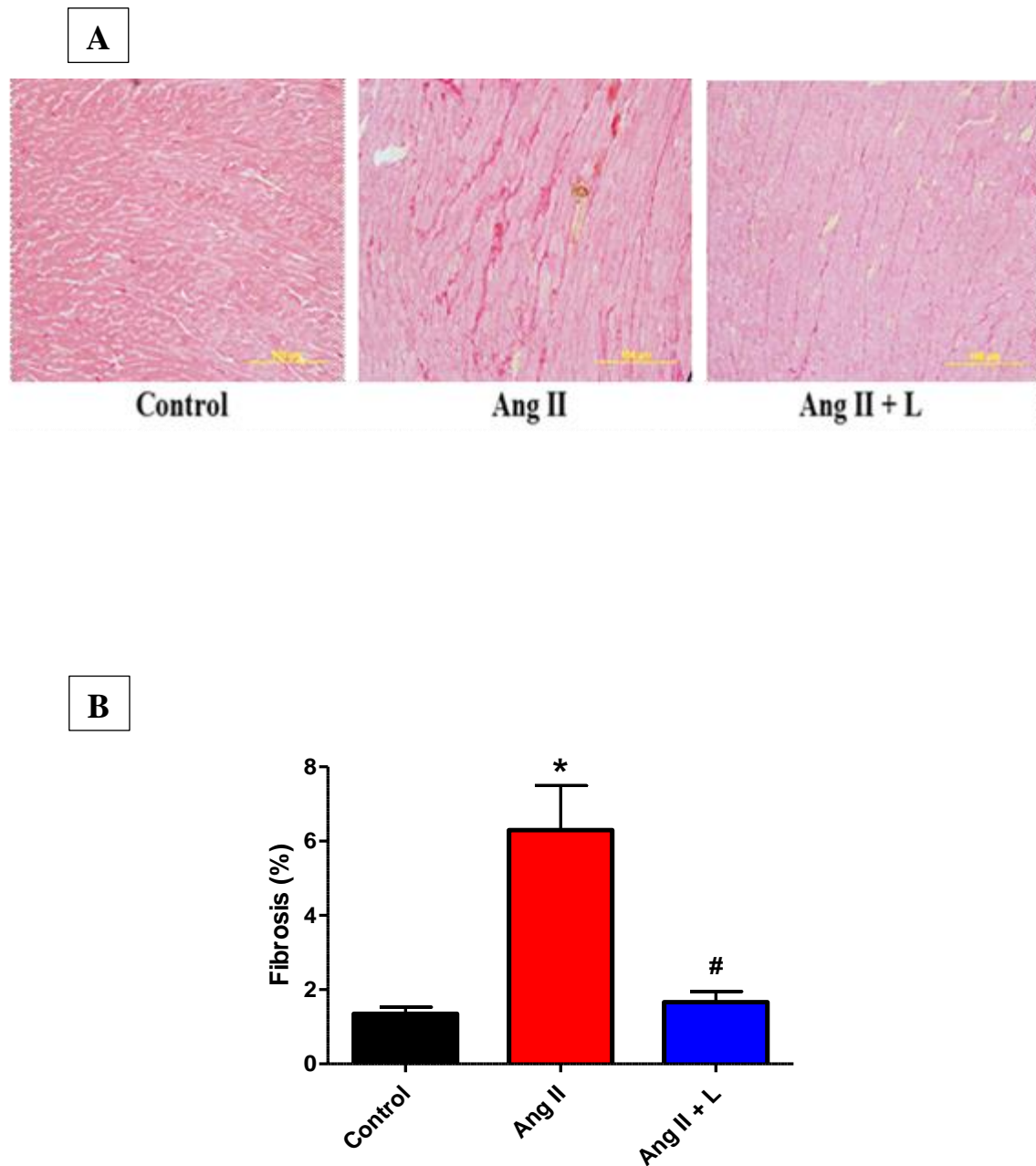


Figura 17. Imágenes representativas de cortes histológicos de ventrículo izquierdo teñidos con rojo sirio (**A**) y cuantificación de fibrosis intersticial (%) en corazón (**B**) de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L). * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs Ang II.

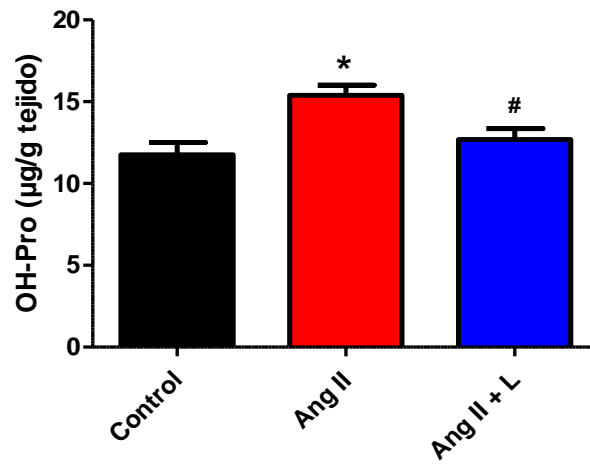


Figura 18. Niveles de hidroxiprolina (OH-Pro, µg/g tejido) en corazón de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L). * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs Ang II.

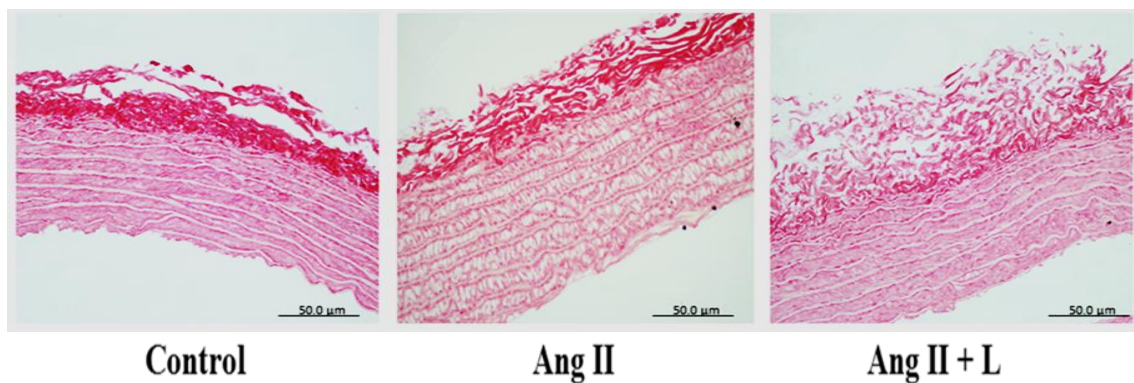


Figura 19. Imágenes representativas de cortes histológicos, teñidos con rojo sirio, de secciones transversales de arterias aortas de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L).

