



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismos asociados a las diferencias sexuales en el envejecimiento vascular

Manel Garabito Montoya



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 4.0. España de Creative Commons.**

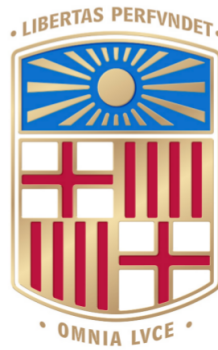
This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

A fluorescence microscopy image of a blood vessel cross-section. The vessel lumen is a dark, irregularly shaped central area. The vessel wall is composed of multiple layers of cells, appearing as concentric rings. The cells are stained with various fluorescent dyes: blue for nuclei, green for cytoplasm or specific proteins, and red for other cellular components. The overall structure is circular and shows a clear boundary between the vessel wall and the surrounding tissue.

Mecanismos asociados a las diferencias sexuales en el envejecimiento vascular

TESIS DOCTORAL
Manel Garabito

A mi madre



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultad de Medicina
Departamento de Cardiología

Tesis doctoral

Mecanismos asociados a las diferencias sexuales en el envejecimiento vascular

Doctorando
Manel Garabito Montoya

Directoras
Dra. Ana Paula Dantas
Dra. Mercè Roqué Moreno

Barcelona, septiembre de 2017



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultad de Medicina
Departamento de Cardiología

La Dra. Ana Paula Dantas y la Dra. Mercè Roqué Moreno Investigadoras Asociadas del grupo de Aterosclerosis y Enfermedad Coronaria del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer/Universitat de Barcelona.

CERTIFICAN:

Que Manel Garabito Montoya, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Mecanismos asociados a las diferencias sexuales en el envejecimiento vascular" para alcanzar el Grado de Doctor por la Universitat de Barcelona.

Barcelona, septiembre de 2017

Fdo.:

Fdo.:

Ana Paula Dantas

Mercè Roqué Moreno

ÍNDICES

“The value of experience is not in seeing much, but in seeing wisely.”

William Osler

ÍNDICE GENERAL

Introducción.....	1
1. Estado actual acerca del envejecimiento vascular.....	2
2. Estructura de las arterias.....	6
2.1. Consideraciones generales.....	6
2.1.1. Capa íntima.....	7
2.1.2. Capa media.....	7
2.1.3. Capa adventicia.....	7
2.2. Tipos de arterias.....	8
2.3. Estructura de las arterias elásticas.....	8
2.3.1. Capa íntima de las arterias elásticas.....	8
2.3.2. Capa media de las arterias elásticas.....	9
2.3.3. Capa adventicia de las arterias elásticas.....	10
2.4. Estructura de las arterias musculares.....	10
2.4.1. Capa íntima de las arterias musculares.....	10
2.4.2. Capa media de las arterias musculares.....	11
2.4.3. Capa adventicia de las arterias musculares.....	12
3. Cambios estructurales en las arterias durante el envejecimiento.....	12
4. Cambios fisiológicos en la pared vascular durante el envejecimiento.....	14
4.1. Óxido nítrico.....	15
4.2. Especies reactivas de oxígeno.....	19
4.2.1. Mitocondria.....	20
4.2.2. NAD(P)Hox.....	20
4.2.3. Ciclooxygenasas.....	22
4.3. Angiotensina II.....	23

5. El papel de los microARNs en los cambios estructurales en las arterias durante el envejecimiento.....	27
5.1. Consideraciones generales.....	27
5.2. miRs y pared vascular.....	28
5.2.1. miR-21.....	29
5.2.2. miR-221/222.....	29
5.2.3. miR-143/145.....	30
6. El sexo como factor de riesgo en el envejecimiento cardiovascular.....	30
Hipótesis.....	32
Objetivos.....	34
Materiales y métodos.....	36
1. Modelos murinos de envejecimiento.....	37
1.1. Modelo de senescencia acelerada.....	37
1.2. Modelo de senescencia cronológica.....	37
2. Estudio de los mecanismos asociados al remodelado vascular durante el envejecimiento.....	38
2.1. Determinación de los marcadores de la senescencia en células vasculares.....	38
2.2. Análisis morfométrico de las arterias elásticas (aorta) y musculares (femoral).....	39
2.3. Análisis del contenido de colágeno y elastina en aorta.....	40
2.4. Análisis del crecimiento de las células musculares lisas de aorta.....	41
2.5. Cambios en la expresión de ARN mensajero de las células musculares lisas de aorta de SAMP8.....	43
2.6. Cambios en la expresión de microARN.....	46
2.7. Validación de los miR mediante qRT-PCR.....	48
2.8. Terapia de miR <i>in vitro</i>	48
2.9. Terapia de miR <i>in vivo</i>	49

3. Estudio de las diferencias asociadas al sexo en el remodelado y función vascular durante el envejecimiento.....	50
3.1. Medición de la presión arterial.....	50
3.2. Estudios de reactividad vascular.....	50
3.3. Análisis morfométrico del remodelado de la aorta.....	51
3.4. Determinación de colágeno por tinción de rojo de sirio.....	51
3.5. Medición de la actividad de las ciclooxigenasas.....	52
3.6. Medición de la producción de prostaglandinas.....	52
3.7. Análisis de los cambios de expresión de miR en aorta.....	52
3.8. Análisis de los cambios de expresión de proteína en aorta.....	52
3.9. Detección del estrés oxidativo mediante dihidroetidio.....	53
3.10. ELISA para determinar los niveles de TNF α en suero de ratón.....	54
4. Análisis estadístico.....	54
Resultados.....	55
Subproyecto 1. Proliferación de células musculares lisas durante el envejecimiento: el papel del miR-21 y la vía AKT/mTOR.....	56
1. Las arterias de ratones SAMP8 son más senescentes que las de ratones SAMR1.....	57
2. Los ratones SAMP8 muestran un mayor grosor de la pared de las arterias aorta y femoral que los ratones SAMR1.....	58
3. El incremento de grosor de la pared de las arterias aorta y femoral que se observa en ratones SAMP8 es causado por la proliferación de células musculares lisas.....	59
4. Las células musculares lisas de la aorta son más proliferas en ratones SAMP8.....	61
5. La lesión de la pared vascular de la femoral produce una mayor hiperplasia en ratones SAMP8.....	62
6. La lesión de la arteria femoral causa una mayor activación de la vía AKT/mTOR en los ratones SAMP8.....	63
7. La inhibición de la vía AKT/mTOR es capaz de disminuir la capacidad proliferativa de las células musculares lisas de SAMP8.....	64

8. La inhibición de miR-21 disminuye la actividad de AKT y reduce la proliferación de células musculares lisas en SAMP8.....	65
9. El tratamiento local in vivo mediante anti-miR-21 reduce la hiperplasia en SAMP8.....	68
Subproyecto 2. La disfunción endotelial mediada por ciclooxigenasas durante el envejecimiento está regulada por angiotensina II de forma diferente en función del sexo.....	70
1. En ratones CD1 no se producen cambios hormonales entre los 3 y los 12 meses de edad...	71
2. En ratones CD1 el peso se incrementa con la edad.....	71
3. El envejecimiento y el Losartán ejercen un efecto sobre la presión arterial.....	72
4. El sexo influye en los cambios en la contractilidad de la aorta durante el envejecimiento.....	72
5. La contracción en respuesta a angiotensina II incrementa con la edad y está influenciada por el sexo.....	74
6. Las hembras mantienen una mayor capacidad de relajación de la aorta incluso a los 12 meses de edad.....	74
7. A los 12 meses, los machos presentan evidencias de disfunción endotelial.....	75
8. A los 12 meses el receptor de angiotensina II AT2 disminuye solamente en machos, sin embargo esto es prevenido por el tratamiento con Losartan.....	75
9. La sintasa de óxido nítrico es fundamental en la relajación de la aorta.....	76
10. La inhibición de las ciclooxigenasas mejora la vasodilatación en machos de 12 meses.....	77
11. La vía de la angiotensina es responsable de la peor relajación de los machos a los 12 meses de edad.....	77
12. El óxido nítrico tiene menos actividad vasorelajadora en machos de 12 meses.....	79
13. Los machos de 12 meses expresan menos eNOS.....	79
14. La vía de la angiotensina II causa una mayor activación de COX1 y COX2 en machos de doce meses.....	79
15. El estímulo mediante acetilcolina incrementa las prostaglandinas vasodilatadoras en hembras y vasoconstrictoras en machos.....	81
16. La vía de la angiotensina II actúa de forma diferente en machos y hembras durante el envejecimiento y es responsable de los efectos perjudiciales observados en machos.....	82

Subproyecto 3. Diferencias asociadas al sexo en el remodelado durante el envejecimiento vascular: el rol del sistema renina-angiotensina.....	83
1. Al envejecer, la aorta sufre una hiperplasia causada por la vía de la angiotensina II que se da a diferente ritmo en machos y hembras.....	84
2. Existe un mismo patrón para la fibrosis en la aorta durante el envejecimiento.....	86
3. El estrés oxidativo incrementa con la edad de forma independiente a la vía de la angII, pero con un ritmo diferente en machos y hembras.....	86
4. La NAD(P)H oxidasa es la enzima responsable de producir el incremento de estrés oxidativo durante el envejecimiento.....	88
5. El TNF α no es responsable directo del patrón de actividad de la NAD(P)H oxidasa.....	89
6. La transcripción de RAS sigue el mismo patrón que la hiperplasia durante el envejecimiento.....	91
7. LA vía AKT/mTOR y la influencia que la vía de la angiotensina II tiene sobre ella explican los diferentes patrones de hiperplasia en machos y hembras al envejecer.....	92
Discusión.....	94
Conclusiones.....	113
Bibliografía.....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muertes por enfermedad cardiovascular en el mundo.....	3
Figura 2. Muertes por enfermedad cardiovascular en Europa en hombres y mujeres.....	4
Figura 3. Pirámide demográfica mundial.....	5
Figura 4. Estructura de las arterias elásticas.....	9
Figura 5. Estructura de las arterias musculares.....	11
Figura 6. Arteria joven.....	13
Figura 7. Arteria envejecida.....	13
Figura 8. El óxido nítrico en la pared vascular.....	15
Figura 9. El óxido nítrico en la célula muscular lisa.....	16
Figura 10. Formación del peroxinitrito.....	18
Figura 11. NADPH oxidasa.....	21
Figura 12. Sistema Renina Angiotensina.....	26
Figura 13. Síntesis de miR.....	27
Figura 14. miRs en la regulación de la transcripción.....	28
Figura 15. Senescencia en SAM.....	57
Figura 16. Grosor de aorta y femoral en SAM.....	58
Figura 17. El incremento de grosor en aorta y femoral es debido a células musculares lisas.....	59
Figura 18. FSP1 se expresa más en SAMP8 que en SAMR1.....	60
Figura 19. Proliferación de células musculares lisas de SAM <i>in vitro</i>	61
Figura 20. Estenosis en femoral de SAM.....	62
Figura 21. Cambios en la expresión de ARNm en SAM.....	63
Figura 22. Inhibición de ERK y PI3K en células musculares lisas de SAM.....	64
Figura 23. Cambios en la red de miR causados por la senescencia en SAM.....	65
Figura 24. Red de miR asociados a la vía AKT/mTOR, el envejecimiento y el cambio de fenotipo....	66
Figura 25. Diferencias en la expresión de miR en aorta de SAM.....	67
Figura 26. Tratamiento con miR y anti-miR en células musculares lisas de SAM.....	68

Figura 27. Tratamiento con miR y anti-miR <i>in vivo</i> en femoral de SAM.....	69
Figura 28. Influencia del sexo y la edad en la contracción inducida por Ang II.....	73
Figura 29. Expresión de ARNm de componentes clave de SRA.....	75
Figura 30. Rol de las COX en la relajación inducida por ACh.....	76
Figura 31. Papel de la AngII en la vasodilatación en respuesta a ACh.....	77
Figura 32. Rol de la NOS en las contracciones inducidas por AngII.....	78
Figura 33. Influencia del sexo, la edad y la AngII en la actividad y expresión de las COX en aorta.....	80
Figura 34. Hiperplasia en aorta durante el envejecimiento en ratones CD1.....	84
Figura 35. Deposición de colágeno en aorta durante el envejecimiento en ratones CD1.....	85
Figura 36. Estrés oxidativo en aorta durante el envejecimiento en ratones CD1.....	87
Figura 37. Efecto de la inhibición de TNF α en el estrés oxidativo.....	88
Figura 38. Cuantificación de ARNm de enzimas de la vía AKT/mTOR.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prostaglandinas y sus receptores.....	23
Tabla 2. Primers.....	45
Tabla 3. Ensayos Taq-Man.....	47
Tabla 4. Niveles de estradiol y testosterona en machos y hembras a los 3 y los 12 meses.....	71
Tabla 5. Peso de machos y hembras a los 3, 7 y 12 meses de edad.....	72
Tabla 6. Presión arterial de machos y hembras a los 3 y los 12 meses de edad.....	72
Tabla 7. Niveles de prostanoides después de la curva de concentración-efecto a la Ach.....	82

ABREVIATURAS

ECV – Enfermedades cardiovasculares

OMS – Organización Mundial de la Salud

ERC – Enfermedad Renal Crónica

SRA – Sistema Renina-Angiotensina

AngI – Angiotensina I

AngII – Angiotensina II

AngIII – Angiotensina III

AT1R – Receptor de angiotensina II de tipo 1

AT2R – Receptor de angiotensina II de tipo 2

ECA – Enzima convertidora de angiotensina

PIP₂ – Fosfatidil inositol difosfato

IP₃ – Inositol trifosfato

DAG – Diacilglicerol

NO – Óxido nítrico

NOS – Sintasa de óxido nítrico

eNOS – Sintasa de óxido nítrico endotelial

nNOS – Sintasa de óxido nítrico neuronal

iNOS – Sintasa de óxido nítrico inducible

GMPc – Guanosín monofosfato cíclico

COX – Ciclooxygenasas

PGHS – Prostaglandina-endoperóxido sintetasa

TXA₂ – Tromboxano

PGI₂ – Prostaciclina

ROS – Especies reactivas de oxígeno

BH₄ – Tetrahidrobiopterina

ONOO⁻ – Peroxinitrito

O_2^- – Anión superóxido

ONOOH – Ácido peroxinitroso

NO_2 – Dióxido de nitrógeno

OH⁻ – Hidroxilo

CO_2 – Dióxido de carbono

$ONOOCO_2^-$ – Nitrosoperoxicarbonato

CO_3^- – Radical de carbonato

H_2O_2 – Peróxido de hidrógeno

LDL – Lipoproteína de baja densidad

NAD(P)H – Nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido

NAD(P)Hox – Nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido oxidasa

ARN – Ácido ribonucleico

ARNm/mARN – Ácido ribonucleico mensajero

miR – Microácido ribonucleico

SAM – Ratones propensos a la senescencia acelerada (nombre genérico de la cepa)

SAMR1 – Ratones resistentes a la senescencia acelerada

SAMP8 – Ratones propensos a la senescencia acelerada

SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

ELISA – Inmunoensayo enzimático

PBS – Tampón fosfato salino

HBSS – Solución salina de Hank

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

GAPDH - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

qRT-PCR – Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

Ct – Nivel de umbral de ciclos de una reacción en cadena de la polimerasa

FTIC – Isocianato de fluoresceína

DAPI – 4',6-diamino-2-fenilindol

DHE – Dihidroetidio

BrdU – Bromodeoxiuridina

KCl – Cloruro de potasio

ACh – Acetilcolina

NPS – Nitroprusiato

Phe – Fenilefrina

L-NAME – Metil-estearato de NG-nitro-L-arginina

SEM – Error estándar de la media

INTRODUCCIÓN

“Inside every old person is a young person wondering what happened”

Terry Pratchett

1. Estado actual del conocimiento acerca del envejecimiento vascular.

Hace ya más de cien años, en el siglo XIX, se sabía que el sistema cardiovascular es determinante en el envejecimiento. Citando a Sir William Osler (1849-1919): “*a man is only as old as old as his arteries*” (un hombre es tan viejo como lo son sus arterias)¹. A lo largo de los años, este aforismo ha sido respaldado por estudios que demuestran que el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (ECV) incrementa a medida que envejecemos^{2,3}.

El envejecimiento es un proceso multifactorial caracterizado por alteraciones de diversas vías metabólicas, pérdida progresiva de integridad fisiológica y pérdida gradual de la homeostasis de los tejidos. Éste proceso incrementa la susceptibilidad a las patologías e incrementa la mortalidad en consecuencia al provocar una disminución en la funcionalidad de diversos tejidos y órganos^{4,6}. A día de hoy el envejecimiento del sistema cardiovascular es a día un fenómeno multifactorial de gran complejidad que aún no ha sido comprendido en su totalidad^{7,8}, aunque es bien conocido que conlleva cambios estructurales y funcionales como lo son la disfunción endotelial y el remodelado vascular^{7,8}. Asimismo, se ha demostrado que se trata de un proceso común a todos los mamíferos, independientemente de la presencia o ausencia de otros factores de riesgo cardiovascular⁹.

Es bien sabido que el envejecimiento cardiovascular es un fenómeno global de alta importancia social, sanitaria y económica. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ECV asociadas al envejecimiento son la principal causa de muerte a nivel mundial. Según un informe de la OMS, se calcula que en 2012 murieron 17,5 millones de personas debido a ECV, una cifra que supone el 31% de las muertes registradas en todo el mundo ese año. De todas estas muertes por ECV, el 42% (7,4 millones) fueron debidas a cardiopatía coronaria, mientras que el 38% (6,7 millones) fueron causadas por accidentes vasculares cerebrales. No solamente se trata de enfermedades responsable de la mayor mortalidad total registrada, también tienen una elevada prevalencia, ya que a los 40 años de edad, la probabilidad de padecer una ECV cualquiera a lo largo de la vida es del 50%¹⁰.

Estas cifras de por sí evidencian la importancia del envejecimiento como factor de riesgo y de las ECV, pero además suelen encontrarse asociadas con otros problemas de salud.

Entre los desórdenes mentales asociados al envejecimiento vascular encontramos la depresión y la ansiedad¹¹. La depresión se haya asociada a las ECV, de forma que padecerla incrementa la posibilidad de sufrir ECV en un 50%^{12,13}. Asimismo se sabe que el 29% de los pacientes de infarto sufren depresión hasta 10 años tras el evento cardiovascular¹⁴. La ansiedad incrementa en un 43% el

riesgo de padecer un infarto de miocardio agudo¹⁵ y la ansiedad debida al infarto es, asimismo un dato predictivo de posibles complicaciones cardíacas post-infarto¹⁶.

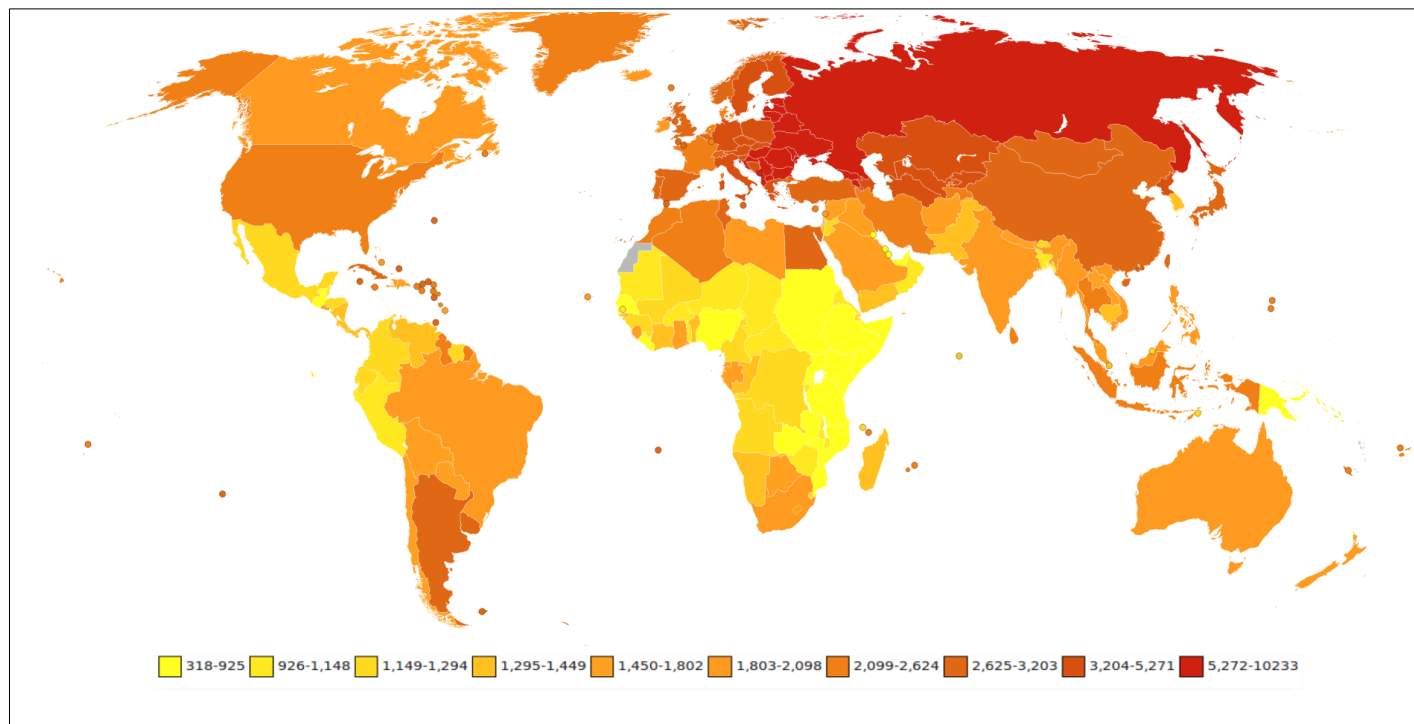


Fig. 1. Muertes por enfermedad cardiovascular por cada millón de personas en 2012 en todo el mundo. Fuente: OMS

Por otro lado, también existen evidencias que asocian el envejecimiento y la demencia. Se considera demencia la pérdida de función cerebral y habilidad cognitiva, y tiene como consecuencia la pérdida de la habilidad para llevar a cabo las funciones básicas para el día a día¹⁷. Entre los diferentes tipos de demencia podemos citar el Alzheimer y la demencia vascular, entre otras muchas¹⁸. La reducción del flujo de sangre en el cerebro debida al envejecimiento vascular empeora la homeostasis cerebral¹⁹ y estudios recientes demuestran que los pacientes con signos de demencia y con historial de ECV muestran más anormalidades cardiovasculares a nivel estructural y funcional que aquellos que no presentan demencia²⁰. También se ha demostrado que la demencia se haya asociada a diversas ECV como la enfermedad coronaria, ya que existe una gran evidencia de que los pacientes que han padecido enfermedad coronaria tienen más probabilidades de sufrir demencia²¹⁻²⁵. Diversos estudios han sugerido que las ECV alteran el flujo de sangre en los vasos más pequeños del cerebro^{26,27} generando problemas en la homeostasis cerebral y en la barrera hematoencefálica, lo que puede establecer las bases para desarrollar demencia²⁸.