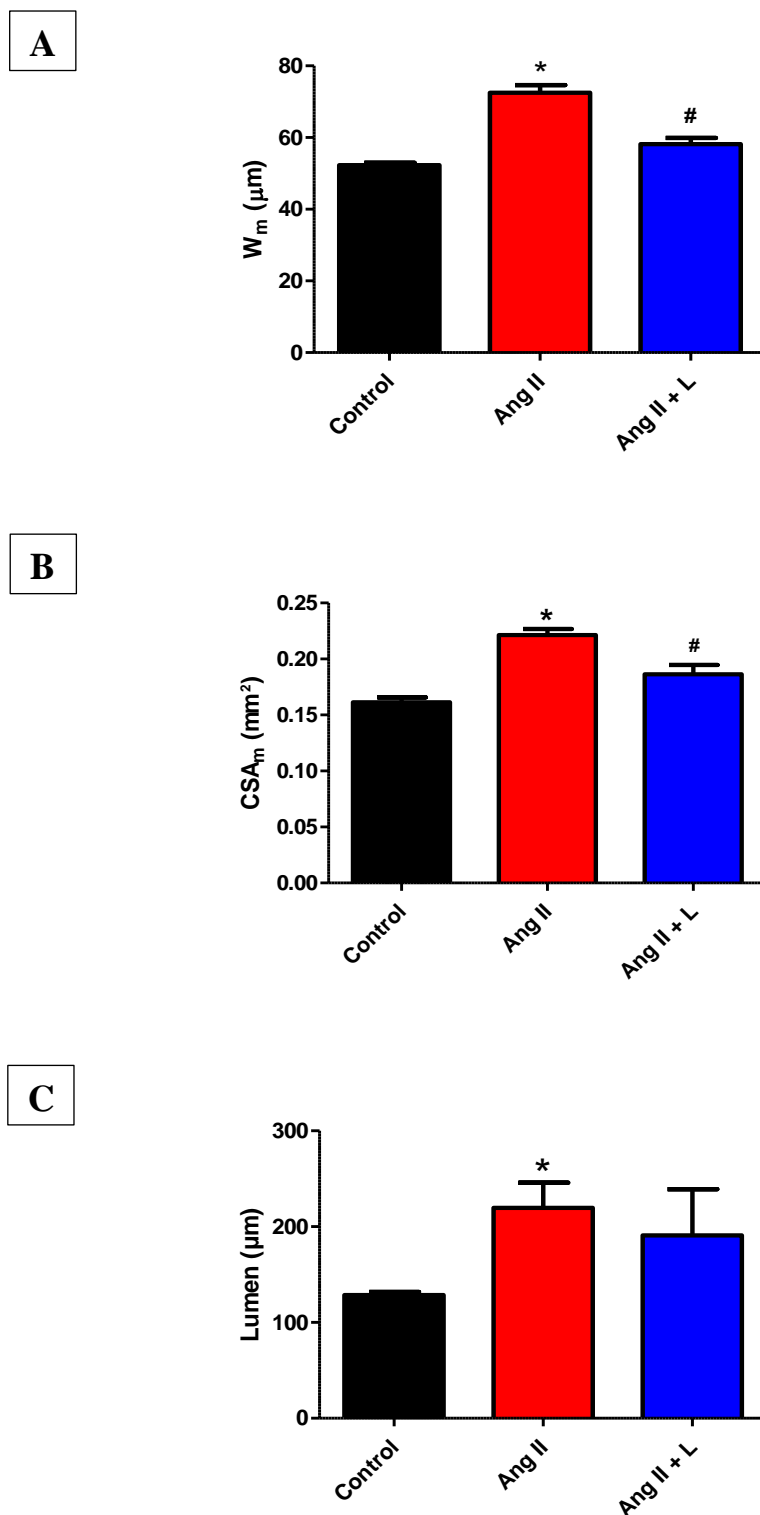


Figura 20. Grosor de la capa media (W_m , μm) (A), área seccional de la capa media (CSA_m , mm^2) (B) y lumen (μm) (C) de arterias aortas de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L). * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs Ang II

Está demostrado que la hipertensión es el factor de riesgo etiológico más importante en la aparición de infarto y otras patologías cardiovasculares (63). En los procesos hipertensivos se produce una sobrecarga de presión que conduce al desarrollo de hipertrofia cardíaca. Sabemos que la Ang II incrementa los valores presión y posee efectos tróficos que favorecen el desarrollo de hipertrofia cardíaca y renal (64). En nuestro estudio comprobamos que estas alteraciones se producen como consecuencia de la infusión de Ang II sobre el corazón, pero no sobre el riñón. El licopeno muestra un efecto protector significativo sobre la hipertrofia cardíaca.

Como respuesta al estrés mecánico o metabólico, el miocardio sufre un remodelado estructural que consiste en hipertrofia de los cardiomiocitos y fibrosis intersticial y perivascular. La fibrosis miocárdica es el resultado de una deposición exagerada de colágeno tipo I y tipo III como consecuencia del predominio de la síntesis sobre la degradación de moléculas de colágeno. Existen diversas vías potenciales que median los efectos profibróticos de la Ang II en el corazón. Lijnen y cols, han demostrado que la Ang II estimula la producción y secreción de colágeno en cultivos celulares de fibroblastos cardíacos a través de la activación de los receptores AT₁ (65). La interacción entre Ang II y el receptor AT₁ localizado en los fibroblastos cardíacos da lugar a la hiperplasia de éstos, a la activación de las vías biosintéticas del colágeno y a la inhibición de las vías de degradación del mismo. Estudios más recientes, sugieren que la fibrosis representaría la respuesta reparadora a la inflamación miocárdica inducida por Ang II al interactuar con los receptores AT₁ presentes en las células de la vasculatura cardíaca (66,67). Estudios “in vivo” también demuestran que la infusión crónica de Ang II incrementa la fracción de colágeno ventricular (68). Resultados previos de nuestro grupo y los obtenidos en este trabajo demuestran la actividad profibrótica de la Ang II y la capacidad de licopeno y otros compuestos con propiedades antioxidantes para evitar los efectos perjudiciales provocados por este péptido (57,69).

Yue y cols., en estudios realizados en cultivos celulares de cardiomiocitos de ratones sometidos a hipoxia/reoxigenación demuestran que el tratamiento de las células con 5 µM de licopeno tiene un efecto importante en la protección frente a la apoptosis y sobre la disminución de ERO que se generan durante el proceso isquémico (70). Por otro lado, el trabajo realizado por Anjos Ferreira y cols. en ratas Wistar muestra que el tratamiento con licopeno a la dosis de 5 mg/kg/día durante 7 semanas no previene la disfunción sistólica ventricular izquierda ni la deposición de colágeno intersticial del

miocardio causada por doxorubicina (71). Los resultados que hemos obtenido en nuestro trabajo demuestran que el tratamiento con licopeno a una dosis diaria de 10 mg/kg tiene efectos beneficiosos sobre la deposición de colágeno intersticial en el miocardio, previniendo la fibrosis cardíaca.

Durante el proceso hipertensivo se producen cambios morfológicos en los vasos debido al crecimiento celular y a la proliferación de células del músculo liso. Las arterias de mayor calibre experimentan un remodelado hipertrófico con un incremento del W_m y CSA_m que puede ir acompañado o no de modificaciones en el lumen (72). Nuestros resultados en arteria aorta indican un incremento de los 3 parámetros tras la infusión de Ang II y un retraso en la evolución, sobre todo del W_m y del CSA_m , cuando los animales recibían simultáneamente un tratamiento con licopeno. Esto coincide con lo descrito por otros autores en estudios realizados en modelos animales y humanos sobre el efecto del licopeno en la aterosclerosis, que demuestran que atenúa el incremento del grosor de la capa media-intima de la pared arterial y provoca un retraso en el envejecimiento vascular en arterias carótidas, debido al aumento de la biodisponibilidad de NO y mejora de la función endotelial (73,74). Con estos resultados podemos afirmar que el tratamiento con licopeno a la dosis utilizada en nuestro estudio tiene efecto sobre el remodelado vascular en arterias aortas provocado por la hipertensión en este modelo experimental.

5. Estudios de funcionalidad en arterias mesentéricas

Si representamos gráficamente la respuesta de las arterias mesentéricas a una solución hiperpotásica (Figura 21) observamos que la reactividad de estas arterias de resistencia se ve comprometida en los animales que reciben un tratamiento con Ang II, comparado con el grupo que no recibe ningún tipo de tratamiento.

La relajación máxima a ACh fue significativamente menor en arterias de ratas tratadas con Ang II comparando con las ratas del grupo control y la relajación máxima a NTP fue similar para todos los grupos. El tratamiento con licopeno no produjo ninguna mejora en la capacidad relajante dependiente del endotelio como se muestra en la figura 22 A y en los valores de la tabla 4.

La figura 23 muestra las curvas concentración-respuesta a FE en los tres grupos de animales estudiados en este trabajo. Podemos observar que el tratamiento con 10 mg/kg/día de licopeno no produjo modificaciones significativas en la respuesta contracturante de estos lechos vasculares, aunque la respuesta máxima fue ligeramente inferior en el grupo Ang II.

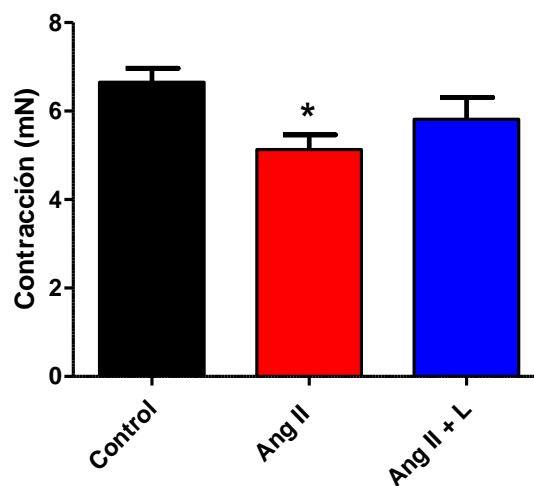


Figura 21. Contracción a KPSS (120 mM) en arterias mesentéricas de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L). * $p < 0,05$ vs control.

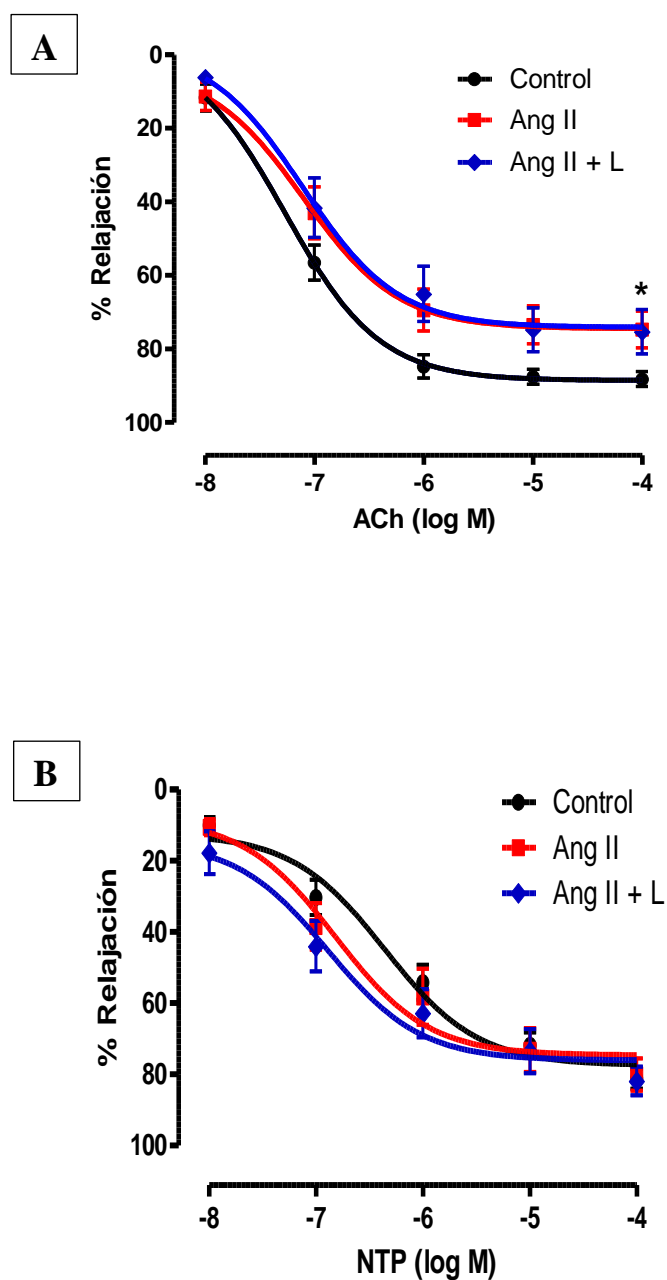


Figura 22. Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh, 10^{-8} - 10^{-4} M) (A) y NTP (10^{-8} - 10^{-4} M) (B) en arterias mesentéricas precontraídas con FE (10^{-5} M) de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L). * $p < 0,05$ vs control.