Asimismo existen evidencias de asociación entre las enfermedades renales y las ECV. La enfermedad renal crónica (ERC), en concreto, se asocia a las ECV²⁹. Los pacientes con ERC sometidos a diálisis padecen una tasa de mortalidad por ECV del 40%³⁰ y además de factores de riesgo

INTRODUCCIÓN

cardiovasculares tradicionales (hipertensión, diabetes...), se ha asociado el estrés oxidativo, la inflamación y el envejecimiento a la ERC³¹⁻³⁴. Diversos estudios han sugerido que las ECV y la ERC se encuentran asociadas a través de la inflamación, el estrés oxidativo, la fibrosis, la calcificación de las paredes arteriales y la disfunción endotelial, todos ellos factores asociados al envejecimiento^{35,36}. De hecho el sistema renina-angiotensina (SRA), capaz de generar múltiples cambios la vasculatura (entre ellos afecta a la generación de óxido nítrico, estrés oxidativo e inflamación) es una de las candidatas a ser el nexo patofisiológico entre las ECV y la ERC, y se ha visto que tratando a los pacientes con el objetivo de regular esta vía metabólica les beneficia^{37,38}.

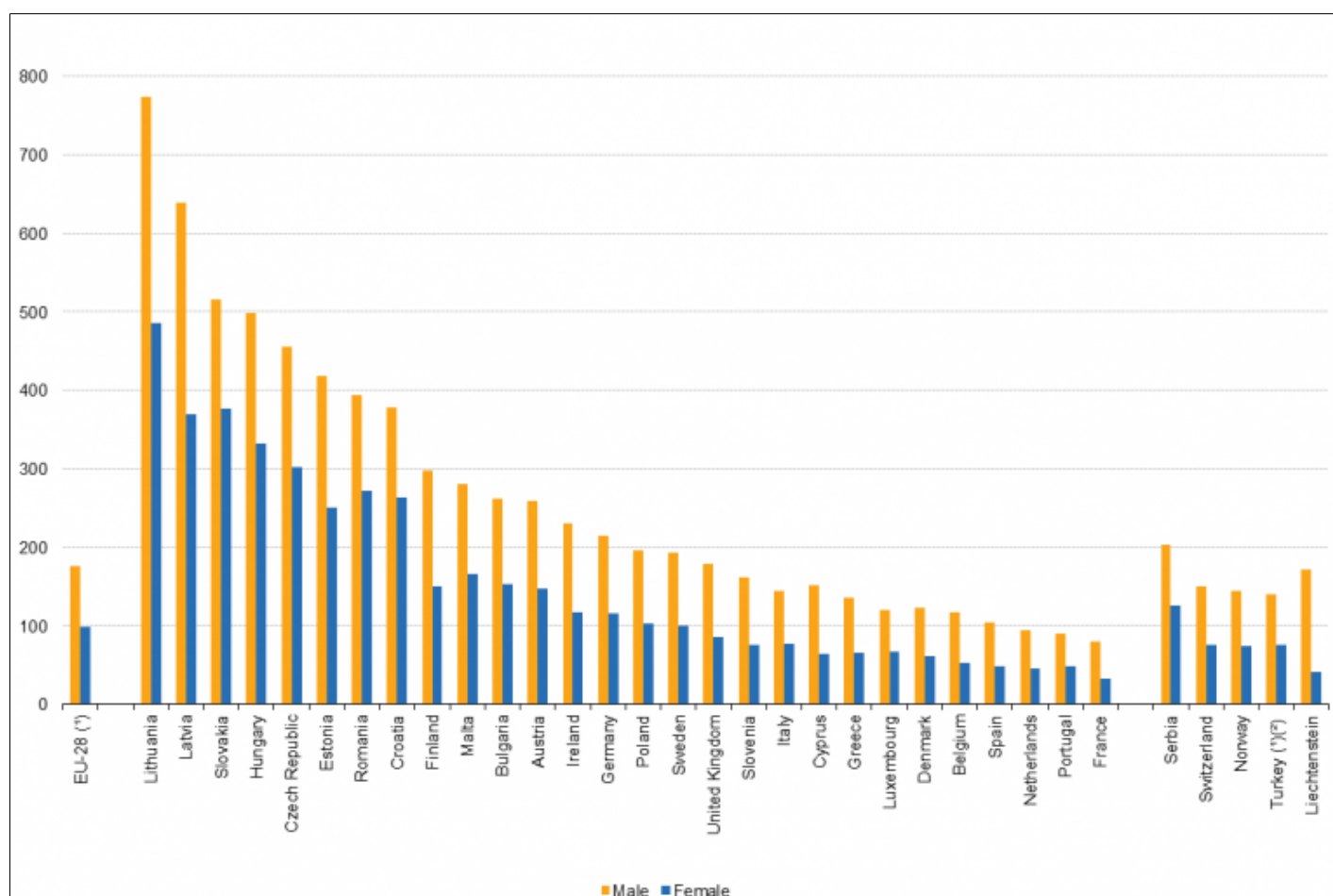


Fig. 2. Muertes por enfermedad cardiovascular en Europa comparando hombres y mujeres (datos por cada 100 000 habitantes). Fuente: Eurostat.

Sin embargo, pese a todo lo que se ha descubierto ha existido la tendencia a generalizar en las conclusiones a las que se han llegado, siempre suponiendo que lo que se ha descubierto que es válido para los hombres, también lo es para las mujeres. Esto ha llevado a suponer que hombres y mujeres envejecen de la misma forma y siguiendo la misma progresión a lo largo del tiempo, pero no ha sido hasta hace poco tiempo que se ha empezado a plantear que esto no tiene porqué ser así. Hoy en día podemos encontrar estudios, tanto pertenecientes a la investigación básica como clínica, que

INTRODUCCIÓN

demuestran que el envejecimiento cardiovascular se da de forma diferente en función del sexo³⁹⁻⁴¹. Afortunadamente, con el creciente reconocimiento de la importancia de las diferencias asociadas al sexo en ECV, el interés en investigar las ECV en mujeres ha crecido sustancialmente^{39,42}. Este interés ha dado lugar a estudios cuyos resultados permiten afirmar que, si se excluyen los factores de riesgo conocidos para el envejecimiento cardiovascular, los hombres tienen un patrón de envejecimiento cardiovascular progresivo y mantenido, mientras que las mujeres presentan un punto muy claro que establece un cambio en la velocidad de la progresión de este proceso: la menopausia^{43,44}.

Antes de llegar a la menopausia las mujeres son hemodinámicamente más jóvenes que los hombres, pues se ha demostrado que la incidencia de ECV se da más tarde en mujeres premenopausicas que en hombres de la misma edad, con una diferencia de aproximadamente 10 años para la aparición de ECV^{7,39,42,45,46}. Este mismo patrón se da en diferentes países y etnias, y se reproduce en modelos animales de laboratorio, sugiriendo la existencia de un factor fisiológico común ligado al sexo y excluyendo que se trate de algún tipo de influencia ambiental, como pueden ser factores socio-económicos.

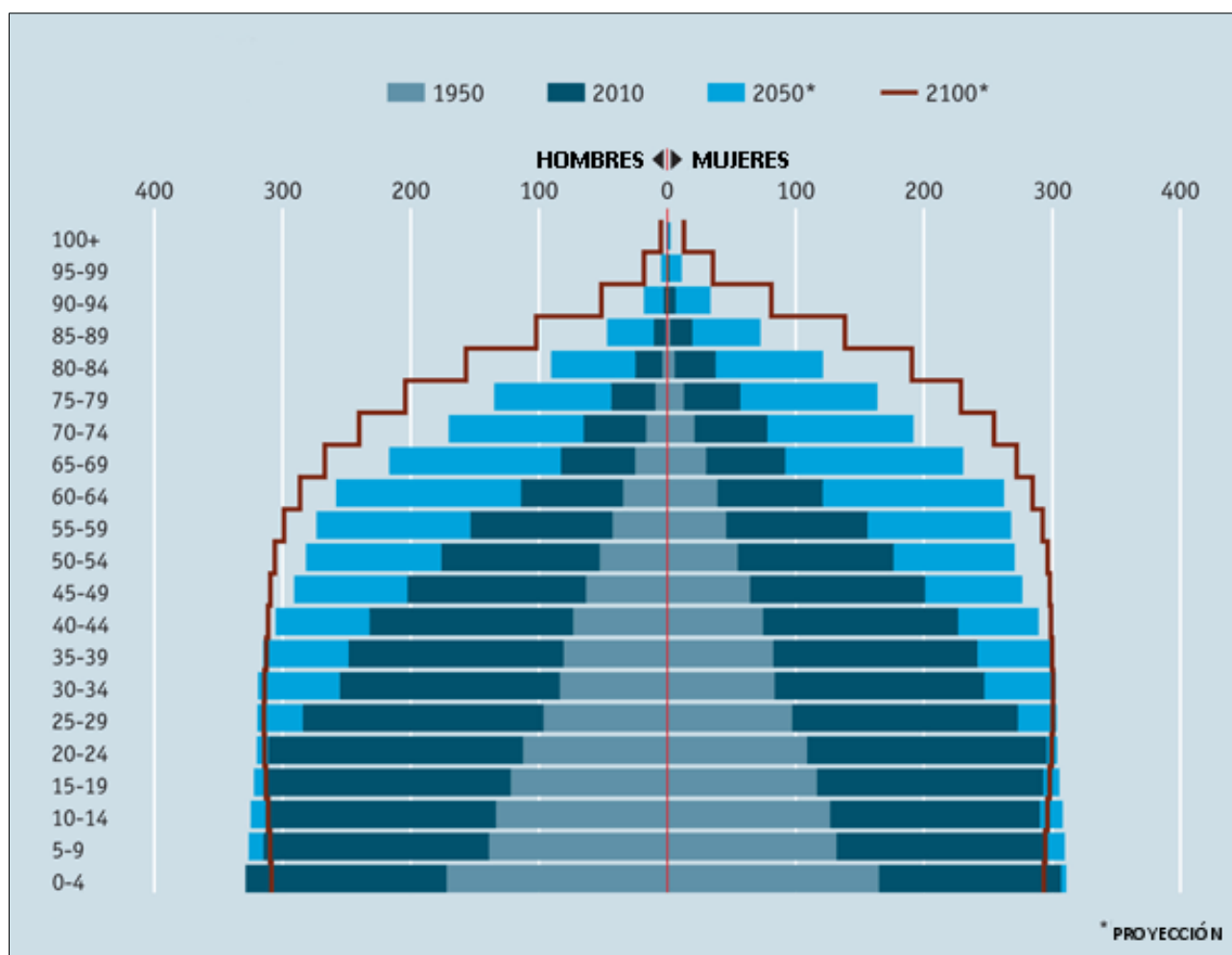


Fig. 3. Pirámide demográfica mundial de 1950, 2010 y proyecciones para 2050 y 2100. Fuente: *The Economist*.

La población mundial está envejeciendo rápidamente y cabe esperar que haya cada vez más personas con riesgo de padecer ECV. Según la OMS, entre los años 2000 y 2050 la población mayor de 60 años se duplicará desde el 11% al 22% de la población total, lo que en números absolutos significa pasar de 605 millones de personas mayores de 60 años a 2000 millones. En el mismo periodo de tiempo la cifra de octogenarios se incrementará 4 veces hasta alcanzar los 395 millones. Si a todo esto añadimos que las mujeres viven un promedio de 6 a 8 años más que los hombres, queda patente la importancia de estudiar el envejecimiento y el sexo como factores de riesgo cardiovascular y es imperativo averiguar cómo y por qué existen diferencias asociadas al sexo.

2. Estructura de las arterias.

En esta tesis se van a describir las arterias de gran calibre y las de tamaño medio, pues son las que revisten interés en el trabajo experimental realizado. Esto es así porque las arterias de mayor tamaño, que conducen y distribuyen la sangre desde el corazón al resto del cuerpo, son las que sufren los cambios más importantes durante el envejecimiento ya que deben atenuar los cambios de presión debidos al ciclo cardíaco para así mantener una presión estable en el resto del sistema circulatorio y deben distribuir correctamente la sangre para una correcta irrigación de los órganos.

Los cambios estructurales y funcionales en las arterias de mayor calibre se traducen en problemas que afectan a la totalidad del sistema circulatorio y son de los primeros procesos fisiopatológicos que suceden durante el envejecimiento^{7,8}. Hasta la fecha se ha descrito que existen multitud de cambios durante el envejecimiento en las arterias de mayor tamaño, pero no es así en el caso de las arterias de resistencia ni los capilares arteriales⁴⁸, en las que los cambios documentados no son claros. Por estas razones hemos trabajado con arterias de gran calibre y por ello son las que se tratarán en la presente tesis⁴⁷.

2.1. Consideraciones generales:

Las arterias se encargan de distribuir la sangre oxigenada por todo el cuerpo (con la excepción de las arterias pulmonares) desde los ventrículos. Cada arteria está compuesta de tres capas: íntima, media y adventicia. Dichas capas pueden variar en grosor y complejidad estructural entre arterias.

2.1.1. Capa íntima:

La capa íntima está compuesta por el endotelio, formado por una monocapa de células que tapizan la luz de la arteria y cuya forma suele ser fusiforme en sentido paralelo al flujo sanguíneo. Asimismo, la capa íntima consta de la lámina basal o capa subendotelial, formada por tejido fibroconectivo y elástico laxo. Esta capa puede llegar a ser muy compleja y presentar diferentes variaciones en las arterias más pequeñas, los capilares arteriales. En estos capilares puede ser una capa continua (p.ej., si se encuentra en músculo), sinusoidal (p.ej., en el hígado) o fenestrados (p.ej., en el páncreas) dependiendo de su función. Esta clasificación puede llegar a ser mucho más compleja si tenemos en cuenta las particularidades de cada tipo de capa íntima debida a su función y debido a en que órgano se encuentra, pero en la presente tesis se van a tratar las arterias de mayor calibre y por ello no se profundizará más en este aspecto.

2.1.2. Capa media:

La capa media se separa de la capa íntima y de la capa adventicia por dos láminas elásticas, la lámina elástica interna y la lámina elástica externa, respectivamente. Esta capa está formada por células musculares lisas y tejido conectivo extracelular o matriz extracelular producida principalmente por estas mismas células. Dicha matriz extracelular está compuesta en su mayor parte por colágeno y por varias láminas de elastina (de menor calibre que la lámina elástica interna y la externa) que se van alternando con múltiples capas de células musculares lisas concéntricas en las arterias de mayor calibre.

2.1.3. Capa adventicia:

La capa adventicia está formada principalmente por colágeno y fibroblastos que se entremezclan con el tejido conectivo que da soporte a la arteria. También pueden haber presentes estructuras como pequeños vasos o fibras nerviosas, y diversos tipos celulares como macrófagos, o linfocitos en esta capa.

2.2. Tipos de arterias:

Las arterias se pueden dividir en cuatro grupos: las grandes arterias de tipo elástico, las arterias medianas de tipo muscular, las pequeñas arteriolas de resistencia y los capilares arteriales.

Las arterias elásticas salen del corazón e incluyen la aorta y las principales ramas que se derivan de ella, como la arteria braquioencefálica, la carótida común, las ilíacas comunes y la subclavia. Asimismo, la arteria pulmonar también es de este tipo. Estas arterias tienen la función de conducir la sangre desde el corazón a las arterias musculares para la distribución de la sangre oxigenada (excepto en el caso de la arteria pulmonar), por ello las arterias elásticas reciben grandes cantidades de sangre del corazón, que las somete a diferentes presiones debido a la contracción y relajación de dicho órgano durante el ciclo cardíaco. Las arterias elásticas tienen la función de ayudar a mantener una presión sanguínea estable y continua en el árbol arterial, mitigando los efectos de los latidos del corazón en los cambios de presión sanguínea en las arterias musculares, arteriolas y capilares arteriales. Para cumplir su función, las arterias elásticas suelen tener un gran calibre (más de 1 cm de diámetro en humanos) y una pared arterial fina en relación a su diámetro.

2.3. Estructura de las arterias elásticas:

En la descripción de las arterias elásticas se tomará como modelo la aorta, por ser la más representativa y la que más concierne a la presente tesis.

2.3.1. Capa íntima de las arterias elásticas:

La capa íntima suele tener un grosor de alrededor de 100 μm en humanos, y está formada por una monocapa continua y bien cohesionada de células endoteliales fusiformes orientadas para oponer la menor resistencia posible al flujo sanguíneo. La lámina basal sobre la que se asientan las células endoteliales está compuesta de colágeno, fibras elásticas, algunos fibroblastos dispersos y unas pocas células musculares lisas orientadas longitudinalmente y macrófagos en la parte más interna de esta capa. Los macrófagos se encargan de la fagocitosis, la limpieza y la acumulación de lípidos en esta capa. Esta capa se ve profundamente alterada bajo condiciones patológicas.

2.3.2. Capa media de las arterias elásticas:

La capa media de las arterias elásticas tiene alrededor de 500 μm en humanos y está formada por capas concéntricas de células musculares lisas alternadas con láminas formadas por elastina. El número y grosor de estas capas concéntricas varía con la edad. Cada una de estas capas concéntricas mide aproximadamente 15 μm en humanos y tienen la función de transmitir la tensión y resistir la separación. Esta capa carece de fibroblastos en condiciones normales, pues las células musculares lisas sintetizan todos los componentes de la matrix extracelular. Si comparamos las arterias elásticas con las musculares, para una misma área las elásticas tienen menos cantidad de células musculares lisas. En humanos, la aorta tiene un peso seco de un 20% de células musculares lisas y un 60% de colágeno y fibras elásticas, con más fibras elástica en la región torácica de la aorta y más colágeno en la región abdominal.

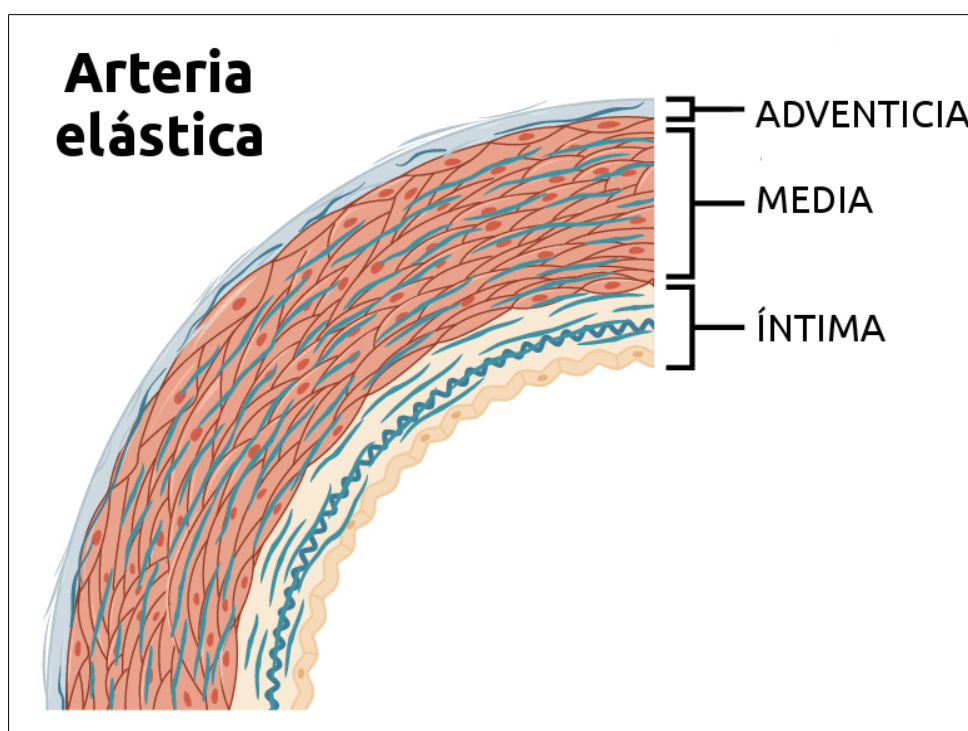


Fig. 4. Estructura de las arterias elásticas. Se muestra una sección de corte transversal. Fuente: Anatomy and Physiology textbook, Rice University.

2.3.3. Capa adventicia de las arterias elásticas:

La capa adventicia es relativamente fina y su función principal es contribuir a mantener la correcta forma de la arteria, ayudando a que no se dilate en exceso. Asimismo puede contener los *vasa vasorum*, pequeños vasos que ayudan a mantener irrigadas las capas más exteriores de los grandes vasos y también pueden presentar pequeños vasos linfáticos. A través de esta capa también se pueden encontrar fibras nerviosas, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B, mastocitos, eosinófilos y neutrófilos dependiendo del estado fisiopatológico de la arteria.

El tipo celular que encontramos más comúnmente en esta capa es el fibroblasto. Los fibroblastos de la adventicia son capaces de reaccionar a múltiples estímulos, participando en el remodelado vascular, la respuesta inflamatoria y el crecimiento celular.

2.4. Estructura de las arterias musculares:

Las arterias musculares también son llamadas de distribución, de acuerdo con su función más importante. Son arterias musculares la mayor parte de las arterias visibles a simple vista (excluyendo las mencionadas previamente como elásticas). Estas arterias son capaces de llevar a cabo una contracción activa con el objetivo de controlar el flujo sanguíneo hacia órganos concretos. Su diámetro varía desde aproximadamente 1 cm hasta 0,05 cm y tienen paredes relativamente gruesas comparándolas con su diámetro. Proximalmente se unen a las arterias elásticas, mientras que distalmente se continúan en arteriolas.

2.4.1. Capa íntima de las arterias musculares:

La capa íntima de las arterias musculares se asemeja a la descrita para las arterias elásticas. Está formada por una monocapa de células endoteliales fusiformes paralelas al flujo de sangre. En los vasos más pequeños la lámina basal del endotelio se une íntimamente a la lámina elástica interna que delimita la capa íntima, pero los vasos de gran tamaño pueden presentar una pequeña capa subendotelial consistente en fibras elásticas, colágeno y fibroblastos ocasionalmente.

En algunas de las mayores arterias musculares, como es el caso de las coronarias, esplénica y renal, pueden haber unas pocas células musculares lisas dispuestas longitudinalmente. Algunas arterias musculares, como la uterina, presentan una capa íntima desproporcionadamente gruesa.

Un aspecto característico de las arterias musculares es una prominente lámina elástica interna, que separa la íntima de la media. Dicha lámina es gruesa, está formada por fibras de elastina entretejidas y en preparaciones histológicas suele mostrar un aspecto ondulado.

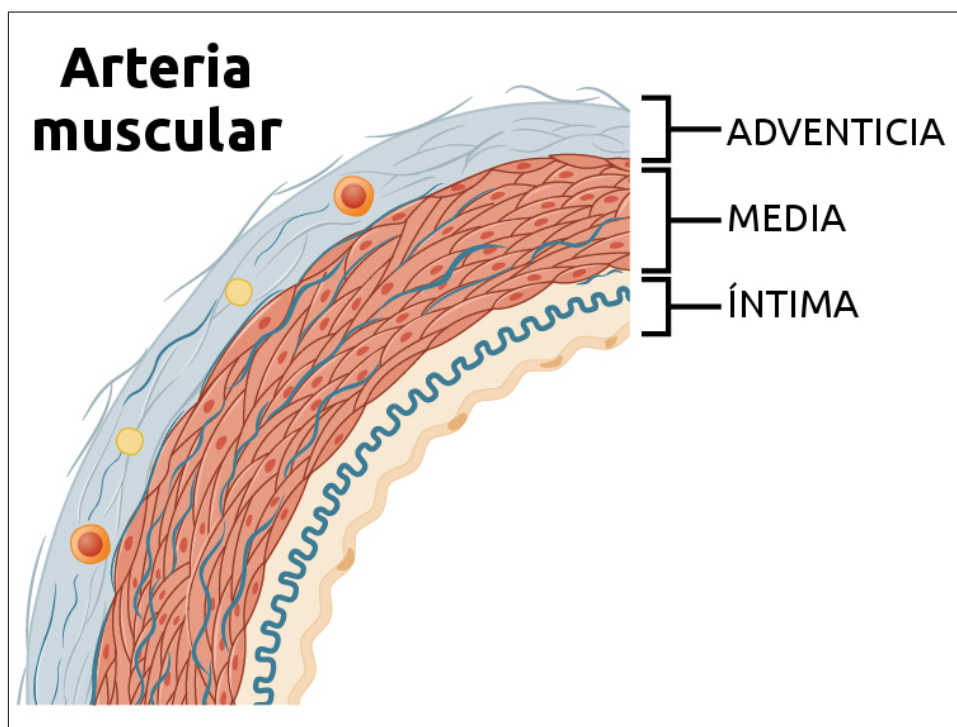


Fig. 5. Estructura de las arterias musculares. Se muestra una sección de corte transversal. Fuente: Anatomy and Physiology textbook, Rice University.

2.4.2. Capa media de las arterias musculares:

La capa media está formada principalmente por células musculares lisas en capas concéntricas alternadas con láminas elásticas también concéntricas. En humanos, las arterias musculares más pequeñas constan de 3 a 4 capas de células musculares lisas, mientras aquellas que son más gruesas pueden llegar a tener más de 40 de estas capas.

En la matriz extracelular pueden haber presentes gran cantidad de proteoglicanos. Dado su diámetro, las arterias intracraneales presentan una capa media relativamente fina. Las ramas de las arterias pulmonares también tienen una capa media más fina de lo normal. Por otro lado, las arterias sometidas a flexiones repetidas, como la umbilical y axilar entre otras, existe una capa en la zona interna de la media constituida por células musculares lisas dispuestas longitudinalmente en lugar de concéntricamente.

Comparado con las arterias elásticas, las musculares tienen una capa media en que predominan las células musculares sobre las fibras elásticas, aunque siguen estando presentes. Las láminas elásticas

suelen ser más distinguibles en algunas de las mayores arterias musculares y van perdiendo protagonismo a medida que disminuye el diámetro de las arterias. La capa elástica externa separa la media de la adventicia.

2.4.3. Capa adventicia de las arterias musculares:

La capa adventicia en las arterias musculares suele ser casi tan gruesa como la capa media. Está constituida en su mayor parte por fibras longitudinales y circulares de fibras elásticas y colágeno. Ocasionalmente, en arteria coronaria y arteria esplénica, puede haber algunas células musculares lisas en esta capa. También pueden haber presentes fibras nerviosas.

La adventicia de estas arterias se mezcla con los tejidos de soporte adyacentes al vaso y a menudo es difícil diferenciar el límite de cada uno. Aunque los *vasa vasorum* no son tan evidentes en las arterias musculares como en las elásticas, también cumplen aquí un papel importante proveyendo de nutrientes las capas más externas.

3. Cambios estructurales en las arterias durante el envejecimiento.

La pared vascular, tanto de arterias elásticas como musculares, es un tejido dinámico que cambia con el tiempo dependiendo de las condiciones fisiopatológicas^{49,50}. Las células endoteliales se renuevan lentamente, mientras que las células musculares lisas suelen hacerlo con más rapidez.

Se han observado muchas alteraciones en arterias causadas por el envejecimiento, como la proliferación de la íntima. La proporción entre la capa íntima y la media de la arteria carótida se incrementa de 2 a 3 veces entre los 20 y los 90 años de edad^{7,51}, y la circunferencia de la aorta incrementa gradualmente con la edad⁵¹⁻⁵³.

El envejecimiento altera de forma dramática el volumen y el contenido en la capa íntima de ratas, primates y humanos⁵⁴⁻⁶⁰. Células musculares lisas y colágenos de tipo I y de tipo III se incrementan de forma muy marcada en la capa íntima engrosada por la edad en ratas⁵⁴ y los primates de unos 20 años de edad también presentan una capa íntima en la que, bajo el endotelio, hay presente una gruesa capa de células musculares lisas^{57,61}.

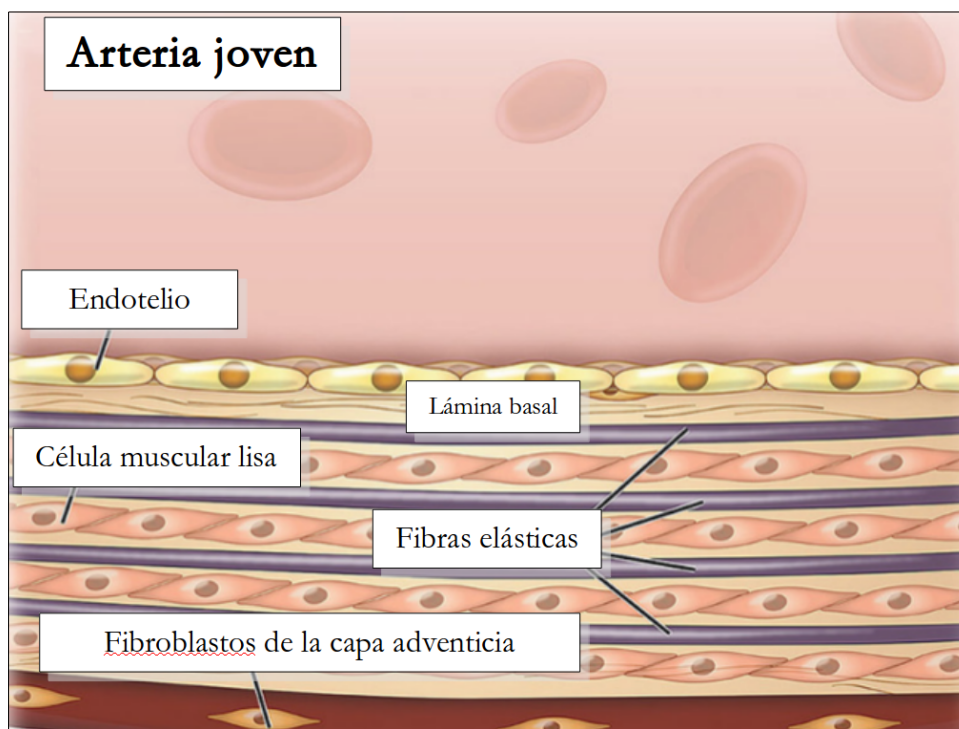


Fig. 6. Esquema de un corte transversal de una arteria joven y sana. Fuente: Van Varik 2012

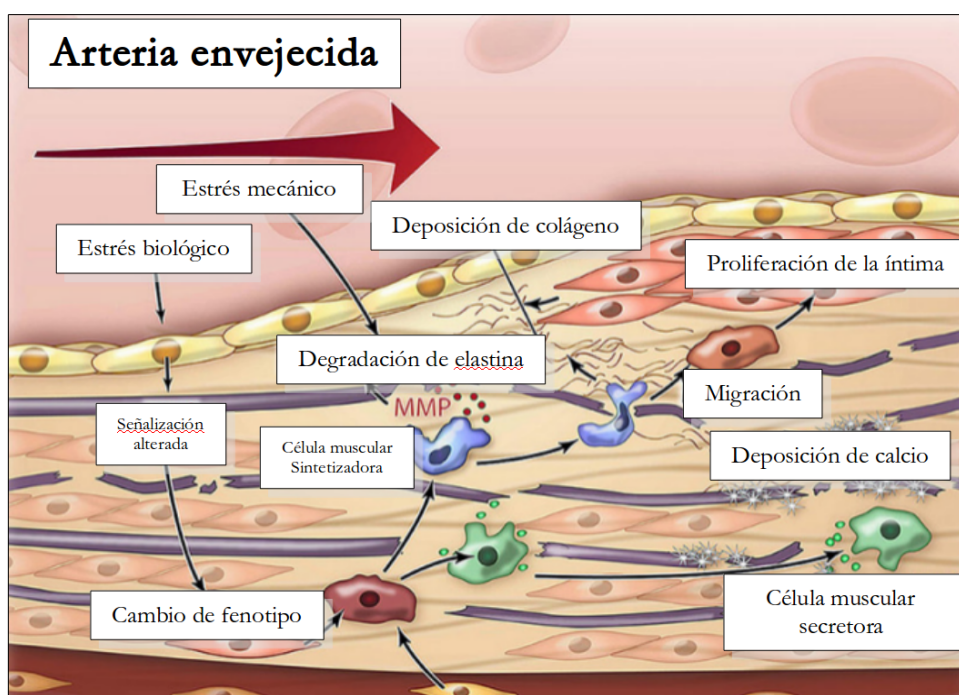


Fig. 7. Esquema de un corte transversal de una arteria envejecida. Fuente: Van Varik 2012

Estos cambios van acompañados de un incremento en la rigidez de la pared vascular⁶²⁻⁶⁵, que se debe sobretodo a la acumulación de colágeno y a la degeneración del material elástico de la pared arterial, es decir, del deterioro de la fibras de elastina^{65,66}. También otros factores contribuyen a esto, como la glicosilación de proteínas de la pared vascular y a la deposición de calcio⁶⁷.

Juntamente con esto se observa un fenotipo proinflamatorio o inflamación latente en la pared de los vasos que acompaña al envejecimiento en mamíferos⁶⁸, y se sabe que este hecho agrava la situación, ya la inflamación crónica puede empeorar el proceso normal de envejecimiento⁶⁹⁻⁷¹. La inflamación puede ser el resultado de múltiples causas, como daños en el tejido de la pared vascular, un sistema inmunitario envejecido que no siempre puede mantener limpio el organismo de patógenos y células disfuncionales, la propensión de las células senescentes y disfuncionales de segregar citoquinas proinflamatorias y problemas debidos a una autofagia deficiente, entre otros⁶⁸.

Estas alteraciones tienen como resultado la activación de rutas metabólicas proinflamatorias y, por tanto, la producción de citoquinas proinflamatorias^{68,72}. La inflamación también se ha visto vinculada a patologías que habitualmente se dan con la vejez, como son la obesidad y la diabetes de tipo 2⁷³, y tiene un papel importante en la aterosclerosis⁷⁴. De hecho, se observa aterosclerosis en grado avanzado en autopsias de pacientes de avanzada edad, comparado con pacientes jóvenes⁵².

4. Cambios fisiológicos en la pared vascular durante el envejecimiento:

El endotelio mantiene el tono vascular bajo condiciones normales de homeostasis, sin embargo los factores de riesgo cardiovascular van asociados a un endotelio disfuncional⁷⁵⁻⁷⁷. Cuando el endotelio se vuelve disfuncional la pared arterial padece un estado crónico de inflamación acompañado de una pérdida de factores antitrombóticos y produce menos cantidad de NO. Por otro lado se incrementan los factores protrombóticos y vasoconstrictores, y la arteria se vuelve anormalmente vasoreactiva incrementando el riesgo de problemas vasculares⁷⁸.

El endotelio se vuelve disfuncional al envejecer, cuando en la pared de las arterias las rutas metabólicas y la comunicación entre endotelio y musculatura lisa se alteran⁷⁹. El envejecimiento va acompañado por un desequilibrio entre las señales de vasodilatación y la vasoconstricción generadas por el endotelio. Este desequilibrio se caracteriza por una disminución del NO, así como por un incremento de los productos de las ciclooxigenasas (COX)⁸⁰⁻⁸². Este hecho tiene otros efectos, como el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS)⁸².

Se ha descubierto que la disfunción endotelial que acompaña al envejecimiento se asocia a enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis o la enfermedad coronaria⁸³, pero también se da junto a otras patologías como la disfunción eréctil⁸⁴, la disfunción renal⁸⁵, el Alzheimer⁸⁶, la alteración de los ritmos circadianos⁸⁷, la osteoporosis⁸⁸ y retinopatías⁸⁹.

4.1. Óxido nítrico:

El NO generado se produce mediante la actividad de la NO sintasa (NOS) y este proceso requiere el paso de L-arginina a L-citrulina por acción de la eNOS⁹⁰.

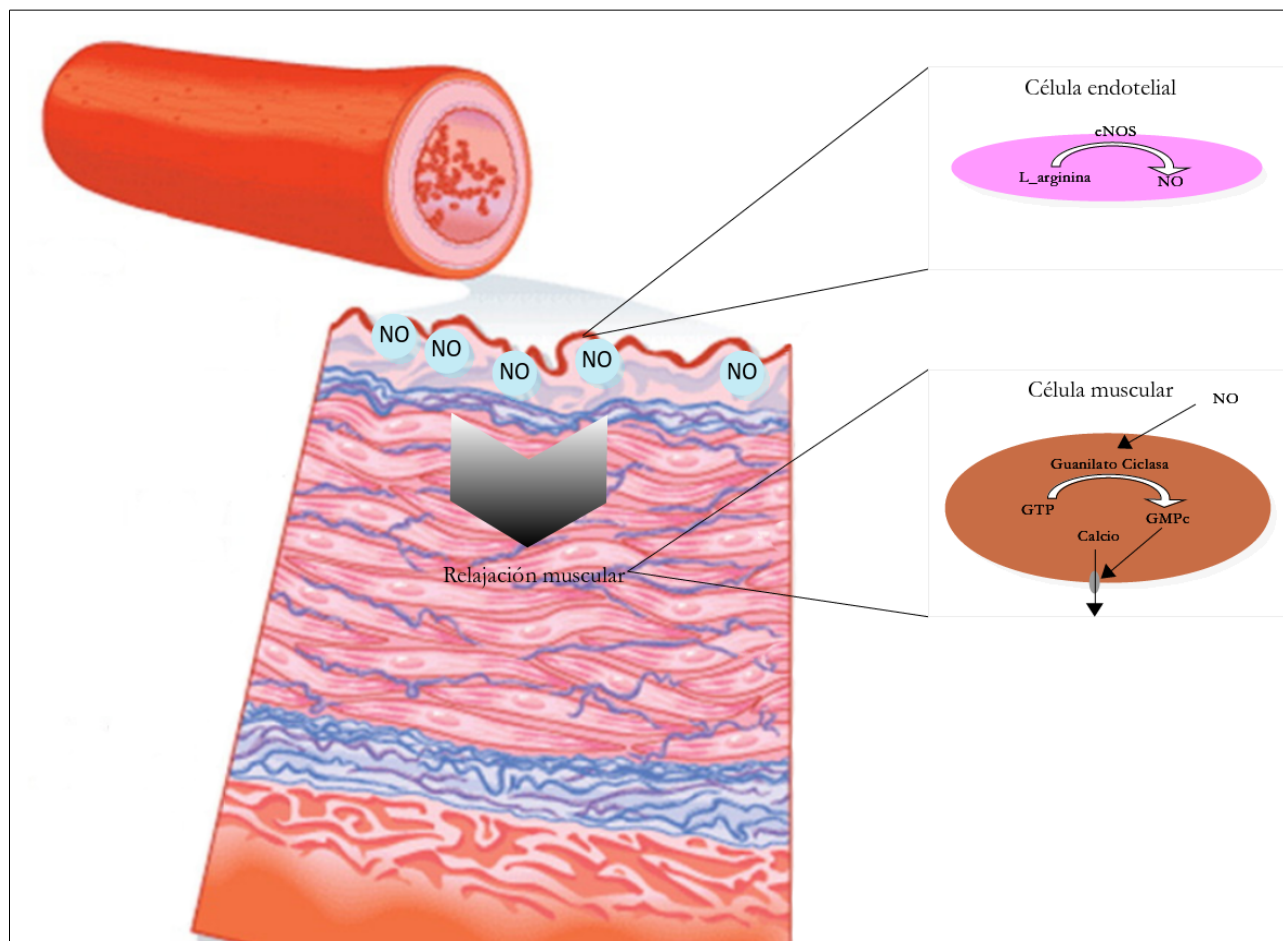


Fig. 8. Esquema simplificado del efecto del NO sobre las células musculares lisas. El NO que se forma en el endotelio difunde hacia las células musculares, donde promueve la formación de GMPc, el cual limita la biodisponibilidad de Calcio promoviendo la relajación muscular. Fuente: Fortier 2014.

La producción de NO por la NOS ocurre en una amplia variedad de tipos celulares que incluyen células epiteliales, nerviosas, endoteliales e inflamatorias. Existen tres formas de NOS, siendo dos de ellas constitutivamente activas y dependientes del calcio - la endotelial (eNOS o NOS3) y la neuronal (nNOS o NOS1) - y una inducible (iNOS o NOS2) en condiciones patológicas que es calcio independiente. En las neuronas, el NO producido por la nNOS puede funcionar como neurotransmisor, atravesando fácilmente las membranas celulares por su carácter lipófilo. Los macrófagos sintetizan NO a partir de la iNOS para ayudar en la digestión de los microorganismos que

han sido fagocitados. Cuando el NO es producido en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, vía eNOS, funciona como regulador paracrino del tono y remodelado vascular.