	ACh		NTP	
	E_{\max} (%)	pD_2	E_{\max} (%)	pD_2
Control	88,2 ± 2,1	7,3 ± 0,1	81,3 ± 2,8	6,4 ± 0,2
Ang II	74,7 ± 5,0 *	7,1 ± 0,2	80,1 ± 4,5	6,8 ± 0,2
Ang II + L	75,3 ± 6,0 *	7,1 ± 0,2	81,9 ± 4,0	6,9 ± 0,2

Tabla 4. Valores de relajación máxima (E_{\max}) y pD_2 de las curvas concentración-respuesta a ACh y NTP en arterias mesentéricas de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L). * $p < 0,05$ vs Control.

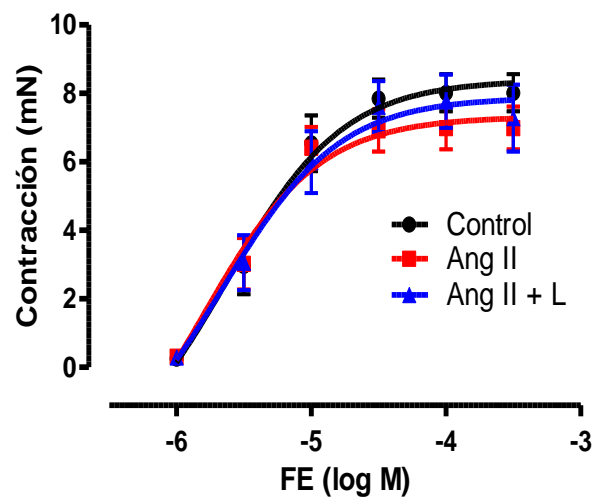


Figura 23. Curvas concentración-respuesta a FE (10^{-6} - 3×10^{-4} M) en arterias mesentéricas de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L).

6. Estudios de funcionalidad en arteria aorta

Como muestra la figura 24 y los datos de la tabla 5, no se aprecian diferencias en las respuestas relajantes a ACh entre los 3 grupos. Cuando el agente empleado es NTP, se consigue una relajación próxima al 100% en los 3 grupos. Los valores de pD_2 para NTP ligeramente inferiores en el grupo Ang II y el desplazamiento a la derecha de la curva dosis-respuesta indican una pequeña pérdida de sensibilidad en la respuesta a este agente.

Con respecto a la respuesta contracturante a fenilefrina, nuestros resultados muestran que no hay diferencias significativas entre los tres grupos (Figura 25).

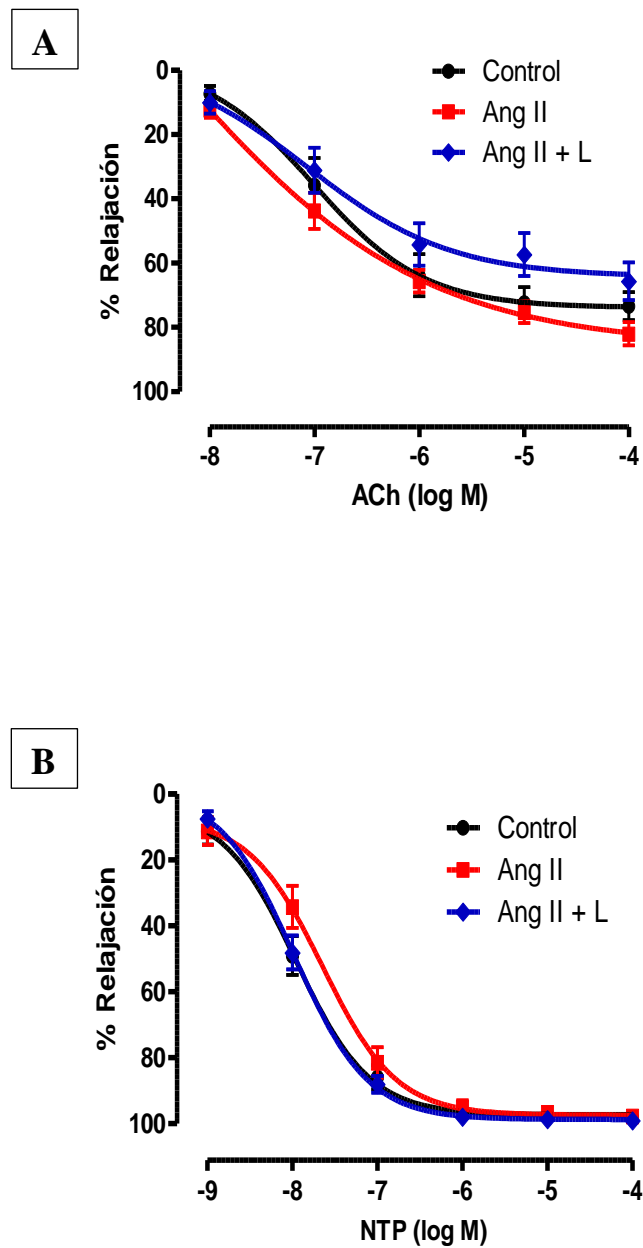


Figura 24. Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh, 10^{-8} - 10^{-4} M) (A) y NTP (10^{-9} - 10^{-4} M) (B) en arterias aortas precontraídas con FE (10^{-7} M) de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L).

	ACh		NTP	
	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)	pD_2
Control	73,9 ± 4,0	7,0 ± 0,4	98,2 ± 0,6	8,0 ± 0,1
Ang II	82,0 ± 4,0	8,4 ± 3,6	97,8 ± 1,2	7,6 ± 0,1
Ang II + L	65,7 ± 6,0	7,0 ± 0,8	99,1 ± 0,5	8,0 ± 0,1

Tabla 5. Valores de relajación máxima (E_{max}) y pD_2 de las curvas concentración-respuesta a ACh y NTP en arterias aortas de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L)

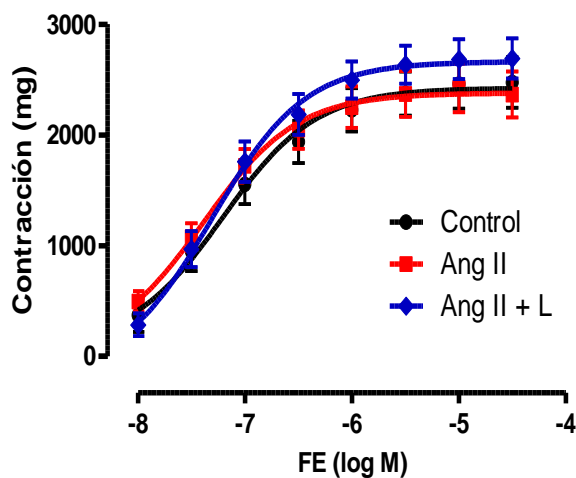


Figura 25. Curvas concentración-respuesta a FE (10^{-8} - 3×10^{-5} M) en arterias aortas de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L).