El propio flujo sanguíneo y su efecto sobre en endotelio producen la activación de la enzima eNOS, adaptando el diámetro de la arteria al flujo de sangre. Además de esto, la eNOS se puede activar por moléculas señalizadoras como bradiquinina, adenosina, factor de crecimiento endotelial o serotonina⁹².

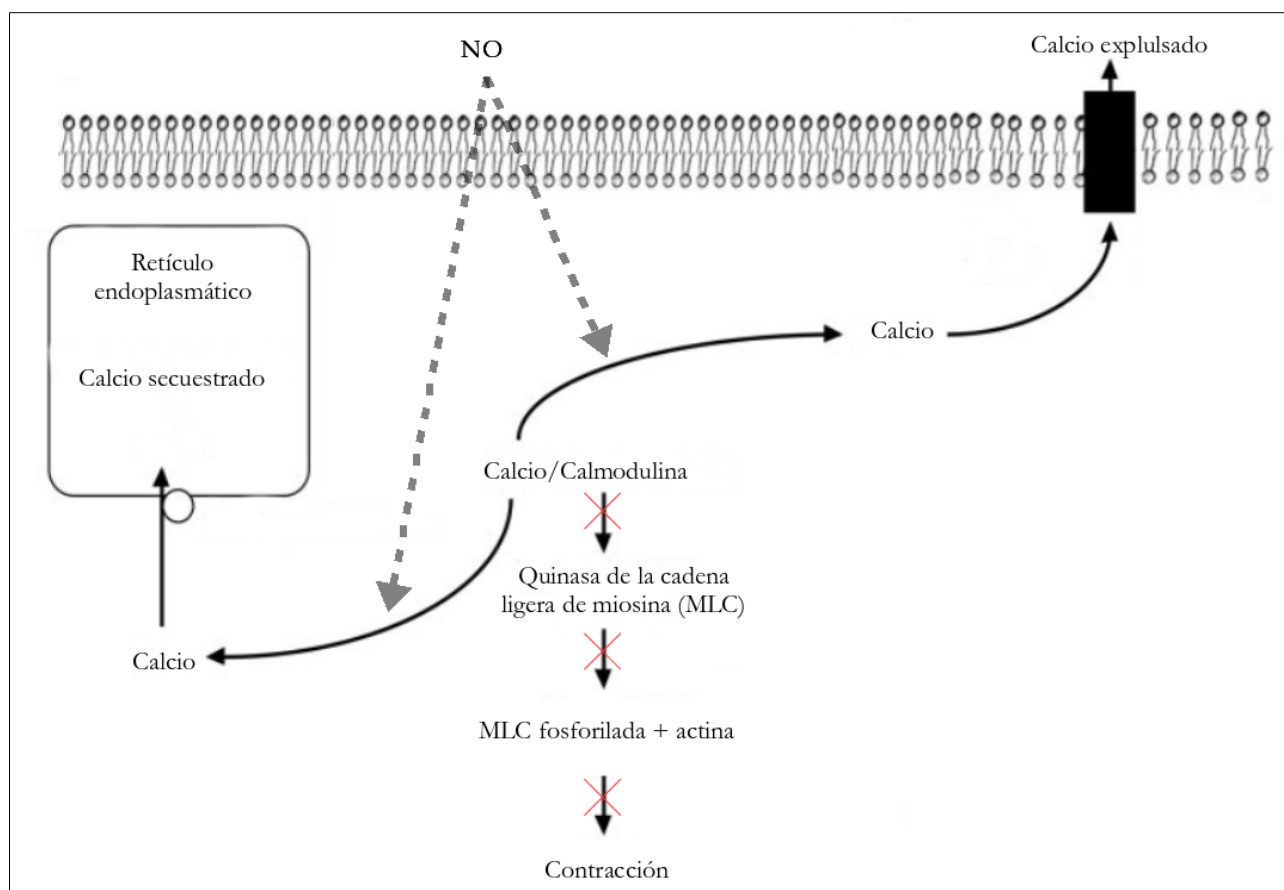


Fig. 9. Esquema simplificado del efecto del NO en la relajación de las células musculares lisas. El NO limita la biodisponibilidad de calcio para evitar la contracción y promover la relajación Fuente: Webb 2003.

El NO es un gas con una vida muy breve que difunde hacia las células musculares lisas activando en ellas la enzima guanilato ciclasa, que produce guanosín monofosfato cíclico (GMPC) el cual hace que la arteria se dilate actuando sobre la musculatura lisa⁹¹. El mecanismo de acción del cGMP soluble pasa por activar la proteína quinasa G, que fosforila una serie de proteínas que regulan la concentración de calcio y la sensibilidad de la célula al calcio. De esta manera, el NO puede disminuir la biodisponibilidad de calcio en las células del músculo liso, y disminuir su acción sobre los mecanismos de contracción. Asimismo, el NO puede inducir hiperpolarización de la célula muscular mediante la apertura de canales de potasio, que también relaja la musculartura lisa⁹³.

El NO también actúa en otros aspectos de la fisiología de la pared vascular, inhibiendo la inflamación, la proliferación celular y la trombosis. Estas funciones vienen dadas en parte por la s-nitrosilación (un proceso por el cual se convierten tioles, entre ellos residuos de cisteína de las proteínas, en s-nitrosotioles) en un amplio rango de proteínas, lo que reduce su actividad biológica⁹⁴. Algunas de las dianas moleculares de la s-nitrosilación son el factor de transcripción NF- κ B y proteínas implicadas en el progreso del ciclo celular⁹⁵. Además el NO es capaz de limitar la actividad de la fosforilación oxidativa en la mitocondria⁹⁶.

Uno de los mecanismos por los que se cree que se reduce la producción de NO durante el envejecimiento es la disminución de L-arginina en las células endoteliales, el sustrato de la eNOS. Se ha visto que se incrementa la actividad de la arginasa, una enzima que degrada la L-arginina, y se ha probado esta hipótesis mediante la inhibición de la arginasa, tras lo cual se mejora la vasodilatación por NO^{97,98}.

También se ha descrito que algunos cofactores de eNOS pueden ser importantes en el cambio de su función fisiológica habitual. La tetrahidrobiopterina (BH₄) es un cofactor necesario para la producción de NO por parte de eNOS y se ha descrito que la disminución de BH₄ produce el desacoplamiento de eNOS⁹⁹. Si no hay suficiente BH₄ para que eNOS lleve a cabo la producción de NO, la cantidad de éste se ve reducida y se generan ROS¹⁰⁰. Diversos estudios clínicos han demostrado que los pacientes con riesgos cardiovasculares (fumar, diabetes, edad avanzada...) y patologías cardiovasculares (enfermedad coronaria, aterosclerosis...) mejoran su función endotelial si cuentan con unos niveles óptimos de BH₄^{101,102}.

Estos cambios en la maquinaria de la eNOS llevan a la célula endotelial a sufrir una inhibición de la eNOS o a su desacoplamiento^{103,104}. El desacoplamiento de la eNOS supone un problema fisiopatológico, pues la eNOS desacoplada es aquella que es incapaz de catalizar la reacción de L-arginina a NO de forma óptima y en cambio acepta más electrones de los que sería habitual de la NADPH y se los transfiere a otro sustrato, el oxígeno, para así generar O₂⁻¹⁰⁵. Este incremento de las especies reactivas de oxígeno (que se tratarán a continuación), no hace sino empeorar la situación, pues el NO restante reacciona rápidamente con el O₂⁻, siendo causa de la disminución de la vasorelajación por la disminución de NO¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. La generación del radical libre peroxinitrito (ONOO⁻), por la reacción de O₂⁻ y NO, genera una retroalimentación positiva con todos estos procesos, generando aún más estrés oxidativo y desacoplando más unidades de eNOS¹⁰⁹.

Diversos estudios han hallado incrementado el nivel de peroxinitrito con la edad¹¹⁰⁻¹¹². Se ha descrito este incremento a nivel tisular en aorta¹¹³ y a nivel citosólico en proteínas mitocondriales, especialmente de la cadena de electrones¹¹⁴.

Un incremento de 10 veces de NO y de O_2^- se traduce en un incremento de la formación de peroxinitrito en 100 veces y bajo condiciones proinflamatorias la producción de ambos puede ser aún mayor, lo cual empeora estas cifras¹¹⁵.

Hay que tener en cuenta también que tanto el NO como el O_2^- son altamente reactivos y de vida corta y por tanto no pueden llegar muy lejos de su punto de origen. El peroxinitrito, por otro lado, puede moverse entre células por canales de aniones^{116, 117}. Así pues, el peroxinitrito es capaz de moverse más que las moléculas que lo originan¹¹⁸⁻¹²⁰ ya que su vida media es de unos 10 a 20 milisegundos, suficiente para atravesar la membrana celular difundiéndose en distancias de hasta dos células de la pared vascular¹¹⁷.

El peroxinitrito actúa mediante dos mecanismos diferentes. La primera se da mediante modificaciones directas de oxidación por parte del peroxinitrito o de su forma protonada, el ácido peroxinitroso ($ONOOH$)¹²⁰. La reactividad del peroxinitrito es selectiva, reaccionando con partes de proteínas concretas como tioles, residuos que contienen hierro o azufre o dedos de zinc¹²⁰. El segundo mecanismo se da mediante la descomposición del peroxinitrito en los radicales libres dióxido de nitrógeno (NO_2) e hidroxilo (OH^\cdot)^{121, 122} pero además el peroxinitrito reacciona muy rápidamente con el CO_2 formando nitrosoperoxicarbonato ($ONOOOCO_2^-$), un radical muy inestable que se descompone rápidamente en un radical de carbonato (CO_3^\cdot) y dióxido de nitrógeno. El CO_3^\cdot es altamente reactivo y lleva a cabo reacciones de oxidación citotóxicas^{117, 121-126}.

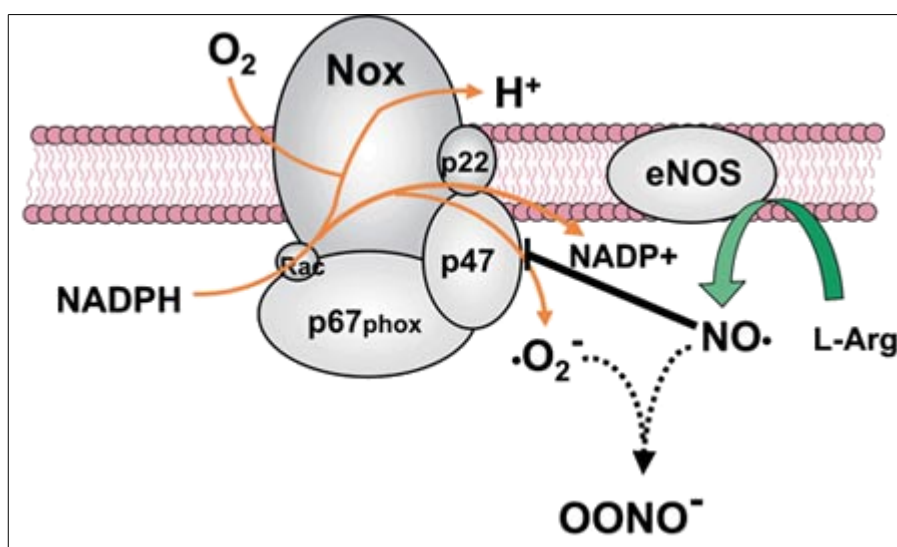


Fig. 10. Formación de peroxinitrito causada por la interacción de la eNOS y la NADPH oxidasa. El NO producido por la eNOS reacciona con el anión superóxido producido por la NADPHox generando peroxinitrito. Fuente: Dusting 2005

4.2. Especies reactivas de oxígeno:

El proceso de respiración aeróbica y la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo celular producen la energía necesaria para que funcionen las células, pero durante estos procesos, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son moléculas altamente reactivas químicamente derivadas de la fusión de oxígeno con electrones oriundos de las reacciones enzimáticas.

La teoría formulada por Denham Harman sostiene que las ROS contribuyen al envejecimiento ya que son radicales libres con una gran capacidad de reacción con moléculas de su entorno, provocando su alteración¹²⁷. Según esta teoría las ROS son capaces de dañar diversos mecanismos de la maquinaria celular, en concreto las mitocondrias. Esto a su vez causa que las mitocondrias lleven a cabo una fosforilación oxidativa ineficiente, produciendo aún más ROS y dañando más la maquinaria celular que así a su vez produce más ROS¹²⁸.

El incremento de estrés oxidativo, independiente de su fuente de generación, tiene como consecuencia diversos efectos tanto fisiológicos como patológicos. A nivel fisiológico, la señalización redox y la generación controlada de ROS es necesaria para numerosos procesos celulares, incluyendo la diferenciación celular adecuada, la regeneración de los tejidos y la respuesta inflamatoria¹²⁹. Por otro lado, un desequilibrio entre la producción y metabolización de ROS, puede activar un gran número de vías de señalización a través de la rápida interacción de estos radicales altamente reactivos con moléculas de señalización celular. A continuación se enumeran brevemente algunos de los cambios más importantes y por los cuales el incremento de estrés oxidativo regula la función vascular.

La fosfolipasa A-1 es activada por productos oxidados (H_2O_2 , LDL oxidado, etc.) en células endoteliales y en células musculares lisas de la vasculatura. Esta fosfolipasa regula genes proinflamatorios vasculares (MCP-1, ICAM-1)¹³⁰, y participa en la expresión del gen ET-1, un vasoconstrictor inducido por angiotensina II (sobre la que se tratará más adelante).

El receptor activador de la proliferación del peroxisoma (PPAR), es un factor de transcripción implicado en homeostasis energética e inflamación¹³¹⁻¹³³. Hay evidencia experimental de que PPAR α , una de las isoformas de PPAR, actúa como ligando de productos derivados de procesos oxidativos e inflamatorios como lípidos oxidados o la prostaglandina 15-dPGJ2, y actúa como factor de transcripción en respuesta al estrés oxidativo¹³⁴.

El factor de transcripción NF- κ B se activa en respuesta al estrés oxidativo y tiene un papel proinflamatorio y productor de estrés oxidativo en la disfunción endotelial¹³⁵. En células musculares, NF- κ B forma parte de los factores de transcripción que regulan la proliferación¹³⁶. En enfermedades

asociadas con la inflamación crónica, como artritis, asma o aterosclerosis, hay un aumento crónico del estrés oxidativo y activación del NF- κ B¹³⁷.

Entre las ROS mas importantes para el sistema cardiovascular se destacan el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peroxinitrito ($ONOO^-$) o el radical hidroxilo (OH^\cdot), entre otros¹³⁸. Se han descrito diversas fuentes que generan ROS en la pared vascular, incluyendo la mitocondria, la nicotinamida adenín-dinucleótido (fosfato) reducido oxidasa (NAD(P)Hox) y las ciclooxigenasas (COX).

4.2.1. Mitocondria:

A causa de la respiración en la mitocondria se generan gran cantidad de ROS. Durante el proceso de la respiración mitocondrial, hay una reducción del oxígeno molecular a agua. En este proceso, los electrones son cedidos por NADH al complejo I (NADH deshidrogenasa) y por succinato al complejo II (succinato deshidrogenasa). La coenzima Q10, un transportador de electrones liposoluble, incorpora los electrones de ambos complejos, reduciéndose a ubisemiquinona y ubiquinol, para poder transportar estos electrones al complejo III (citocromo C reductasa), que los transmite a dos moléculas de citocromo C, un transportador de electrones hidrosoluble del espacio intermembrana de la mitocondria. El citocromo C lleva estos electrones al complejo IV (citocromo C oxidasa), y los transfiere al oxígeno, produciendo moléculas de agua. Todo este proceso se lleva acabo para alimentar las bombas de protones y generar un gradiente que puede aprovechar la ATP sintasasa para formar ATP, pero no siempre es un proceso perfecto y puede producir radicales libres como el anión superóxido.

El paso entre el complejo III y la coenzima Q10 es uno de los puntos de generación de anión superóxido⁵⁸, así como el complejo I, al ceder directamente electrones al oxígeno molecular¹³⁹⁻¹⁴¹.

Se ha visto que del total de oxígeno consumido por la mitocondria, del 2 al 4% se convierte en anión superóxido, aunque se puede incrementar de forma notable en situaciones fisiológicamente anormales, o en el caso del envejecimiento y algunas patologías.

4.2.2. NAD(P)Hox:

La NAD(P)Hox es la principal fuente enzimática de anión superóxido (O_2^-) vascular¹⁴². Esta enzima cataliza la reacción de oxidación de nicotinamida adenín-dinucleótido reducido (NADH) y

nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducido (NADPH) utilizando oxígeno molecular y produciendo H_2O_2 y O_2^- . La NAD(P)Hox se ha descrito como un complejo enzimático compuesto por múltiples subunidades, siendo dos subunidades polipeptídicas que abarcan la membrana – la $p22^{phox}$ y la $gp91^{phox}$ (o sus homólogos Nox), y al menos tres subunidades citosólicas $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, y la pequeña proteína G Rac2 (o Rac1). Aunque para la activación de la NAD(P)Hox se necesita la asociación de los componentes citosólicos con los componentes asociados a la membrana, las Nox son, en general, las subunidades funcionales de esta enzima y son variables dependiendo del tejido donde se expresan¹⁴³. Los niveles de Nox1 son bajos en las células vasculares, pero se pueden ver aumentados a causa de estímulos por parte de agonistas, como factores de crecimiento derivado de plaquetas o la Ang-II. La Nox2 se expresa en el endotelio, células de la capa adventicias de la vasculatura y células musculares lisas¹⁴². La Nox3 parece no tener una función conocida en la vasculatura, ya que se ha encontrado de forma predominante en el oído interno relacionada con estructuras de equilibrio y percepción de la gravedad. La Nox4 se expresa de forma constitutiva en células endoteliales y células musculares lisas¹⁴⁴.

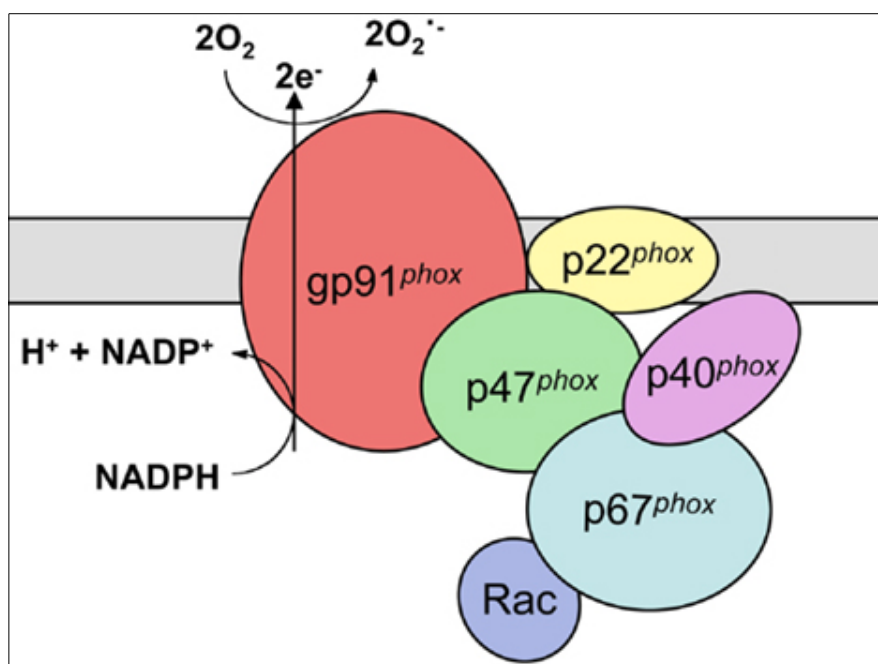


Fig. 11. Estructura de la NADPH oxidasa. Fuente: Gardiner 2013.

Aunque alguna de las Nox se encuentran de forma constitutiva en la pared del vaso – como la Nox2 y la Nox4 – estas subunidades pueden ser reguladas por múltiples factores fisiopatológicos, como cambios en la tensión o flujo sanguíneo, y por otras vías metabólicas, como la antes mencionada de la Ang-II, que es capaz de aumentar la actividad de estas enzimas, así como su expresión¹⁴⁵. Asimismo,

elementos derivados de la producción de ROS, como H₂O₂ y peróxidos lipídicos pueden generar una retroalimentación positiva en la activación de la NAD(P)Hox en la pared vascular¹⁴⁶.

4.2.3. Ciclooxygenasas:

Las prostaglandina-endoperoxido sintetasa (PGHS), o ciclooxigenasas son enzimas responsables de la formación de tromboxano (TXA₂) y prostaglandinas como la prostaciclina (PGI₂).

En la pared vascular hay dos isoformas de COX que están íntimamente ligadas a la regulación vascular. La COX-1 (o PGH1S) es considerada constitutiva y desempeña un papel importante en la síntesis de los prostanoides para propósitos fisiológicos. Esta enzima regula funciones como la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la hemodinámica renal y la función plaquetaria. En la célula, generalmente la COX-1 se encuentra en el citoplasma o cerca del retículo endoplásmico. Su estructura presenta dos dominios, el que se une a la membrana está constituido por cuatro hélices que forman un canal que permite la entrada del ácido araquidónico de la membrana al sitio de activación enzimática. En esta región hay dos lugares activos, uno que cataliza la ciclooxigenación y otro la peroxidación^{147,148}.

Por otro lado, la COX-2 (o PGH2S) se trata de una forma inducible de COX en respuesta a algunos estímulos como citoquinas proinflamatorias¹⁴⁸. La COX-2 regula la producción de prostanoides que participan en la inflamación y en otros procesos no inflamatorios, tanto fisiológicos como patológicos^{147,149}. En la célula, la COX-2 se encuentra fundamentalmente en la región perinuclear y en la membrana nuclear¹⁴⁸.

Los prostanoides producidos por las COX ejercen diversas funciones fisiopatológicas y son importantes reguladores de la homeostasis vascular. El TXA₂ participa en los procesos de coagulación y agregación plaquetaria, pero también es un potente vasoconstrictor. La PGI₂, en cambio, tienen actividad antiagregante en plaquetas y actúan como vasodilatador. En términos generales, las prostaglandinas actúan sobre la resistencia vascular cortical renal, contribuyendo a regular la presión sanguínea, pero hay diversos tipos de prostaglandina con diferentes funciones por todo el cuerpo^{150,151}:

Prostaglandina	Receptor	Función
PGI ₂	IP ₂	Vasodilatación e inhibición de la función plaquetaria
PGE ₂	EP ₁	Broncoconstricción y contracción del músculo liso intestinal
	EP ₂	Broncodilatación, vasodilatación y relajamiento del músculo liso intestinal
	EP ₃	Disminuye la secreción ácida en el estómago, incrementa la mucosa estomacal, incrementa la contracción del músculo liso en el estómago
PGF _{2α}	FP	Broncoconstricción

Tabla 1. Prostaglandinas y sus receptores. Se enumeran algunas de sus principales funciones. Elaboración propia.

La vía de las COX puede verse afectada por otras vías, por ejemplo se ha sugerido que el NO inhibe la actividad de COX¹⁵². Se ha documentado en algunas patologías como la glomeronefritis, que la producción de NO limita los niveles de COX-2¹⁵³. En otros estudios se ha descrito un efecto dual o bifásico, como en el caso de las células mesangiales que forman parte del glomérulo renal, el NO incrementa la expresión de COX-2 en células mesangiales en tiempos cortos (hasta 8 horas para el ARN mensajero y hasta 24 horas para la proteína), pero más tarde actúa como inhibidor de COX-2¹⁵⁴. Por otro lado la vía de la Ang-II, que se tratará a continuación, también puede actuar como mediador proinflamatorio incrementando la expresión de COX2¹⁵⁵.

4.3. Angiotensina II:

El principal elemento del SRA, la angiotensina II (Ang-II), se produce como sustrato del angiotensinogeno gracias a cortes precisos en su secuencia mediante la acción de la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ECA). El angiotensinógeno es una α -2-globulina constitutivamente producido y liberado en la circulación sanguínea principalmente por el hígado. Es un miembro de la familia de las serpinas, aunque no es conocido por inhibir otras enzimas, a diferencia de la mayoría de las serpinas. Los niveles de angiotensinógeno plasmático se incrementan por corticosteroides, estrógeno, hormona tiroidea, y niveles de Ang-II plasmáticos. El angiotensinógeno es también conocido como sustrato de la renina^{156,157}.

La renina rompe el enlace peptídico entre los residuos leucina y valina del angiotensinógeno, creando un péptido de diez aminoácidos, la Angiotensina I (Ang-I). La renina se produce en los riñones en respuesta a la actividad simpática renal, disminución de la presión arterial intrarenal en las células yuxtaglomerulares, o disminución de suministro de iones de sodio y cloro a la mácula densa. Si menos sodio es detectado por la mácula densa, se incrementa la liberación de renina por las células yuxtaglomerulares. La Ang-I aparenta no tener actividad biológica y existe únicamente como un precursor de la Ang-II¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

La Ang-I se convierte en Ang-II a través de la eliminación de dos residuos C-terminales por la ECA, expresada principalmente dentro del pulmón, pero también presente en las células endoteliales y las células epiteliales de riñón. La ECA tiene una alta densidad en el pulmón, pero la activación en este órgano no promueve la vasoconstricción, y la Ang-II está por debajo de los niveles fisiológicos de acción¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. La Ang-II se degrada a la angiotensina III (Ang-III) por angiotensinasas localizadas en los glóbulos rojos de la sangre y los lechos vasculares de la mayoría de los tejidos. Tiene una vida media en circulación de unos 30 segundos, mientras que en el tejido puede ser de hasta 15-30 minutos¹⁵⁹. La Ang-II actúa como una hormona endocrina, autocrina y paracrina.

La Ang-II aumenta el tono e induce la remodelación de la pared vascular mediante la estimulación de sus receptores en las células de la musculatura lisa vascular, que a su vez activa una miríada de vías de señalización que conduce a un aumento en los niveles de calcio intracelular y cambios en el metabolismo celular, finalmente causando la vasoconstricción y aumento de la proliferación de la capa muscular lisa. Debemos añadir a esto que otros componentes de la vía de la angiotensina, como la ECA actúan degradando moléculas vasodilatadoras como la bradiquinina a fragmentos inactivos¹⁵⁹. Además de los efectos hemodinámicos mencionados, la Ang-II promueve la inflamación y la actividad profibrótica¹⁶⁰. Por otro lado la Ang-II actúa en el intercambiador Na/H en los túbulos proximales del riñón para estimular la reabsorción de ion sodio y la excreción de hidrógeno que está acoplado a la reabsorción de bicarbonato. Esto da como resultado un aumento del volumen sanguíneo, presión y pH¹⁵⁸.

A nivel celular, la respuesta a Ang-II se da gracias a la expresión de dos receptores con siete dominios transmembrana asociados a proteína G, conocidos como receptor de Ang-II de tipo 1 (AT1R) y de tipo 2 (AT2R)¹⁶¹.

El AT1R se encuentra presente en riñones, sistema nervioso central y periférico, sistema cardiovascular, adipocitos, pulmones y ovarios, y actúa acoplado a proteína Gq vía fosfolipasa C. La activación de fosfolipasa C conlleva que ésta hidrolice al fosfatidil inositol difosfato (PIP₂) en el interior de la membrana celular, así se liberan dos segundos mensajeros, el inositol trifosfato (IP₃) y el

diacilglicerol (DAG). Mientras el IP_3 estimula el aumento de calcio intracelular por entrada desde el exterior mediante canales y por liberación desde el retículo sarcoplasmático, el DAG activa las quinasas para que estas a su vez fosforilen a las proteínas contráctiles de las células. La consecuencia final del incremento de Ang-II y su acción sobre el AT1R es un aumento intracelular de la concentración de calcio y una mayor contractilidad de las fibras citoesqueléticas. A nivel cardiovascular, la mayor activación del AT1R aumenta la contractilidad y la frecuencia cardíaca y aumenta el tono vascular¹⁵⁹. Ang-II estimula el crecimiento celular a través de AT1R mediante la fosforilación de tirosin quinasas, MAP quinasas, la movilización de calcio intracelular y la producción de ROS¹⁵⁸. Entre las quinasas que fosforila se encuentran algunas proproliferativas como c-Src, JAK y PI3K^{162,163}. En concreto c-Src está implicado en el incremento de la contractilidad, el tono vascular y la migración en células musculares lisas de la vasculatura^{164,165} y activa diversas dianas moleculares de importancia como MAP quinasas, PI3K o NAD(P)Hox que por su parte actúan promoviendo la supervivencia, el metabolismo energético, la reorganización del citoesqueleto y previniendo la apoptosis^{164,165}.

Por otra parte, el receptor AT2R se encuentra presente en la médula adrenal, útero, ovario, endotelio vascular y diversas áreas del cerebro. El AT2R interactúa con el receptor de AT1R modulando sus acciones, y en muchos casos, actuando como antagonista de su activación. En términos generales, la activación del AT2R por la Ang-II promueve la vasodilatación y mejora los efectos del remodelado causados por la activación del AT1R¹⁵⁸. El AT2R también ejerce una acción cardioprotectora en el caso de isquemia-reperfusión o infarto de miocardio al inhibir la fibrosis post-isquemia¹⁵⁹.

La Ang-II se encuentra asociado al envejecimiento porque promueve la senescencia celular, incluyendo cambios fisiológicos y estructurales relacionados con enfermedades vasculares exacerbando el estrés oxidativo al unirse a su receptor AT1R¹⁶⁶. Se ha demostrado que los ratones que carecen de una de las isoformas del AT1R (AT1RA) viven de forma normal y son más longevos que los ratones control¹⁶⁷. Asimismo, la carencia de este receptor hace que estos ratones desarrollen menos alteraciones estructurales en la vasculatura, sufran menos estrés oxidativo y tengan mitocondrias más funcionales durante el envejecimiento¹⁶⁷. Otros estudios muestran que aquellos ratones que no poseen receptores AT1R no desarrollan daños cerebrales vasculares asociados al envejecimiento por ROS¹⁶⁸. Por otro lado, la inhibición de la vía de la angiotensina es capaz de revertir cambios estructurales cardiovasculares en ratas hipertensivas. Se ha sugerido que esto es debido a la disminución de la expresión de la NAD(P)Hox, disminuyendo el estrés oxidativo¹⁶⁹.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento crónico con inhibidores de las ECA o con bloqueadores de los receptores de Ang-II reduce los efectos dañinos asociados al envejecimiento en la vasculatura, por ejemplo preservando las mitocondrias renales y previniendo así el daño renal¹⁷⁰.

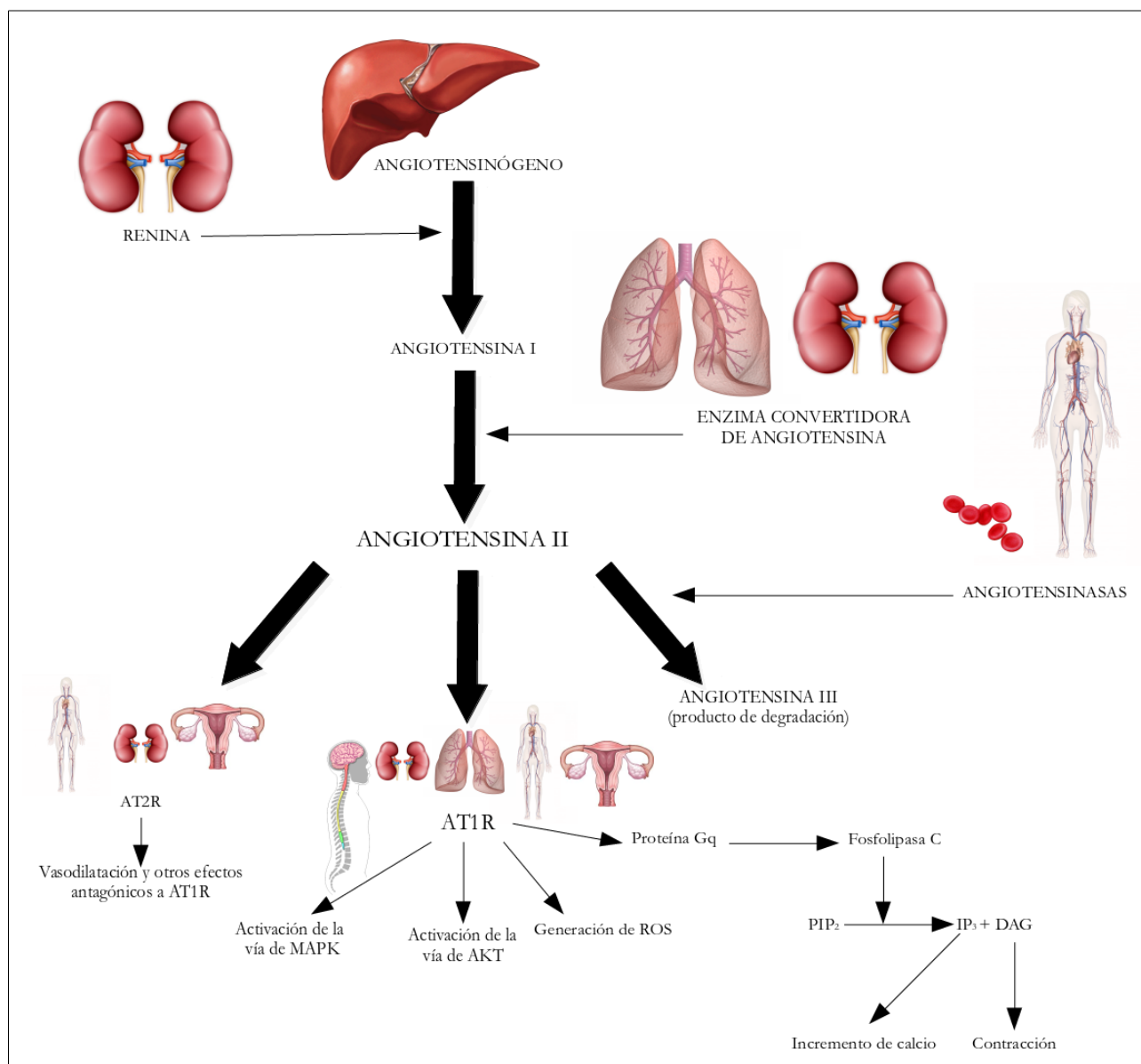


Fig. 12. Sistema Renina-Angiotensina. Elaboración propia.

5. El papel de los microARNs en los cambios estructurales en las arterias durante el envejecimiento.

5.1. Consideraciones generales:

Los microARNs (miRs), son pequeños ácidos ribonucleicos (ARN) no codificantes (no se traducen en proteínas) de entre 18 y 25 nucleótidos de longitud. Los miRs son principalmente transcritos por la ARN polimerasa en precursores (llamados pri-miR) de mayor tamaño del que tendrán los miRs maduros. Luego los pri-miRs serán procesados por la ribonucleasa de tipo III Drosha para producir pre-miRs, que serán llevados al citoplasma por exportinas. En el citoplasma la ribonucleasa de tipo III Dicer procesará los pre-miR para producir duplex de miRs, que separará la Helicasa para producir miRs maduros que se unirán al complejo RISC¹⁷¹.

Está descrito que los miRs tienen capacidad de regular la transcripción, ya que son capaces causar la degradación de ARNs concretos, o bien pueden disminuir la transcripción de un gen a su correspondiente ARN mensajero actuando en la region reguladora situada a 3' de dicho gen por complementariedad de bases¹⁷².

Se han descubierto más de 1000 ARNs en células humanas. Cada miARN tiene la capacidad de interactuar con diversos genes, y cada gen puede ser regulador por diversos miR. Siendo reguladores negativos de la transcripción, los miR participan en diferentes procesos, tanto fisiológicos como patofisiológicos, incluyendo

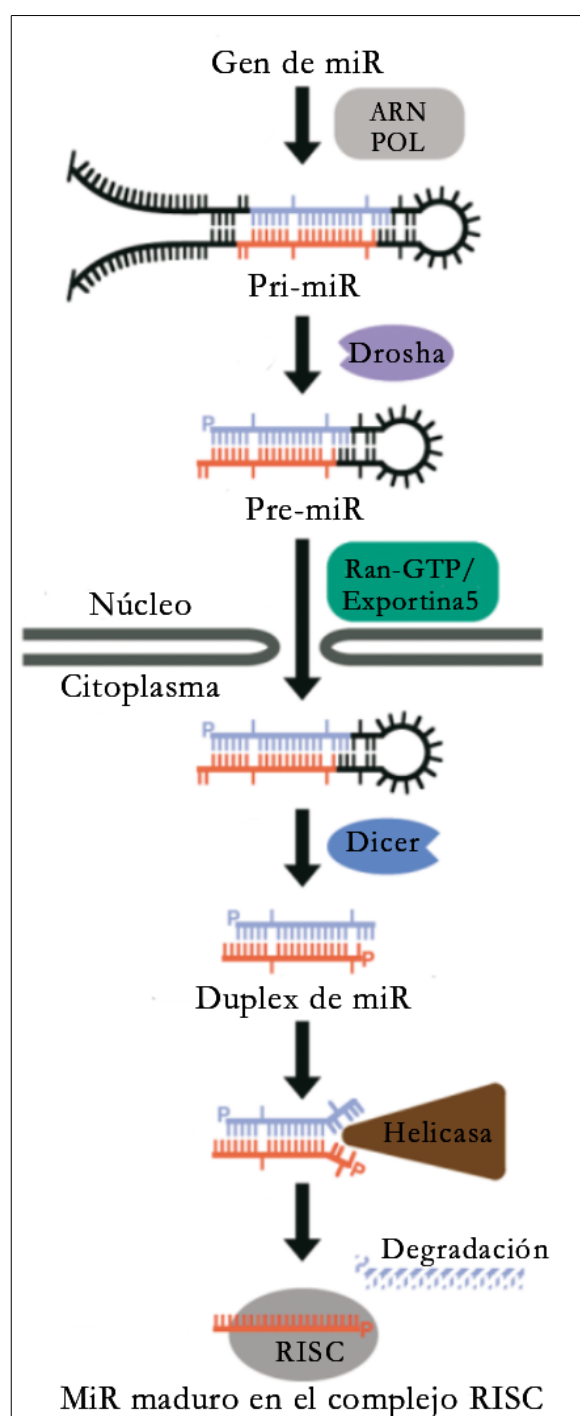


Fig. 13. Síntesis de miR. Fuente: Bartel 2004

diferenciación, proliferación, apoptosis y migración celulares, así como la homeostasis y también diversas patologías^{173,174}.

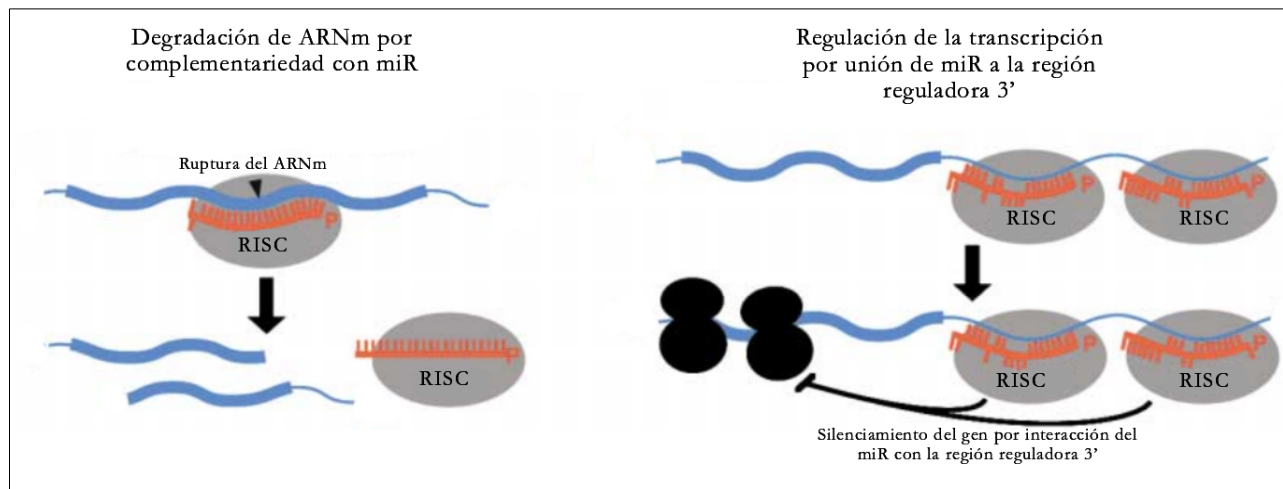


Fig. 14. Regulación de la transcripción por parte de miRs. Fuente: Bartel 2004

Dada la versatilidad en la función de los miR, es fácilmente comprensible que sean capaces de formar parte de la senescencia celular y el envejecimiento del organismo, teniendo un papel en las patologías relacionadas con el envejecimiento^{175,176}.

Se ha sugerido que el perfil de expresión de miRs se encuentra fuera de la normalidad durante la senescencia celular¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Algunas rutas metabólicas reguladas por miR, con la vía de la insulina o la ruta de AKT/mTOR entre otras, se asocian con patologías cardiovasculares^{177-179,181}. A nivel celular, la senescencia se asocia con cambios fenotípicos y funcionales en el sistema cardiovascular, promoviendo alteraciones en la vasculatura dependientes de la edad¹⁷⁴.

5.2. miRs y pared vascular:

Al ser sometido a diferentes estímulos (citoquinas proinflamatorias, estrés oxidativo, daño, etc.) la función del endotelio puede verse afectada y se sabe que el envejecimiento es un factor capaz de causar este efecto. Esto puede provocar cambios en la proliferación, migración, inflamación y senescencia de las células de la pared vascular¹⁸².

Se sabe que existen muchos miR que afectan a la pared arterial, pero solamente vamos a hacer referencia brevemente algunos que atañen a esta tesis.