Uno de los objetivos de nuestro estudio era determinar si el tratamiento con licopeno podría mejorar las alteraciones en la reactividad vascular, ya que éstas son fundamentales en el desarrollo y el mantenimiento de las enfermedades cardiovasculares y su regresión es, hoy en día, uno de los objetivos de la terapéutica.

Estudios llevados a cabo por Wattanapitayakul y cols. (75) y estudios anteriores de nuestro grupo (57,69), en los que la infusión de una dosis similar de Ang II a la utilizada en este estudio, han demostrado una reducción significativa en la respuesta relajante dependiente del endotelio a ACh en el grupo tratado con Ang II. Por otro lado, la relajación a NTP, una respuesta independiente del endotelio, no se ve alterada con la presencia de Ang II. Hecho que confirmamos con los resultados obtenidos en este estudio en las arterias de resistencia. Sin embargo, estos datos no han sido tan concluyentes en las arterias de conductancia como cabría esperar a la vista de los resultados observados tanto sobre la presión arterial como en los estudios histológicos. Tampoco hemos observado cambios en la reactividad vascular tras el tratamiento con licopeno. Aunque no esperábamos estos resultados, tampoco nos han sorprendido ya que en los últimos años se han publicado varios trabajos que muestran la capacidad del licopeno en la mejoría o no de la reactividad vascular. Zhu y cols. en el año de 2011 han mostrado que el licopeno a las dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día durante 30 días mejora la capacidad endotelial de la arteria aorta en ratas diabéticas, aumentando la respuesta relajante a ACh y provocando un aumento del NO (76). Estudios realizados en cultivos de células endoteliales humanas también muestran que la exposición de estas células a una dosis de licopeno proveniente del tomate mejora significativamente la función endotelial, por el aumento de NO y disminución de liberación de endotelina (77). Otros grupos de investigación como lo de Stangl y cols. en un estudio realizado en humanos han observado que la ingestión de productos derivados del tomate, asociada con un aumento significativo del licopeno en el plasma, no mejora la función endotelial en mujeres posmenopáusicas (78).

Con estos datos anteriores y con los resultados obtenidos en nuestro trabajo en que la dosis de licopeno usada en el tratamiento no se mostró efectivo en la mejora de la funcionalidad, necesitamos llevar a cabo más estudios para confirmar y/o comprobar si el tratamiento con licopeno mejora o no la disfunción endotelial en estos lechos vasculares, dejando así un campo abierto para futuras investigaciones.

7. Peroxidación lipídica

Como se puede observar en la figura 26 los animales tratados con Ang II poseían niveles de MDA plasmáticos significativamente más elevados que las ratas del grupo control. En el grupo tratado con licopeno los niveles de MDA se incrementaron menos y aunque no existen diferencias significativas ni frente al grupo control ni frente al grupo tratado únicamente con Ang II, podemos inferir una ligera capacidad antioxidante y una acción parcialmente protectora contra el estrés oxidativo. En este sentido Das y cols. muestran en sus estudios una reducción del grado de peroxidación lipídica en animales sometidos durante 3 semanas a tratamiento con una dosis de licopeno muy similar a la usada en nuestro estudio (53). También se observa una reducción de los niveles plasmáticos de MDA en animales hipercolesterolémicos que reciben una alimentación con productos derivados de tomate (79).

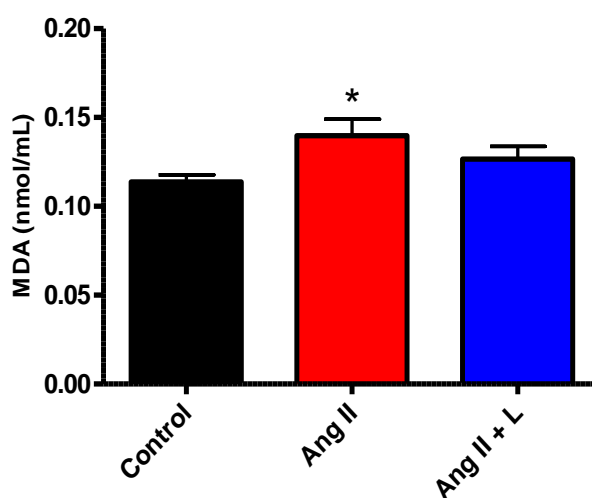


Figura 26. Niveles de malondialdehído (MDA, nmol/mL) en plasma de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L). * $p < 0,05$ vs control.

8. Determinación del anión superóxido

Se ha demostrado que la disfunción endotelial y el incremento en el estrés oxidativo observado en animales a los que se infunde Ang II, se debe a un incremento de la NADPH oxidasa (80). Como podemos observar nuestros resultados en relación a la producción del anión $O_2^{\cdot -}$ en homogeneizados de riñón medida por quimioluminiscencia resultaron muy variables, no observando diferencias significativas entre los grupos, aunque podemos apreciar que el grupo tratado con licopeno presenta los valores más bajos, como podemos observar en la figura 27.

La Ang II juega un papel importante en la progresión de enfermedades renales crónicas, y se ha demostrado que aumenta la generación de las ERO en las células del riñón (81). Como indicamos anteriormente este es un método muy variable, pudiendo así dejarnos algunas dudas sobre las causas de la poca evidencia de estos resultados. Sugiriendo así la continuación en la investigación por este o por otro método en la cuantificación del estrés oxidativo y la influencia del licopeno sobre este parámetro.

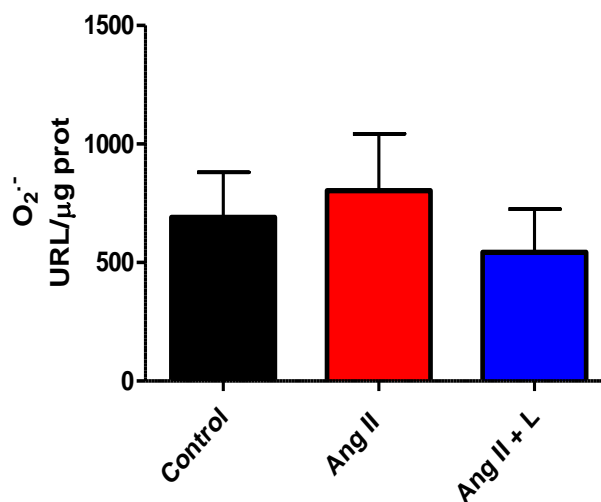


Figura 27. Producción de anión superóxido estimulada con NADPH en homogeneizados de riñón de ratas Wistar control, ratas Wistar con MO de Ang II sin tratamiento (Ang II) y tratadas con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día (Ang II + L).