5.2.1. miR-21:

miR-21 actúa en múltiples aspectos de la fisiología de la pared vascular. En endotelio miR-21 es capaz de disminuir la apoptosis regulando la fosforilación de AKT, así como regulando la actividad de PTEN¹⁸³, ambas enzimas clave en la vía AKT/mTOR. También es capaz de regular la fosforilación de eNOS y por tanto actuando sobre la producción de óxido nítrico (NO)¹⁸⁴.

También limita la transducción del ARN mensajero de la enzima PPAR α , promoviendo la inflamación al incrementar la expresión de VCAM-1 y de CCL2 al regular positivamente el factor de transcripción AP-1¹⁸⁵.

Tras una lesión realizada por un cateterismo, miR-21 es uno de los miR más abundantes en la pared vascular y puede incrementar la capacidad de migración de las células musculares lisas, así como su capacidad de proliferación. Esta función la lleva a cabo junto con TSP-1, así como inhibiendo c-Ski^{186,187}. c-Ski es una molécula que se expresa en células musculares lisas y que se ha descrito que limita la hiperplasia de la íntima tras una lesión¹⁸⁸. TSP-1 es una proteína que se encuentra en la matrix extracelular y que regula el fenotipo celular durante la síntesis de tejido y su reparación, facilitando la actividad de citoquinas, factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y proteasas¹⁸⁰. Por tanto, en células musculares lisas de origen humano, una baja expresión de miR-21 inhibe de forma significativa la proliferación y migración^{189,190}.

Por otro lado, miR-21 actúa de forma diferente en células endoteliales, pues inhibe su proliferación a través de RhoB. Lleva a cabo esta función por la vía por la que actúa la inhibición del crecimiento provocada por la rapamicina¹⁹¹.

En pacientes se ha visto que miR-21 se encuentra regulado positivamente en las placas ateroscleróticas y que ayuda a que las células musculares lisas proliferen en este entorno fisiopatológico mediante la regulación del factor de transcripción Notch2¹⁹². También se ha encontrado que miR-21 se encuentra exacerbado en pacientes con patologías en arterias periféricas¹⁹³.

5.2.2. miR-221/222:

miR-221 y miR-222 se encuentran en tándem en el cromosoma X, se encuentran muy conservados y son prácticamente homólogos de modo que se tratarán como uno mismo¹⁹⁴.

miR-221/222 se encuentra implicado en la regulación positiva de la apoptosis y la senescencia en células endoteliales mediante la inhibición de p21¹⁹⁵. Además tiene un efecto antiproliferativo e

inhibe la migración en células endoteliales. Sin embargo tiene un efecto opuesto en células musculares lisas, promoviendo la proliferación y la migración, e inhibiendo la apoptosis y la diferenciación. Se ha sugerido que esto puede deberse a un diferente patrón en la expresión de algunas de sus dianas moleculares, como lo son p27, p57 y c-kit^{152,196,197}.

Se ha observado que el tratamiento con miR-221/222 promueve la deposición de calcio¹⁹⁷ y que su transcripción se encuentra disminuida en pacientes con patologías en las arterias periféricas¹⁹³.

5.2.3. miR-143/145:

Los miR 143 y 145 van a ser tratados de forma conjunta igual ya que se encuentran muy próximos en el cromosoma 5 y se transcriben conjuntamente¹⁹⁸.

miR-143/145 promueven la diferenciación de las células musculares lisas, mientras que inhiben su proliferación y se encuentran regulados negativamente en vasos dañados o que presentan aterosclerosis.

La proteína supresora de tumores p53 promueve la maduración post-transcripcional de miR-143/145, contribuyendo al papel antiproliferativo de p53¹⁹⁹.

6. El sexo como factor de riesgo en el envejecimiento cardiovascular:

El sexo supone un factor de riesgo cardiovascular independiente durante el envejecimiento. Esto se ha descrito en la prevalencia y mortalidad de diferentes ECV, por ejemplo los hombres muestran mayor prevalencia de ECV asociadas a una vasculatura envejecida como es el caso de la cardiopatía coronaria, que es la principal causa de muerte a nivel mundial²⁰⁰⁻²⁰⁷.

Las diferencias sexuales en cuanto a la incidencia de las ECV son más evidentes a edades jóvenes y de mediana edad (25 a 50 años) que a edades más avanzadas, cuando los índices de ECV se van equiparando²⁰⁸. En personas de mediana edad (25 a 50 años) la probabilidad de padecer una ECV es de 2 a 5 veces mayor en hombres que en mujeres^{208,209}. Asimismo, la mortalidad por ECV es 5 veces mayor en hombres que en mujeres²⁰⁸. Si se excluyen de estas estadísticas otros factores de riesgo, como el tabaquismo, la diabetes, la obesidad, la hipertensión o el colesterol, se puede sugerir que el sexo es un factor de riesgo independiente para las ECV al menos hasta alcanzar edades avanzadas (85 o más

años)²⁰⁸. En el caso de la mortalidad, el sexo del individuo supone un 60% de las diferencias entre hombres y mujeres antes mencionada²⁰⁸. Esto es así en las personas jóvenes y de mediana edad (25 a 50 años), pero va cambiando a medida que envejecemos, puesto que de los 50 a los 60 años el sexo es un factor de riesgo independiente que justifica por si mismo un 47% de las diferencias en prevalencia y un 46% en mortalidad debido a ECV observadas una vez eliminados el resto de factores de riesgo. Estas diferencias asociadas al sexo disminuyen a un 35% y un 39%, respectivamente, en personas de más de 60 años de edad, y llegan a invertirse a edades muy avanzadas (más de 85 años), aunque esta inversión en la tendencia no llega a ser significativa en ningún caso^{208,210}.

Sin embargo, a pesar de la evidencias epidemiológicas, hay una preocupante falta de información respecto a los mecanismos que producen las diferencias sexuales en el inicio y progresión de las ECV. La recogida sistemática de datos acerca de problemas cardiovasculares en mujeres se ha llevado a cabo de forma importante solamente en las últimas 2 o 3 décadas²¹¹, y los estudios de investigación básica sobre este tema aún son limitados y controvertidos. Es necesario recabar información acerca de como el sexo puede suponer en si mismo un factor de riesgo cardiovascular, para así mejorar el tratamiento de los pacientes, así como para poder llevar a cabo terapias preventivas y una correcta educación en la prevención de enfermedades asociadas al envejecimiento vascular.

HIPÓTESIS

“I love fools’ experiments. I am always making them.”

Charles Darwin

HIPÓTESIS

Esta tesis tiene como hipótesis que el sexo es un factor importante en la regulación de los mecanismos patofisiológicos que se dan durante el envejecimiento vascular y por tanto también en los cambios funcionales y morfológicos que les acompañan. Por ello hembras y machos no siguen el mismo ritmo ni padecen los mismos cambios a lo largo del envejecimiento vascular.

OBJETIVOS

*“The true worth of an experimenter consists in his pursuing not only what he seeks in his experiment,
but also what he did not seek”*

Claude Bernard

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es determinar los mecanismos responsables de las alteraciones del fenotipo en aquellas células vasculares que puedan contribuir a la disfunción y remodelado vasculares en fases tempranas del envejecimiento, cuando las consecuencias de estas alteraciones aún no representan entidades clínicas pero sí que son sus potenciales precursoras. Para cumplir con estos objetivos hemos separado esta tesis en tres grandes tareas distintas:

1) Determinar los mecanismos responsables de los cambios de fenotipo de las células musculares lisas vasculares que contribuyen al remodelado vascular en un modelo animal de senescencia acelerada.

2) Determinar las diferencias asociadas al sexo en la progresión de la disfunción vascular durante el envejecimiento, así como los mecanismos involucrados, con especial énfasis en el papel de la Ang-II.

3) Determinar las diferencias asociadas al sexo en la progresión del remodelado arterial durante el envejecimiento, así como sus mecanismos asociados.

MATERIALES Y MÉTODOS

“The true method of knowledge is experiment”

William Blake

1. Modelos murinos de envejecimiento:

Con el objetivo de determinar los mecanismos de senescencia vascular y las diferencias asociadas con el sexo en la progresión del envejecimiento vascular, se utilizaron dos modelos diferentes de ratones.

1.1. Modelo de Senescencia acelerada:

Se estudiaron ratones hembras propensos a la senescencia acelerada (SAMP8, senescent-accelerated mice prone) a los 7-8 meses de edad y fueron comparados a los ratones hembras sin propensión a la senescencia acelerada (SAMR1, senescent-accelerated mice resistant). Esta edad fue elegida en base a estudios preliminares de nuestro grupo de investigación que determinaron el inicio de la senescencia vascular en SAMP8, pero no en SAMR1²¹².

1.2. Modelo de Senescencia cronológica:

Se estudiaron ratones machos y hembras de la cepa no consanguínea CD1 a 3 edades diferentes (3 meses, 7 meses y 12 meses) con el fin de determinar el curso de tiempo del inicio de la senescencia vascular. Con el fin de determinar el papel del sistema renina angiotensina en el envejecimiento vascular, se trató un grupo de ratones CD1 (macho y hembras) con el antagonista AT1R, Losartan (Sigma-Aldrich). El Losartan fue administrado en el agua de beber (dosis: 0,6 mg/L) desde los 3 meses de edad hasta los 12 meses de edad. Este tratamiento se basa en estudios previos^{213,214}.

Los ratones SAMR/SAMP fueron obtenidos de la cría en el Parque Científico de Barcelona y los ratones CD1 fueron obtenidos de los laboratorios Harlan y Charles River. Todos los animales fueron mantenidos en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona de acuerdo con las guías institucionales (temperatura constante de 22°C, ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, 60% de humedad). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de ética de la Universitat de Barcelona (Comitè Ètic d'Experimentació Animal – CEEA protocols: 134/12 y 583/14) y llevados a cabo siguiendo la normativa establecida por la legislación española y por el *US National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Publicación NIH 85-23, 1996). Se permitió a los ratones envejecer naturalmente hasta la edad en que fueron estudiados, y que tuviesen a su disposición agua y pienso estándar para ratones (Teklad Global Diet 2018) ad libitum hasta su sacrificio.

En el día del sacrificio, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg intraperitoneal) y la aorta torácica fue aislada y preparada de acuerdo con el protocolo experimental pertinente en cada caso (que se encuentran descritos en cada procedimiento). Asimismo, se recolectaron muestras de sangre por punción cardíaca. Se centrifugó la sangre a 2500 g durante 15 minutos para obtener el suero que fue almacenado a -80°C para su conservación hasta su uso.

2. Estudio de los mecanismos asociados al remodelado vascular durante el envejecimiento:

2.1. Determinación de marcadores de la senescencia en células vasculares:

- Incremento de la expresión de p53: se determinó mediante *Western blot* convencional. Para este protocolo, una cantidad igual de proteína de cada muestra (25 µg) se cargó en geles de acrilamida de concentración progresivamente creciente (del 4% al 12%) y se separó por SDS-PAGE, y luego se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa en el sistema de transferencia en seco iBlot (Invitrogen, Thermo Fisher). Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en PBS con 0,1% (v/v) de Tween 20 y 5% (p/v) de leche desnatada en polvo. Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de ratón contra p53 (Santa Cruz, sc-393031) diluido 1:1000. Tras 3-5 lavados con PBS con 0,1% (v/v) de Tween, se incubaron las membranas por 1h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario específico contra IgG de ratón (procedente de cabra) conjugado a peroxidasa de rábano en PBS con 0,1% (v/v) de Tween 20 y 1% (p/v). Después de 3-5 lavados adicionales con PBS con 0,1% (v/v) de Tween se incubaron las membranas con un sustrato quimioluminiscente (Super Signal, Pierce, Thermo Fisher) de acuerdo con los protocolos del fabricante. La señal quimioluminiscente fue medida mediante el sistema de imagen LAS4000 (GE Healthcare). El análisis densitométrico de los Western blot se llevó a cabo mediante el software ImageJ (NIH.gov).

Al final del primer Western blot, todas las membranas fueron sometidas a un “striping” para eliminar el anticuerpo previamente utilizado y fueron sometidas a nueva incubación, utilizando anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH en una dilución 1:2500 (Santa Cruz – sc-365062) como control de carga. Los datos del análisis densitométrico se normalizaron por los valores obtenidos en la densitometría del GAPDH.

- Determinación de la actividad β-Galactosidasa: se fijaron aortas torácicas intactas, así como células musculares lisas procedentes de aortas torácicas de ratones SAMP8 y SAMR1, mediante un tampón de fijación (2% paraformaldehído, 2% glutaraldehído, 70.4 mM Na₂HPO₄, 14.7 mM KH₂PO₄, 1.37 M

NaCl, y 26.8 mM KCl). Una vez fijadas, se realizaron lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se sometieron a una tinción con solución de X-gal durante la noche a una temperatura constante de 37°C, utilizando un kit comercial (Senescence Cells Histochemical Staining Kit #CS0030, Sigma-Aldrich). Tras lavados repetidos con PBS, se fotografiaron las aortas mediante cámara digital (Panasonic Lumix DCM SZ10) y las células utilizando una cámara digital acoplada a un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti).

2.2. Análisis morfométrico de las arterias elásticas (aorta) y musculares (femoral):

- Medición del grosor de la pared arterial (tinción de hematoxilina-eosina): se congelaron aortas torácicas en OCT freezing medium (VWR, Radnor, Pensilvania) y se obtuvieron secciones de 10 μ M utilizando un criostato (Leica, Alemania). Las secciones fueron fijadas en formaldehído al 3,7% durante 2 horas y luego se hidrataron brevemente en agua destilada, tras lo cual se incubaron en hematoxilina de Gill (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) durante 10 minutos. Las muestras se lavaron brevemente en agua corriente hasta conseguir la diferenciación de la tinción, tras lo cual se sumergieron en ácido acético al 1% y se volvieron a lavar con agua seguida etanol de 96°. Tras los lavados las secciones de aorta se incubaron en Eosina (Merk, Darmstadt, Alemania) durante 4 minutos para posteriormente deshidratarlas mediante la inmersión en etanol absoluto y xilol. Finalmente las muestras se montaron utilizando DPX (VWR, Radnor, Pensilvania) y se obtuvieron microfotografías. Se midió el grosor de las arterias mediante Mac Biophotonic Image J Software. La medición del perímetro del vaso, así como de la luz del vaso fueron tomadas como circunferencias. El diámetro del perímetro (D_o) y de la luz (D_i) se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Diámetro} = \frac{\text{Perímetro de la circunferencia}}{\pi}$$

Este cálculo asume que la arteria tiene una sección transversal circular *in vivo*. Entre 6 y 8 secciones fueron medidas en cada caso para obtener un promedio.

El grosor de la pared fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Grosor de la pared arterial} = D_o - D_i$$

Asimismo, la sección transversal fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Área de la sección transversal} = \left(\frac{\pi}{4}\right) \times (D_o^2 - D_i^2)$$

2.3. Análisis del contenido de colágeno y elastina en aorta:

- Medición del contenido de colágeno en la pared arterial (tinción de rojo picrosirio): se congelaron aortas torácicas en OCT freezing medium (VWR, Radnor, Pensilvania) y se obtuvieron secciones de 10 μM utilizando un criostato (Leica, Alemania). Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se fijaron en formaldehído al 3,7% durante 2 horas. Tras esto se hidrataron brevemente en agua destilada, tras lo cual se incubaron en ácido fosfomolibdico durante 2 minutos (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). Luego se lavaron brevemente en agua deionizada y se incubaron en oscuridad total en rojo picrosirio (12 g de ácido pícrico, 400 mL de agua destilada 0,4 g de Direct Red 80, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). Tras un segundo lavado en agua desionizada, se sumergieron las secciones en ácido clorhídrico 0,01 N durante 2 minutos y luego en etanol de 75° durante 45 segundos. Las muestras se deshidrataron mediante la inmersión en etanol absoluto y xilol. Finalmente, las muestras se montaron utilizando DPX VWR, Radnor, Pensilvania) y se obtuvieron microfotografías sin filtro, así como microfotografías utilizando un filtro polarizador de la luz. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando Mac Biophotonic Image J Software. Para medir la cantidad total de colágeno se calculó el porcentaje de área teñida en las microfotografías bajo un umbral específico y tomadas bajo luz sin filtro. Para medir los diferentes tipos de colágeno se utilizaron las microfotografías tomadas utilizando el filtro polarizador²¹⁵. Las fibras de colágeno teñidas con rojo picrosirio muestran un color diferente bajo luz polarizada dependiendo de su grosor. El color varía de verde (fibras de nueva formación, más finas) a rojo (fibras maduras, más gruesas)²¹⁶. La proporción de los dos tipos de fibras de colágeno determina la cantidad de cada color, y separando la imagen por canales para cada uno de sus colores (una función que incorpora Mac Biophotonic Image J Software de forma automática), se puede calcular la cantidad de fibras de cada tipo mediante la medición del área teñida.

- Análisis del estado de las fibras de elastina (tinción tricrómica): se congelaron aortas torácicas en OCT freezing medium (VWR, Radnor, Pensilvania) y se obtuvieron secciones de 10 μM utilizando un criostato (Leica, Alemania). Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se fijaron en formaldehído al 3,7% durante 2 horas. Tras esto se hidrataron brevemente en agua destilada, tras lo cual se tiñeron mediante colorante de fibras elásticas (solución de 1 g. de cristales de hematoxilina disueltos

en 50 mL de etanol absoluto, a la que se añadieron 25 mL de cloruro férrico al 10% y 25 mL de solución de Lugol) durante 30 minutos. Tras lavar en agua desionizada se diferenciaron las muestras mediante la utilización de cloruro férrico al 2%, seguido de nuevo por un lavado en agua desionizada.

Se trataron las muestras con tiosulfato al 5% y se lavaron con agua desionizada, etanol de 96° y agua desionizada de nuevo, para ser teñidas con colorante de Van Gieson durante 6 minutos. Tras la tinción, se diferenciaron las muestras en etanol de 96° y se lavaron con agua desionizada. Después se incubaron las muestras en mordiente (ácido fosfomolibdico al 5% en agua destilada) durante 15 minutos para poder llevar a cabo la tinción con verde luz. Tras esto, se incubaron las muestras con verde luz (2 g. de verde luz, C.I. 42095 + 2 mL de ácido acético en agua destilada hasta 100 mL) durante 10 minutos. Luego las muestras se lavaron con agua desionizada y ácido acético al 0,5%, para posteriormente ser deshidratadas y montadas mediante DPX (VWR, Radnor, Pensilvania). Se tomaron microfotografías y se evaluó el estado de las fibras de elastina.

2.4. Análisis del crecimiento de las células musculares lisas de aorta:

- Aislamiento y cultivo primario de células musculares lisas de aorta: inmediatamente tras el sacrificio, las aortas se limpiaron del tejido circundante en medio fisiológico de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco) bajo lupa binocular y se mantuvieron en hielo en medio Leibovtz (Gibco, Thermo Fisher) hasta el aislamiento. Una vez limpias, las aortas se incubaron durante 30 minutos a 37°C en una solución de colagenasa (Collagenase type II, Sigma Aldrich) diluida en HBSS (2mg/mL). Tras la digestión con colagenasa, se cortaron las aortas en 3-4 anillos de una longitud similar y todos los anillos de una misma aorta fueron situados en un mismo pocillo de una placa de 6 pocillos (Multiplacas Nunc tratadas para cultivo celular, Thermo Fisher). Estas placas fueron previamente recubiertas con gelatina (2% Gelatin Solution, Sigma) diluida en agua desionizada estéril 1:10 v/v. En cada pocillo se añadió 1 mL de medio para células musculares lisas y las placas fueron situadas en una incubadora en condiciones constantes de temperatura a 37°C y 5% de CO₂. 24 horas después se añadió 1 mL de medio para células musculares lisas. A los 3-5 días se eliminaron los anillos de aorta cuando se hubieron obtenido suficientes células fijadas al fondo del pocillo y se permitió a las células crecer hasta el apareamiento de colonias de células musculares lisas en la incubadora.

El medio utilizado para el cultivo de las células musculares lisas fue DMEM/F12 sin rojo fenol (GIBCO) suplementado con suero bovino fetal (GIBCO) al 10% de concentración final, Penicilina/Estreptomina (GIBCO) a una concentración final de 50 unidades/mL de Penicilina y de 50 µg/mL de Estreptomina, y suplemento vascular SMGS (GIBCO) para proporcionar al medio de

cultivo una concentración final de 2 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos, 0,5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico, 5 ng/mL de Heparina, 0,2 µg/mL de albúmina sérica bovina y 2 µg/mL de factor de crecimiento recombinante de tipo insulina. Las células se utilizaron en segundo o tercer pasaje para realizar los experimentos *in vitro* a menos que se mencione lo contrario.

- Ensayo de crecimiento celular: cuando las células musculares en el primer paso alcanzaron el 100% de confluencia, se añadió Tripsina (Trypsin-EDTA 0,25%; Gibco) durante 1 o 2 minutos para separar las células de las placas. Tras la separación de todas las células, se añadía 1 mL de medio de cultivo y se centrifugaban las células a 200 g durante 10 minutos. Se plantaron cantidades iguales de células musculares lisas (2.5×10^4 células/cm²) en placas de 6 pocillos y se mantuvieron con medio de cultivo de células musculares lisas en condiciones estándar. Después de 7 días de incubación se determinó el número de células con un hemocitómetro automatizado (Countess® Automated Cell Counter, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). El crecimiento celular se expresó como la relación entre células contadas a los 7 días de cultivo y las células sembradas.

- Ensayo de curación de herida: se plantaron células musculares lisas en placas de 6 pocillos y se permitió que proliferasen hasta llegar al 100% de confluencia. Tras comprobar el correcto estado de las células, se llevó a cabo una herida a lo largo de cada pocillo, siempre del mismo tamaño y grosor, y se llevó a cabo un lavado con HBSS para eliminar las células que pudieran quedar en suspensión al realizar la herida, así como cualquier otro detrito que pudiera estar presente en el medio de cultivo. Se fotografiaron 3 campos a lo largo de la herida en cada pocillo mediante microscopio invertido y se marcaron estas zonas en la placa para obtener microfotografías en el mismo sitio posteriormente. Se llevaron a cabo microfotografías a las 3, 6, 12 y 24 horas, cuando finalizó el experimento, dado que había condiciones experimentales en que a las 24 horas se había cerrado la herida. Para medir la proliferación, se midió el área de la herida a cada tiempo para un mismo campo, utilizando Mac Biophotonic Image J Software y se calculó el porcentaje de área de la herida que se había cerrado en cada caso, para poder obtener una curva de crecimiento de las células.

- Ensayo de proliferación basado en impedancia: para realizar este experimento, se plantaron células musculares lisas de aorta en una concentración de 5×10^3 células en 200 µL de medio para células musculares lisas en un pocillo de una placa de 96 pocillos *RTCA resistor plate* (RTCA System, Roche Diagnostics). Los cambios en la impedancia se midieron de forma continua durante 48 horas mediante el aparato XCelligence *Real-Time Cell Analysis* (RTCA) System (Roche Diagnostics), de forma que se

pudo monitorizar la proliferación de las células. Para determinar que vías metabólicas pueden estar implicadas en los cambios en el fenotipo proliferativo de las células senescentes, se inhibieron rutas metabólicas mediante el tratamiento con Wortmanina (inhibidor de la vía de AKT) en una concentración de 100 nM en medio de cultivo o con PD98509 (inhibidor de la vía de las MAPK) en una concentración de 1 μ M en medio de cultivo.

Los resultados fueron validados mediante otro experimento en el que se utilizó un hemocitómetro o cámara de Neubauer para cuantificar el número de células. En esta validación se plantaron 3×10^5 células musculares lisas en un pocillo de una placa de 6 pocillos y se dejaron crecer durante 5 días, tras lo cual fueron tripsinizadas y contadas mediante el hemocitómetro, de forma que se pudo establecer una relación entre el número de células plantadas y de células contadas al final del experimento.

2.5. Cambios en la expresión de ARN mensajero de células musculares lisas de aorta de SAMP8:

- Extracción de ARN mensajero: se congelaron las aortas torácicas utilizando hielo seco y se homogenizaron mecánicamente en presencia de trizol (1ml/100 mg de tejido) en politron. Tras la incubación por 5 minutos a temperatura ambiente, se mezclaron los homogenados con 200 μ l de cloroformo (Sigma-Aldrich) y se incubaron por un tiempo adicional de 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 4 minutos a 4 °C para separar las fases acuosa (que contiene RNA) de la interfase (con DNA) y la fase orgánica (con proteínas). Se recolectó la fase acuosa y se precipitó el ARN mediante la adición de 500 μ l de isopropanol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) por cada mililitro de trizol inicial añadido. Se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 8 minutos a 4 °C para obtener un pellet de ARN precipitado. El sobrenadante se descartó y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol de 75° para la remoción de trazos de fenol presente en el trizol. Tras un nuevo centrifugado a 7500 g durante 5 minutos a 4 °C, se descartó el etanol y después del secado durante 5 minutos a temperatura ambiente y se solubilizó el pellet de ARN en agua libre de RNAsa y DNAsa. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR): la expresión de ARN mensajero de los diferentes genes de interés se llevó a cabo mediante qRT-PCR utilizando Sybr green tal como está descrito previamente^{217,218}. El RNA total obtenido de las muestras se sometió a una

transcripción inversa utilizando un kit de transcripción inversa según las instrucciones de proveedor (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems*) para obtener el cDNA. Las reacciones de qRT-PCR y los análisis fueron realizados como está descrito previamente²¹⁷. Brevemente, la reacción de qRT-PCR se llevó a cabo utilizando los siguientes parámetros: 2 minutos a 50 °C seguidos de 10 minutos a 95 °C tras lo cual se llevaron a cabo 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minutos a 60 °C en un sistema de PCR ViiA7 (Applied Biosystems). Se utilizaron como controles α -actina y la subunidad ribosomal 18S (Inventory 4310875, Applied Biosystems).

Los primers utilizados en los artículos que componen esta tesis se encuentran detallados en la siguiente tabla:

Vía metabólica	Gen	Secuencia del primer 5'→3'
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	ACE	F: CCGGCTGCTTGCCCTGTCTCC
		R: GGAGCCACCTCACCTGGGCT
	AT1	F: GCGGAGTAGCAACGTCCCCCT
		R: AGCGACCCGTGGACCAGGAC
	AT2	F: GCGGATGGAGGGAGCTCGGAA
		R: GCGGACTCATTTGGTGCCAGTT
ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	COX1	F: GAGCCGTGAGATGGGTGGGAGGG
		R: TGGATGTGCAATGCCAACGGCT
	COX2	F: GTCAGGACTCTGCTCACGAAGGAAC
		R: ACAGCTCGGAAGAGCATCGCAG
	PGIS2	F: CGGCTACCTGACCCTATATGGA
		R: ACACGATCTTGGGCCTGACT
	TXA2S	F: AAAGGAACCACCCCAAAGGT
		R: GCCTGGCCCAATTTCAAT
PI3K/AKT	AKT1	F: TAGGCCAGTCGCCC
		R: TCGTTCATGGTATCCGTGGC
	AKT2	F: TGGCTGGAAAAGGCGGTATT
		R: GCTCGTCCCGCTCCTTATT
	AKT3	F: GGTGCAGAGTCCCCTAGAGA
		R: TTGGCGACAGCAGGATCATT
	AKT1S1	F: TGTAGACGAGCTTCACTGCG
		R: GACCCCAAGCACACACAG
	PTEN	F: CGGCAGGATACGCGCT
		R: AGCGGCTCAACTCTCAAAC
	PI3K	F: CCTTAAATGGTGAGCACGGAGA
		R: CATCACACACCCAGCCAAT
PP2A	F: CCTCACGTTGGTGTCCAGAG	
	R: TACGAGGTGCTGGGTCAAAC	
PDK1	F: AGGAGGACGCTGAGGAGG	
	R: AATGGGCACAGCGTCATACA	

MATERIALES Y MÉTODOS

Vía metabólica	Gen	Secuencia del primer 5'→3'
mTOR	RPTOR	F: CTGCCCTTGCCAGATGAGAAT
		R: GCATGTCTTCACITCCACCCA
	Notch1	F: TGTGGCTTCCTTCTACTGCG
		R: CTTTGCCGTTGACAGGGTTG
	mTOR	F: ATCCGCTACTGTGTCTTGGC
		R: TCGCGGATCTCAAAGACCTG
TNF α	TNFRSR1F1A	F: GCTGTTGCCCTGGTTATCT
		R: ATGGAGTAGACTTCGGGCCT
	TNFRSR1F1B	F: CAGGACCCCTGGCGTTACAT
		R: TTGGCAAGGTGGTTGTCAGT
NFK β	NFK β	F: AGGAAGGCAAAGCGAATCCA
		R: TCAGAACCAAGAAGGACGCC
	IK $\beta\alpha$	F: TTCTGCCCGCTCTCTGTAG
		R: TCGTAGGCTCCAGGACAGTA
MAPK	HRAS	F: GGAAACTGAACCCACCCGAT
		R: TGTCTGAGCCTGGTGTCA
	ERK1	F: CAACCCAAACAAGCGCATCA
		R: TGTCTGAAGGTGAATGGCTCC
	ERK2	F: GCTGAAGCGCCATCAAGTT
		R: ACTTACACCATCTCTCCCTTGC
	MEK	F: GAACACCGAGCTCAACTCCA
		R: TCGCTAAAGCCTCCTCCTCT
REGULACIÓN DE LA LONGEVIDAD	P53	F: GTGCTCACCTGGCTAAAGT
		R: AGGAGGATGAGGGCCTGAAT
	SIRT1	F: TGACCGATGGACTCCTCACT
		R: GCGTGTGACGTTCTGTATC
	SIRT2	F: GGACAGAGCAGTCGGTGAC
		R: GTCTGAATCCTGAGCCTCCTG
	SIRT3	F: CGCTAAACTTCTCCCGGTT
		R: ACACAGAGGGATATGGGCCT
	SIRT4	F: AGCATTCTFACTAGGGATCCATCT
		R: ACGTGTGAACGGCTAAACAGT
	SIRT5	F: GCCACCGACAGATTCAGGTT
		R: CCACAGGGCGGTTAAGAAGT
SIRT6	F: GCCCAACAGCCCTATACTCC	
	R: GTGGTTCCITCAAGTCCCT	
AMPK	AMPK α	F: TTCGGGAAAGTGAAGGTGGG
		R: TGATGTGAGGGTGCCTGAAC
	AMPK β	F: CCTTCCGGCTTCTTGTGT
		R: AAGATGTCGGCTTTCAGG
	AMPK γ	F: CGCTAGCAATGGAGTCGGTT
		R: TGTTTGATCCGGGGTCTCTT
ÓXIDO NÍTRICO	eNOS	F: TGCTACTATGGCAACCAGCGT
		R: GCGCAATGTGAGTCCGAAAA

MATERIALES Y MÉTODOS

Vía metabólica	Gen	Secuencia del primer 5'→3'
APOPTOSIS	Caspasa3	F: GAGCTTGGGAACGGTACGCTA
		R: GAGTCCACTGACTTGCTCCC
	Caspasa9	F: AAAGTGGCTCCTGGTACATCG
		R: CATTGGCAACCCTGAGAAGGA
	BAD	F: CAGCGTACGCACACCTATCC
		R: GCCATTTGCGGGAGCTCCTTT
FUNCIÓN MITOCONDRIAL	MRPL43	F: TGGCCGAATACCTTAATGGGG
		R: AGCTTCTGCACCAACGACTT
	NDUFB11	F: AAATAGAGTCCGCACCTCGC
		R: TTTTGTGCTCGCTCCGCCCTTA
	POLRMNT	F: CTCCGTGTCCAGCATCAAGT
		R: TCGAAGGTACCTGTCTTTGGC
	Tfb1m	F: GGAAGCAAACAGCACAGTCG
		R: GCTGCTTGATCTTGGGCTCT
	Tfb2m	F: GCATGTAAGAAAGCGGCCAG
		R: CCACTCTGGCACCAGCTTTA
	TFAM	F: TAGGCACCGTATTGCGTGAG
		R: GTGCTTTTAGCACGCTCCAC
INFLAMACIÓN	IL-1β	F: GTGCAAGTGTCTGAAGCAGC
		R: TCCACAGCCACAATGAGTGAT
	IL-18	F: CTTCCTGTACAACCGCAGTAAT
		R: GAGAGGGTCACAGCCAGTC
	IL-18BP	F: CCCAGCTCTGGGATGGATTG
		R: GGTC AAGGTCATGCTGTGGT
	VCAM	F: GTCCGTTCTGACCATGGAGC
		R: CCAGGGGGCCACTGAATTG

Tabla 2. Primers.

2.6. Cambios en la expresión de microARN:

El ARN total enriquecido en microARN (miR), se obtuvo mediante el kit de mirVana miR *Isolation Kit* (Ambion, ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del proveedor. Tanto el ARN total como el microARN fueron cuantificados mediante detección por fluorescencia utilizando Qubit Fluorometer (Invitrogen, ThermoFisher). La integridad de ARN se comprobó con Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) y solamente aquellas muestras que obtuvieron un valor de integridad de ARN por encima de 8 fueron aceptadas para su uso en array, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La expresión de 750 miR candidatos se midió mediante el array *TaqMan Array Rodent MicroRA A+B Cards v3.0* (Applied Biosystems). El sistema de detección ABI *Vii7* (Applied Biosystems) fue utilizado para llevar a cabo la amplificación y a detección. Tras la amplificación, los valores de Ct se obtuvieron utilizando *QuantStudio Software v1.3* (Applied Biosystems). Ya que los

valores de Ct superiores a 35 representaron la detección de una sola molécula en la amplificación de las muestras, los valores superiores se consideran por debajo del límite de detección del ensayo. Así pues, solamente los miR con valores de Ct iguales o menores a 35 en al menos uno de los grupos de estudio fueron incluidos en los análisis. Los valores fueron calculados como ΔCt , donde Ct representa el ciclo en que se supera el valor de detección de la amplificación y ΔCt representa la diferencia entre el valor de Ct del miR que se mide en cada caso y el valor de Ct del control endógeno (que era el ARN nuclear U6, incluido ya en el array comercial utilizado).

Se obtuvo una red que relaciona los miR que mostraron cambios en su expresión entre SAMR1 y SAMP8 utilizando el programa Cytoscape Software (www.cytoscape.org). Aquellos grupos de miR que se encontraron modificados en SAMP8 y se utilizaron para averiguar que rutas metabólicas estaban relacionadas con los cambios detectados, con el fin de detectar posibles genes de interés. Para detectar estos genes se utilizó TarBase v7.0 de la web *diana tools web service* (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=site/index>). La lista de todos los miR asociados con la senescencia, fenotipos de célula muscular lisa de la vasculatura y vías metabólicas PI3K/AKT/mTOR se utilizaron en el análisis.

2.7. Validación de los miR mediante qRT-PCR:

De los miR que mostraron diferencias entre SAMR1 y SAMP8, se seleccionaron aquellos especialmente relacionados con la senescencia, los cambios de fenotipo de células musculares lisas de la vasculatura y las vías metabólicas PI3K/AKT/mTOR para una validación mediante qRT-PCR por metodología Taq-Man. Los primers se detallan en la siguiente tabla:

miR	TaqMan Assay ID*
mmu- Let-7a-5p	000377
mmu-miR-124-3p	001182
mmu-miR-128-3p	000453
mmu-miR-145-5p	002278
mmu-miR-21-3p	002493
mmu-miR-221-3p	000524
mmu-miR-222-3p	002276
mmu-miR-136-5p	000592
mmu-miR-143-3p	002249

* Se pueden consultar en <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html>

Tabla 3. Ensayos Taq-Man

2.8. Terapia de miR *in vitro* :

Se sembraron células musculares lisas de aorta en placas de 24 pocillos y se permitió que llegasen a un 60-70% de confluencia, comprobándose a diario. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y se llevó a cabo un lavado con HBSS. Tras ello, se llevó a cabo la transfección de las células con anti-miR anti miR-21, anti-miR 221, anti-miR-222, o con el mimético de los miR-143 o miR145, así como con un control de miR aleatoriamente generado (Scramble). Las moléculas de miRs y anti-miRs se han conjugado con FITC para determinar la eficacia de la transfección por un microscopio de fluorescencia. La transfección se llevó a cabo con el reactivo de transfección lipofectamina (DharmaFECT Duo Transfection Reagent, GE Health Care) en medio de cultivo sin antibióticos, factores de crecimiento ni complementos para facilitar la incorporación de los miRs a las células. Tras la incubación por 12-16h, se cambió el medio por medio de cultivo de células musculares lisas y las células se incubaron durante 24 horas adicionales. Después del período de incubación, las células transfectadas se sometieron a los protocolos experimentales para determinar la capacidad proliferativa, como se ha descrito en el apartado 2.4.

2.9. Terapia de miR *in vivo*:

Se llevó a cabo una lesión de denudación endotelial de la arteria femoral de ratones SAMP8 y SAMR1 con el objetivo de producir una hipertrofia en respuesta a dicha lesión. De esta forma se pudo determinar la capacidad proliferativa de las células musculares lisas en arterias *in vivo*. Para ello, se anestesiaron los ratones utilizando isofluorano por inhalación (5% para la inducción y entre 2,5 y 1% durante en el mantenimiento, con un flujo de oxígeno de 2,5 L/minuto). Una vez anestesiado, se accedió a la arteria femoral mediante una incisión longitudinal en la zona inguinal, con ayuda de un microscopio de quirófano (Carl Zeiss). Se ligó la arteria femoral a la altura del ligamento inguinal mediante una pinza. A la altura de la rama epigástrica, se realizó un ligamento más distal mediante una sutura de nylon 8-0. En este momento se realizó una arteriotomía en la parte más distal de la rama epigástrica y introdujo una guía de angioplastia de 0,25 mm de diámetro (Advanced Cardiovascular Systems) hasta llegar a la zona más proximal de la arteria femoral, liberándola de la pinza que habíamos situado en ella. Se avanzó la guía hasta la altura de la bifurcación aórtica y se retiró 3 veces, para asegurar la lesión endoluminal. Al retirar la guía, se ligó el extremo distal de la rama epigástrica en el que se realizó la arteriotomía gracias a la sutura que habíamos situado previamente. Antes de cerrar la herida, se aplicó el tratamiento con miR o anti-miR directamente sobre la arteria dañada. El vehículo utilizado fue gel plurónico al 20% p/v (Pluronic F-127, Invitrogen), con un volumen final de 80 μ L una vez añadido el tratamiento. El tratamiento constaba de 1 nmol del miR correspondiente (control de miR generados aleatoriamente, miR-21, miR-221, miR-222, miR-143, miR-145 o Scramble, Exiqon) incorporado en lipofectamina (DharmaFECT Duo Transfection Reagent, 0.75 mL, GE Health Care) como vector para su incorporación a las células. Cada tratamiento llevaba incorporado FITC en la posición 5' del miR para su posterior localización en la zona tratada. El tratamiento fue preparado en condiciones de esterilidad y administrado de forma ciega.

La arteria femoral de la otra extremidad del animal sirvió como control, sufriendo el mismo proceso, pero sin recibir tratamiento con miR. Al cabo de un mes, se sacrificaron los animales anestesiándolos mediante isofluorano tal como está descrito antes y llevando a cabo una decapitación y se obtuvieron las extremidades inferiores para el estudio histológico. Los cortes transversales (10 μ m) de las patas con las arterias femorales fueron montados en portaobjetos y sometidos a inmunohistoquímica para detectar la incorporación de la molécula de FITC en el tejido. Las secciones histológicas se incubaron con un anticuerpo monoclonal primario contra el FITC 1:200 (Santa Cruz, sc-57585) por toda la noche a 4°C. Después de lavados seguidos, los anillos se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con AlexaFluor-594 (Thermo Fisher). Las

secciones se procesaron para montaje con un medio de montaje con DAPI para marcar los núcleos (ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI, Thermofisher). Se obtuvieron imágenes bajo luz fluorescente para detectar las de autofluorescencia emitida por la elastina (verde), de los núcleos marcados con DAPI (azul), y de la FITC unido a los miR de los tratamientos (rojo).

3. Estudio de las diferencias asociadas al sexo en el remodelado y función vascular durante el envejecimiento:

3.1. Medición de la presión arterial:

Un día antes del sacrificio, un grupo de ratones CD1 (macho y hembras de 3 y 12 meses) fueron anestesiados con isofluorano (5% en aire inhalado para la inducción y de 1,5% a 2% para el mantenimiento), para una medición directa y continua de la presión arterial. La carótida fue identificada y separada del tejido adyacente limpiamente sin estimular el nervio vago y se insertó un catéter Tygon previamente llenado con suero salino heparinizado (0,5 IU/mL) en la arteria carótida siguiendo protocolos establecidos anteriormente²¹⁹. Se conectó el extremo libre de la cánula a una llave de 3 vías mediante la cual se conectó a un transductor de presión (Narco Bio-System). Tras un período de estabilización de 10-15 min, se registró la presión arterial media durante un periodo de 30 minutos en el software LabChart (ADIInstrument, Oxford, UK).

3.2. Estudios de reactividad vascular:

Se limpiaron segmentos intactos de 2 mm de aorta de tejido conectivo y grasa y fueron montados en un miógrafo de 4 canales (modelo 410 A; J.P. Trading, Aarhus, Dinamarca), previamente llenado con solución de Krebs-Henseleit mantenido a 37 °C, tal como se describe en artículos previos²²⁰. Se estableció una tensión óptima para el modelo experimental mediante experimentos preliminares sometiendo el segmento arterial a diferentes tensiones en reposo y administrando cloruro de potasio (KCl, 100 mM). Una vez establecida la tensión máxima del segmento arterial, se realizó un lavado y se permitió a los segmentos arteriales equilibrarse durante 30-60 minutos.

Tras el periodo de equilibrio, se realizó una curva de contracción mediante la administración de AngII (desde 1nM hasta 1µM). Para evitar la interferencia a causa de la taquifilaxia inducida por la AngII, cada concentración fue aplicada a un segmento arterial distinto de la misma aorta, siendo cada

concentración una medida independiente. Los segmentos arteriales de cada aorta fueron asignados aleatoriamente a cada una de las concentraciones de la curva en todos los casos.