Conclusiones

1. El tratamiento con licopeno a la dosis de 10 mg/kg/día reduce significativamente el incremento de la PAS en las ratas que reciben una infusión de Ang II y previene la pérdida de peso de los animales durante el tratamiento.
2. La disminución de la hipertrofia cardiovascular así como de la fibrosis cardiaca nos indica que la administración de licopeno previene los procesos de remodelado cardiaco asociados a la hipertensión.
3. En los ensayos de reactividad vascular verificamos que en arterias de resistencia, los animales que recibían infusión de Ang II presentaron una pérdida de la respuesta relajante dependiente de endotelio. El tratamiento con licopeno no demuestra beneficios sobre este lecho vascular.
4. El licopeno ha demostrado que previene la peroxidación lipídica, amortiguando los efectos deletéreos del estrés oxidativo inducido por Ang II.

Bibliografía

1. World Health Organization. World Health Statistics 2012. Geneva: **WHO**; 2012.
2. Instituto Nacional de Estadística de España. Notas de prensa. 2013. www.ine.es/prensa/prensa.htm. 26/07/2013.
3. Instituto Nacional de Estadística de Portugal. 2012. www.ine.pt. 27/07/2013.
4. www.licocard.com. 15/01/2013.
5. Fernández LC, Serra JD, Álvarez JRM, Alberich RS, Afiliación FPJ. Grasas de la dieta y salud cardiovascular. **Aten Prim España**. 2005; 43(3): 1-16.
6. Eurostat (Statistical Office of the European Communities, oficina europea de estadística, 2009). <http://epp.eurostat.eceuropa.eu>. 15/01/2013.
7. www.framinghamheartstudy.org. 14/01/2013.
8. D'Agostino RBS, Grundy S, Sullivan LM, Wilson P. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. **JAMA**. 2001; 286:180-187.
9. Guía de 2007 para el manejo de la Hipertensión arterial. **J hipertension**. 2007; 25:1105-1187.
10. Mendrano MJ, Cerrato E, Boix R, Delgado-Rodriguez M. Cardiovascular risks factors in spanish population. **Med Clin**. 2005; 124:606-612.
11. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2006; 291: 985-1002.
12. European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. **J Hypertens**. 2013; 31:1282-1357.
13. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. **N Engl J Med**. 2013; 368(14):1279-1290.
14. Montezano AC, Touyz RM. Reactive Oxygen Species, Vascular Nox, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. **Antioxid Redox Signal**. 2013; 00: 1-19.
15. Unger T, Paulis L, Sica DA. Therapeutic perspectives in hypertension: new means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. **Eur Heart J**. 2011; 32(22):2739-2747.
16. http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Renin-angiotensin-aldosterone_system.png. 16/08/2013.
17. Silverthorn DU. Fisiologia humana uma abordagem integrada. 2.ed. Sao Paulo: **Manole**. 2003; Cap 19:581-583.

Bibliografía

18. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. **Med Scien Monit.** 2005; 11(6):RA194-RA205.
19. Zimmerman M, Lazartigues E, Sharma RV, et al. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. **Circulat Res.** 2004; 95:210-216.
20. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocrine Rev.** 2003; 24:261-271.
21. D'Amore A, Black MJ, Thomas WG. The angiotensin 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. **Hypertension.** 2005; 46(6):1347-1354.
22. Bregagnollo EA, Okoshi K, Bregagnollo IF, et al. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão de angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobre carga persistente. **Arq Brasil Cardiol.** 2005; 84(3):225-232.
23. Mascareno E, Beckles DL, Siddiqui MA. Janus kinase-2 signaling mediates apoptosis in rat cardiomyocytes. **Vasc Pharm.** 2005; 43(5):327-335.
24. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. **Ann Rev Physio.** 2003; 65:81-101.
25. Rodriguez L, Sánchez J. Patogenia y fisiopatología de la hipertensión arterial y de la cardiopatía hipertensiva. En: Palma JL, Alegria E, de Lombera F. (eds). Hipertensión y cardiopatía hipertensiva. **Mosby-Doyomalibros S.A.** 1996; 18-26.
26. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. **Cardiovasc Res.** 2006; 71(2): 247-258.
27. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Endot%C3%A9lio>. 22/07/2013.
28. Vaziri ND. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 2004; 13(1):93-99.
29. Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. **Med Clin North Am.** 2009; 93(3):621-635.
30. Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. **Curr Hypertens Rep.** 2010; 12(2):135-142.
31. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertens Res.** 2011; 34(1): 5-14.

32. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circul Res.** 2000; 87:840-844.
33. Guzik TJ, Harrison DG. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. **Drug Discov Today.** 2006; 11:524-533.
34. Li H, Hocke H, Forstermann V. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. **Trends Pharm Sci.** 2013; 34(6):313-319.
35. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensine II-infused mice. **J Hypertens.** 2004; 22(3):535-542.
36. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev.** 2007; 87(1):245-313.
37. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Terpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. **J Clin Invest.** 1996; 97:1916-1923.
38. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **J Physiol.** 2004; 555(3):589-606.
39. Wever RM, Van Dam T, Van Rijn HJ, de Goot F, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. **Biochem Biophys Res Commun.** 1997; 237:340-344.
40. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Diaber A, Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. **Antiox Redox Signal.** 2008; 10(6):1115-1126.
41. Ohara Y, Peterson T, Harrison D. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide production. **J Clin Invest.** 1993; 91(6):2546-2551.
42. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab Invest.** 1982; 47(5):412-426.
43. Spitteller G. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. **Exp Gerontol.** 2001; 36:1425-1457.
44. Monroy-Ruiz J, Sevilla MÁ, Carrón R, Montero MJ. Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. **Pharmacol Res.** 2011; 63(1):44-50.
45. Paran E, Novack V, Engelhard YN, Hazan-Halevy I. the effects of natural antioxidants from tomato extract in treated but uncontrolled hypertensive patients. **Cardiol Drugs Ther.** 2009; 23(2): 145-151.

46. Kizhakekuttu TJ, Widlansky ME. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. **Cardiovasc ther.** 2010; 28(4): 20-32.
47. Halliwell B, Gutterdeg, JMC. The chemistry of free radicals and, related reactive species. In: **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford: Clarenton Press. 1999; 3:36-104.
48. Waliszewski KN, Blasco G. Nutraceutical properties of lycopene. **Salud Publica Mex.** 2010; 52(3):254-265.
49. Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. **Food Sci Nutr.** 2000; 40(1):1-42.
50. Cruz BRM, González GJ, Sánchez CP. Functional properties and health benefits of lycopene. **Nutr Hosp.** 2013; 28(1):6-15.
51. Mordente A, Guantario B, Meucci E, Silvestrini A, Lombardi E, Martorana GE, et al. Lycopene and cardiovascular diseases: an update. **Curr Med Chem.** 2011; 18(8):1146-1163.
52. Ried K, Fakler P. Protective effects of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: Meta-analyses of intervention trails. **Maturitas.** 2011; 68(4):299-310.
53. Das S, Otani H, Maulik N, Das DK. Lycopene, tomatoes, and coronary heart disease. **Free Radic Res.** 2005; 38:449-455.
54. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. **Am J Clin Nutr.** 2006; 83:1265-1271.
55. Bose KS, Agrawal BK. Effect of lycopene from tomatoes (cooked) on plasma antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in grade-I hypertension. **Ann Nutr Metab.** 2007; 51(5):477-481.
56. Palomo I, Moore-Carrasco R, Carrasco G, Villalobos P, Guzmán L. El efecto de tomates previne el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer: antecedentes epidemiológicos y mecanismos de acción. **Idesia** (Chile). 2010; 28(3):121-129.
57. Gómez-Roso M. Efectos de zofenopril sobre el estrés oxidativo y el remodelado cardiovascular en ratas hipertensas. **Tesis doctoral. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca.** 2008.
58. McCormick RJ. The flexibility of the collagen compartment of muscle. **Meat Sci.** 1994; 36(1,2):79-91.
59. Fort J, Pilette C, Oberti F, Veal N, Gallois Y, Douay O, Calés P. Long-term administration of PGE₁ increases liver fibrosis and collateral blood flow in bile-duct-ligated rats. **J Hepatol.** 1999; 30(1):70-76.

60. Jamall IS, Finelli VN, Que Hee S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxiprolin in biological tissues. **Anal Biochem.** 1981; 112(1):70-75.
61. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ Res.** 1977; 41(1):19-26.
62. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.** 1979; 95(2):351-358.
63. Kannel WB, Levy D, Cupples LA. Left ventricular hypertrophy and risk of cardiac failure: insights from the Framingham Study. **J Cardiovasc Pharmacol.** 1987; 10(6):S135-140
64. Li L, Yi-Ming W, Li ZZ, Zhao L, Yu YS, Li DJ, Xia CY, Liu JG, Su DF. Local RAS and inflammatory factors are involved in cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Pharmacol Res.** 2008; 58(3-4):196-201.
65. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.** 2001; 2(2):117-122.
66. González A, López B, Querejeta R, Díez J. regulation of myocardial fibrillar collagen by angiotensin II. A role in Hypertensive heart disease?. **J Mol Cell Cardiol.** 2002; 34(12):1585-1593.
67. Tukoda K, Kai H, Kuwahara F, Yasukawa H, Tahara N, Kudo H, et al. Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. **Hypertension.** 2004; 43(2):499-503.
68. Díez J. Profibrotic effects of angiotensin II in the heart: a matter of mediators. **Hypertension.** 2004; 43(6):1164-1165.
69. Monroy-Ruíz J. Efectos de la astaxantina en la función vascular, remodelado cardiovascular y estrés oxidativo asociados a la hipertension. **Tesis doctoral. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca.** 2008.
70. Yue R, Hu H, Yiu KH, Luo T, Zhou Z, Xu L, et al. Lycopene protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction in primary neonatal mouse cardiomyocytes. **PLoS One.** 2012; 7(11):e50778.
71. Anjos Ferreira AL, Russell RM, Rocha N, Placido Ladeira MS, Favero Salvadori DM, Oliveira Nascimento MC, et al. Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: an echocardiographic, histological and morphometrical assessment. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 2007;101(1):16-24.
72. Galderisi M, de Divitiis O. Risk factor-induced cardiovascular remodeling and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **J Cardiovasc Pharmacol.** 2008; 51(6):523-531.

73. Karppi J, Kurl S, Ronkainen K, Kauhanen J, Laukkanen JA. Serum carotenoids reduce progression of early atherosclerosis in the carotid artery wall among Eastern Finnish men. **PLoS One**. 2013; 8(5):e64107.
74. Wolak T, Paran E. Can carotenoids attenuate vascular aging?. **Vascul Pharmacol**. 2013; pii:S1537-1891.
75. Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Bauer JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. **FASEB J**. 2000; 14(2):271-278.
76. Zhu J, Wang CG, Xu YG. Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress. **Pharm Biol**. 2011; 49(11):1144-1149.
77. Armoza A, Haim Y, Bashiri A, Wolak T, Paran E. Tomato extract and the carotenoids lycopene and lutein improve endothelial function and attenuate inflammatory NF- κ B signaling in endothelial cells. **J Hypertens**. 2013; 31(3):521-529.
78. Stangl V, Kuhn C, Hentschel S, Jochmann N, Jacob C, Böhm V, et al. Lack of effects of tomato products on endothelial function in human subjects: results of a randomised, placebo-controlled cross-over study. **Br J Nutr**. 2011; 105(2):263-267.
79. Hsu YM, Lai CH, Chang CY, Fan CT, Chen CT, Wu CH. Characterizing the lipid-lowering effects and antioxidant mechanisms of tomato paste. **Biosci Biotechnol Biochem**. 2008; 72(3):677-685.
80. Oelze M, Daiber A, Brandes RP, Hortmann M, Wenzel P, Hink U, et al. Nebivolol inhibits superoxide formation by NADPH oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats. **Hypertension**. 2006; 48(4):677-684.
81. Anderson M, Roshanravan H, Khine J, Dryer SE. Angiotensin II activation of canonical transient receptor potential-6 (TRPC6) channels in rat podocytes requires generation of reactive oxygen species. **J Cell Physiol**. 2013; doi:10.1002/jcp.24461.

Anexos

➤ **Soluciones utilizadas**

1. **Solución Krebs.** Su composición es la siguiente (mM): NaCl, 118,7; KCl, 4,7; CaCl₂, 2,5; KH₂PO₄, 1,2; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄, 1,2; glucosa, 11,1. Una vez gaseada con carbógeno se ajusta el pH a 7,4.
2. **Solución KPSS.** Su composición es la siguiente (mM): KCl, 123,7; Cl₂Ca, 2,5; KH₂PO₄, 1,2; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄, 1,2; glucosa, 11,1.
3. **ROS.** Su composición es la siguiente (mM): KH₂PO₄, 50 mM; EGTA, 1mM; Sacarosa, 150 mM.

Todas las soluciones se preparan con componentes de calidad análisis que se disuelven en agua ultrapura.

➤ **Sustancias utilizadas**

1. **Agonistas.** Para los estudios de funcionalidad de vasos sanguíneos se preparan soluciones madre (10^{-1} - 10^{-2} M) de los agonistas utilizados que se congelan en alícuotas. Las soluciones usadas en los experimentos se preparan diariamente a partir de éstas. Ver lista de sustancias en la parte inferior de este anexo.

2. El resto de sustancias utilizadas se preparan diariamente de acuerdo a las necesidades de los experimentos y en las concentraciones mencionadas en el capítulo de metodología. Las sustancias usadas aparecen a continuación:
 - **Ácido acético.** Sigma-Aldrich
 - **Ácido clorhídrico.** VWR
 - **Ácido tiobarbitúrico.** Sigma-Aldrich
 - **Ácido tricloroacético.** Merck
 - **Angiotensina II humana.** Sigma-Aldrich
 - **Cloramina T.** Sigma-Aldrich
 - **Cloruro de fenilefrina.** Sigma-Aldrich
 - **Cloruro de acetilcolina.** Sigma-Aldrich
 - **Cloruro potásico.** Merck
 - **P-dimetilaminobenzaldeído.** Sigma-Aldrich
 - **Dinitrato de N,N'-dimetil 9,9'biacridinio (Lucigenina).** Sigma-Aldrich
 - **Ácido etilendiaminotetraacético sódico (EDTA).** Sigma-Aldrich
 - **Formaldehido solución 4%.** Merck
 - **Fosfato sódico.** Panreac
 - **Fosfato potásico.** Panreac
 - **Heparina sódica.** Roche
 - **Hidróxido de sodio.** VWR
 - **cis-4-hidroxi L prolina (OH-Pro).** Fluka
 - **Isopropanol.** Panreac
 - **Metanol.** VWR
 - **Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (NADPH).** Sigma-Aldrich
 - **Nitroprusiato sódico dihidratado.** Sigma-Aldrich
 - **N,N-ácido dietil-ditiocarbamato de amonio (DDC).** Sigma-Aldrich
 - **Pentobarbital sódico.** Sigma-Aldrich
 - **Rojo sirio.** Sigma-Aldrich
 - **1,1,3,3, tetrametoxipropano (MDA).** Sigma-Aldrich

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo se han presentado en el XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacología 2013 obteniendo un premio como mejor poster.



EI PÓSTER:

LYCOPENE PREVENTS HYPERTENSION AND CARDIOVASCULAR HYPERTROPHY PRODUCED BY THE INFUSION OF ANGIOTENSIN II

Santos P., Sevilla M.A., Carrón R., Monroy-Ruiz J., Montero M.J.

Ha obtenido un **PREMIO como MEJOR PÓSTER** presentado en el XXXIV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FARMACOLOGÍA.

San Pedro del Pinatar a 19 de septiembre de 2013

Mª Teresa Tejerina Sánchez
Presidenta Fundación Española de Farmacología

Mª Luisa Laorden Carrasco
Presidenta Comité Científico XXXIV Congreso de la SEF

LICOPENO PREVIENE LA HIPERTENSIÓN Y LA HIPERTROFIA CARDIOVASCULAR PRODUCIDA POR ANGIOTENSINA II

Santos P¹; Sevilla MA¹; Carrón R¹; Monroy-Ruiz J²; Montero MJ¹.

¹Dpto de Fisiología y Farmacología. Campus Miguel de Unamuno. Universidad de Salamanca. 32007 Salamanca.

²Dpto de Salud. Universidad Iberoamericana, Ciudad de México. CP 01210.

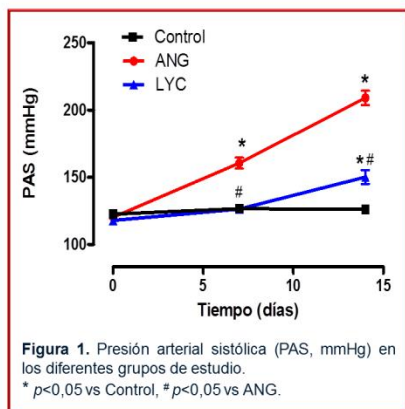
INTRODUCCIÓN

La hipertensión está asociada con el estrés oxidativo y varios estudios han demostrado los efectos beneficiosos de los antioxidantes^{1,2}. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del licopeno, un antioxidante natural abundante en el tomate, sobre la hipertensión y remodelado cardiovascular inducido por la infusión de angiotensina II (Ang II).

METODOLOGÍA

Los experimentos se realizaron con ratas Wistar machos divididas en tres grupos. A dos grupos se les implantó vía subcutánea una minibomba que libera Ang II (288 µg/kg/día) durante 14 días (ANG) y uno de ellos se trató con 10 mg/kg/día de Licopeno (LYC) por vía oral. El tercer grupo, que no recibe ningún tipo de tratamiento se utilizó como control (Control). Semanalmente se midió la presión arterial sistólica (PAS) mediante el método incruento de medida en la arteria caudal. Al final del tratamiento, los animales se sacrificaron, y se extrajo el corazón y la arteria aorta.

El índice de hipertrofia cardiaca se calculó dividiendo el peso del ventrículo izquierdo por el peso corporal. Los parámetros de hipertrofia vascular se determinaron en secciones de arteria aorta utilizando el programa ImageJ. Los estudios de fibrosis cardiaca se realizaron sobre cortes histológicos del ventrículo izquierdo utilizando rojo sirio, que tiñe el colágeno de rojo y en homogenizados de corazón mediante la determinación de hidroxiprolina por espectrofotometría.



Análisis estadístico. Para comparar los valores obtenidos entre los diferentes grupos se emplea el ANOVA de una o dos vías según corresponda, seguido del test de Bonferroni.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados muestran que el licopeno previene la hipertensión y la hipertrofia cardiovascular inducida por angiotensina II.

REFERENCIAS

- Li H, Horke S, Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. Trends Pharmacol Sci. 2013; 34(6):313-319.
- Kizhakekuttu TJ, Widiatsky ME. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. Cardiovasc Ther. 2010; 28(4):20-32.

RESULTADOS

La infusión con Ang II produjo un incremento de la PAS que fue significativamente menor con la administración simultánea de licopeno (Figura 1). Las figuras 2 y 3 muestran los efectos del tratamiento sobre la hipertrofia cardiaca y vascular provocada por Ang II.

En los estudios de fibrosis cardiaca el licopeno atenuó el efecto deletéreo de la Ang II (Figura 4).