Para medir la relajación dependiente de endotelio, se utilizaron segmentos arteriales de 2mm previamente contraídos con Fenilefrina (Phe) en una concentración (desde 0.2 μ M hasta 0.4 μ M) capaz de inducir una contracción correspondiente al 80% de la respuesta máxima inducida por el KCl en una concentración de 100 mM. Cuando las respuestas contráctiles alcanzaron una meseta (5-10 min), se llevó a cabo una curva de relajación mediante la administración del agente vasodilatador dependiente del endotelio, acetilcolina (ACh) en concentraciones ascendentes (desde 1 nM hasta 10 μ M). Una vez obtenida la curva de relajación dependiente del endotelio, se llevaron a cabo 3 lavados mediante solución de Krebs-Henseleit y se permitió a los segmentos arteriales equilibrarse durante un periodo de 30 minutos. Posteriormente se determinó la relajación independiente del endotelio mediante la administración de concentraciones progresivamente crecientes de nitroprusiato de sodio (NPS, desde 1 nM hasta 10 μ M). La influencia de las distintas vías de señalización en la relajación arterial se midió mediante la incubación de los segmentos arteriales con la indometacina (10 μ M, inhibidor no selectivo de ciclooxigenasas), el L-NAME (100 μ M, inhibidor de sintasa de óxido nítrico) y el Tempol (100 μ M, secuestrador del anion superoxido). A este respecto, las curvas de relajación a ACh se llevaron a cabo de forma simultánea en diferentes segmentos arteriales del mismo animal, siendo un segmento estudiado en ausencia de inhibidores como control, y el resto en presencia de indometacina o L-NAME. Las incubaciones empezaron 30 minutos antes de la contracción con Phe y se mantuvieron durante todo el experimento para asegurar su efectividad. Todas las mediciones se llevaron a cabo en segmentos arteriales cuyo endotelio se encontraba intacto.

3.3. Análisis morfométrico del remodelado en la arteria aorta:

Se han determinado los cambios en el grosor de la pared y lumen arterial de aortas de machos y hembras en las distintas edades estudiadas tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.

3.4. Determinación de colágeno por tinción de rojo de sirio:

Los cambios en la expresión de colágeno en la pared de las aortas de machos y hembras a distintas edades han sido estudiadas tal y como se ha descrito en el apartado 2.3.

3.5. Medición de la actividad de las ciclooxigenasas:

Se llevó a cabo la medición de la actividad de la COX1 y la COX2 en homogenado de aorta torácica de ratón utilizando un kit comercial (Cayman Europe) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad peroxidasa de las COX se midió por ensayo colorimétrico, monitorizando la aparición de N,N,N',N'-tetrametil-fosfo-fenilenediamina (TMPD) a 590 nanómetros durante 5 minutos tras una incubación con 20 μ M de ácido araquidónico. La especificidad de la actividad de las isoformas de ciclooxigenasa se determinó mediante la adición de inhibidores selectivos para COX1 (10 μ M de SC560) y para COX2 (10 μ M de DuP-697)

3.6. Medición de la producción de prostaglandinas:

Una vez finalizados los experimentos de miografía y respuesta a la ACh, se recolectó el medio en el miógrafo y se dejó en tubos de microcentrifuga a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir que tanto el tromboxano TXA2 como la prostaciclina PGI2 se convirtieran en sus metabolitos estables TXB2 y 6-keto-PGF-1 α respectivamente. Tras el periodo de incubación, se congelaron las muestras a -80°C. Los niveles de TXB2 y 6-keto-PGF-1 α se determinaron por inmunoensayo enzimático (ELISA) comercial (Cayman Europe) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.7. Análisis de los cambios de expresión de miR en la aorta:

Los análisis para determinar la influencia del sexo y el envejecimiento en la expresión de mRNA se ha determina como se ha descrito en apartado 2.6.

3.8. Análisis de los cambios de expresión de proteína en la aorta:

Se congelaron aortas torácicas utilizando hielo seco y se homogenizaron mecánicamente en presencia de tampón de lisis RIPA (50 mM Tris, pH 7.4, 1 mM de EDTA, 1% v / v NP-40, 150 mM NaCl, 2mM Na3VO4, 0.25% deoxiIcolato de sodio, 1mM NaF, 2% SDS, 10% glicerol y la combinación de inhibidores proteasa - 2 μ g / ml). Después de 30 minutos de incubación sobre hielo para completa lisis de las células, se han centrifugado las muestras por 20 min a 14000g a 4C para la separación y solubilización de proteínas. La concentración de proteínas se midió utilizando el kit de medición de proteína 660 nm de Pierce (ThermoFisher). Una cantidad igual de proteína de cada muestra (25 μ g) se cargó en geles de acrilamida de concentración progresivamente creciente (del 4% al 12%) y se separó

por SDS-PAGE, y luego se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa en el sistema de transferencia en seco iBlot (Invitrogen, Thermo Fisher). Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en PBS con 0,1% (v/v) de Tween 20 y 5% (p/v) de leche desnatada en polvo. Asimismo, se añadió anticuerpo primario de la siguiente manera:

- Dilución 1:1000 de anticuerpo monoclonal de ratón contra sintasa de óxido nítrico endotelial (BD Bioscience – 610297)
- Dilución 1:1000 de anticuerpo monoclonal de ratón contra sintasa de óxido nítrico endotelial fosforilada en la posición Ser1177 (BD Bioscience – 612393)
- Dilución 1:1000 de anticuerpo monoclonal de ratón contra COX1 (Santa Cruz–sc19998)
- Dilución 1:500 de anticuerpo monoclonal de ratón contra COX2 (Santa Cruz–sc19999)

Tras 3-5 lavados con PBS con 0,1% (v/v) de Tween, se incubaron las membranas por 1h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario específico contra IgG de ratón (procedente de cabra) conjugado a peroxidasa de rábano en PBS con 0,1% (v/v) de Tween 20 y 1% (p/v). Después de 3-5 lavados adicionales con PBS con 0,1% (v/v) de Tween se incubaron las membranas con un sustrato quimioluminiscente (Super Signal, Pierce, Thermo Fisher) de acuerdo con los protocolos del fabricante. La señal quimioluminiscente fue medida mediante el sistema de imagen LAS4000 (GE Healthcare). El análisis densitométrico de los Western blot se llevó a cabo mediante el software ImageJ (NIH.gov).

Al final del primer Western blot, todas las membranas fueron sometidas a un “*striping*” para eliminar los anticuerpos y fueron sometidas a nueva incubación, utilizando anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH en una dilución 1:2500 (Santa Cruz – sc-365062) como control de carga. Los datos del análisis densitométrico de cada anticuerpo se normalizaron por los valores obtenidos en la densitometría del GAPDH.

3.9. Detección de estrés oxidativo mediante dihidroetidio:

Se congelaron aortas torácicas en medio de congelación OCT (VWR, Radnor, Pensilvania) y se obtuvieron secciones de 10 μ M utilizando un criostato (Leica, Alemania). Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se las dejó equilibrar a 37°C en solución de Hanks (ThermoFisher Scientific, Walham, Massachusetts) de 30 minutos a 4 horas dependiendo de la condición experimental (L-NAME, Everolimus y TNF α durante 30 minutos, Apocinina durante 1 hora, angiotensina II durante 4 horas). Después del período de incubación, las muestras se incubaron durante 30 minutos en dihidroetidio (5 μ M) diluido en solución de Hanks. Tras 2 lavados con PBS, las secciones

de aorta fueron montadas en medio de montaje con DAPI (ThermoFisher Scientific, Walham, Massachusetts) y se obtuvieron microfotografías con un microscópio de fluorescencia (Leika). Se registraron imágenes de al menos tres secciones aórticas de cada animal. Las imágenes se fusionaron utilizando el software Mac Biophotonic ImageJ y la fluorescencia del DHE se expresó como porcentaje de fluorescencia emitida por DAPI.

3.10. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para determinar los niveles de TNF α en suero de ratón.

La detección se realizó por colorimetría utilizando un kit comercial y se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (KMC3011, Invitrogen, Walham, Massachusetts). La lectura del ensayo se realizó a 450 nm con el lector de placas Synergy 2 Multi-Mode Reader (Bio Tek, Swindon, UK).

4. Análisis estadístico:

Los resultados se expresan como media \pm SEM (*Standard Error Mean* – Error estándar de la media) del número (n) de muestras individuales indicadas en las leyendas de cada figura. Los ajustes a las curvas sigmoidales de los estudios de concentración-respuesta en las miografías se realizaron utilizando GraphPad Prism software (v. 6.0; GraphPad Software, San Diego, California). Las respuestas a la AngII se expresaron como porcentaje del tono generado por 100 mM de cloruro de potasio (concentración máxima). La máxima respuesta vasodilatadora inducida por la ACh se calculó y expresó en relación a la contracción producida por la Phe, que fue considerada como ausencia de relajación. Por otro lado, la tensión registrada previamente a la incubación con Phe se consideró como el máximo de relajación. La área bajo la curva se calculó en cada curva sigmoidal usando GraphPad Prism software. Las diferencias estadísticas asociadas con la senescencia se calcularon por test T no pareado, y en el caso del array (TaqMan *Array Rodent MicroRA A+B Cards v3.0*), el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Se seleccionaron como válidos aquellos resultados con un porcentaje de falso positivo menor al 5% y un cambio en la expresión entre grupos mayor a 0,6 en base logarítmica. La dependencia del sexo y los tratamientos se evaluó por un análisis de varianza bidireccional (Two-way ANOVA) con el post-test de Bonferroni para comparar las medias replicadas. Todos los tests se realizaron en GraphPad Prism software. El nivel de significación de todos los tests se estableció en $p < 0.05$.

RESULTADOS

“An approximate answer to the right problem is worth a good deal more than an exact answer to an approximate problem.”

John W. Tukey

SUBPROYECTO 1

Proliferación de células musculares lisas durante el envejecimiento: el papel del miR-21 y la vía
AKT/mTOR

1. Las arterias de ratones SAMP8 son más senescentes que las de ratones SAMR1.

Con el objetivo de asegurar la robustez del modelo elegido, se examinó el estado de senescencia de ratones que envejecen de forma normal (SAMR1) y ratones que sufren de envejecimiento acelerado (SAMP8) físicamente a los 6 meses (fig. 15A). Los ratones SAMP8 muestran siempre características típicas de la senescencia (peor estado del pelaje, movilidad reducida...). También se llevó a cabo la medición de p53 en suero, siendo esta mayor en SAMP8 que en SAMR1 (fig. 15B). Por último se llevó a cabo el test de la β -Galactosidasa, que tiñe de azul aquellas células que son senescentes, tanto en aorta como en células musculares lisas de aorta (fig. 15C y 15D). Tanto en aorta como en células, la cepa SAMP8 siempre mostró más senescencia que la cepa SAMR1.

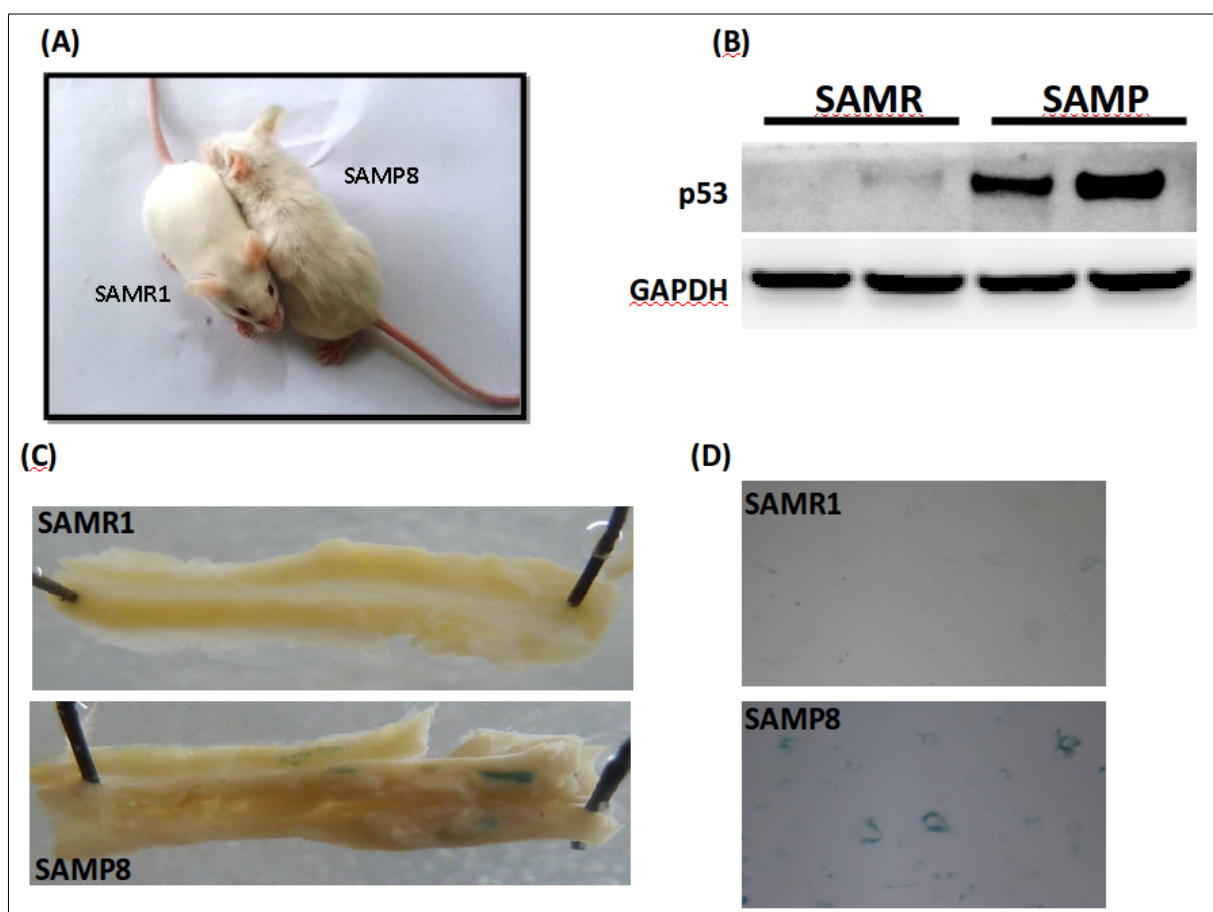


Figura 15. **A)** Comparación del estado físico de las cepas SAMR1 y SAMP8 a la edad de 7-8 meses. Se puede apreciar una mayor senescencia en la cepa SAMP8. **B)** Análisis por *Western Blot* de expresión de la proteína p53. Las muestras proceden de homogenados de aorta de las cepas SAMR1 y SAMP8 y se utiliza Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control endógeno para llevar a cabo la normalización. **C)** Test de actividad de β -Galactosidasa en aorta de SAMR1 y SAMP8 a los 7-8 meses. Las áreas que se muestran teñidas de azul dan positivo para el test, indicando que hay células senescentes en ellas. Se puede apreciar que la cepa SAMP8 muestra inicios de senescencia. **D)** Test de actividad de β -Galactosidasa en células musculares lisas procedentes de aorta de SAMR1 y SAMP8 de 7-8 meses. Las células que se muestran teñidas de azul dan positivo para el test, indicando que son senescentes. Se puede apreciar como las células de SAMP8 muestran mayor senescencia.

2. Los ratones SAMP8 muestran un mayor grosor de la pared de las arterias aorta y femoral que los ratones SAMR1.

Para averiguar si el envejecimiento va acompañado de cambios en la estructura de las principales arterias, se llevó a cabo una comparación de cortes transversales de las arterias aorta y femoral de SAMP8 y SAMR1 (fig. 16)

La medición del grosor de la pared arterial, tanto de aorta (fig. 16A) como de femoral (fig. 16B), muestra hiperplasia en los ratones envejecidos al compararlos con los controles. Por otro lado, la medición del diámetro de la luz del vaso demuestra que no existen diferencias entre ratones envejecidos y ratones control (fig. 16C y 16D). Este resultados demuestra que existe una hiperplasia que progresa hacia afuera de la luz del vaso en estas arterias durante el envejecimiento.

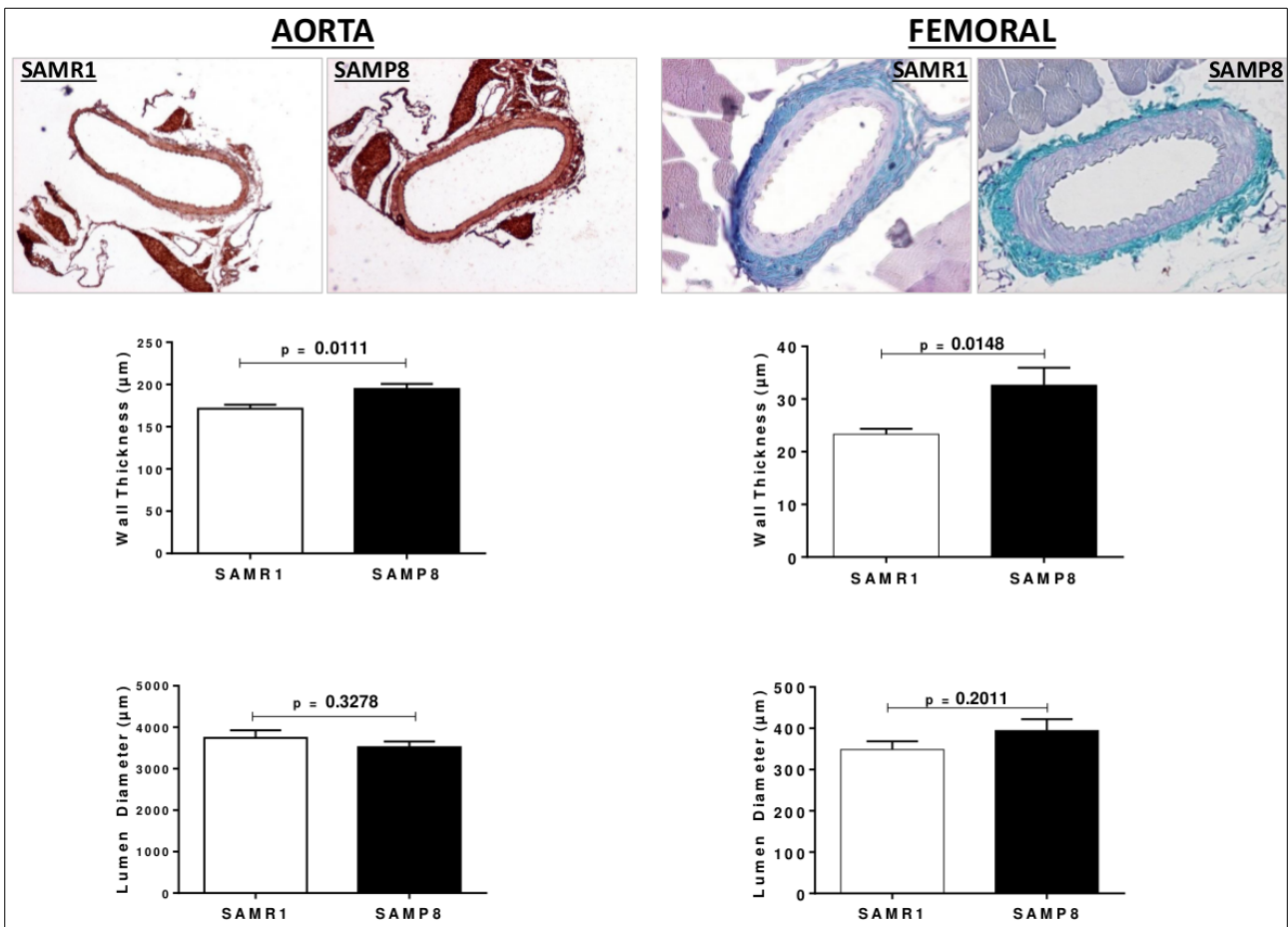


Figura 16. Microfotografías de secciones transversales de arteria aorta y arteria femoral de ratones SAMR1 y SAMP8 a los 7-8 meses de edad. Las fotografías mostradas son representativas de cada grupo. Se llevaron a cabo un mínimo de 6 mediciones independientes para los siguientes parámetros: **A)** Medición del grosor de la pared de la aorta. **B)** Medición del grosor de la pared de la femoral. **C)** Medición de la luz de la aorta. **D)** Medición de la luz de la femoral. Los gráficos de barras representan la media y el error estándar de la media. Los valores de P comparativos se muestran por encima de los gráficos de barras.

3. El incremento de grosor de la pared de las arterias aorta y femoral que se observa en ratones SAMP8 es causado por la proliferación de las células musculares lisas.

Una vez descubierto este patrón asociado al envejecimiento, se quiso dilucidar cual es la causa de la hiperplasia. Se midió el grosor de la pared de la aorta (fig. 17A) siendo más gruesa en SAMP8. Se midió el colágeno de la pared arterial de aorta y femoral, no encontrándose diferencias entre ratones control y envejecidos (fig. 17B). También se analizó el estado de las capas de elastina, no encontrándose diferencias entre ratones control y envejecidos tampoco en este caso (fig. 17C). Por descarte, estos resultados apuntan a las células musculares lisas de la pared vascular como causantes de la hiperplasia.

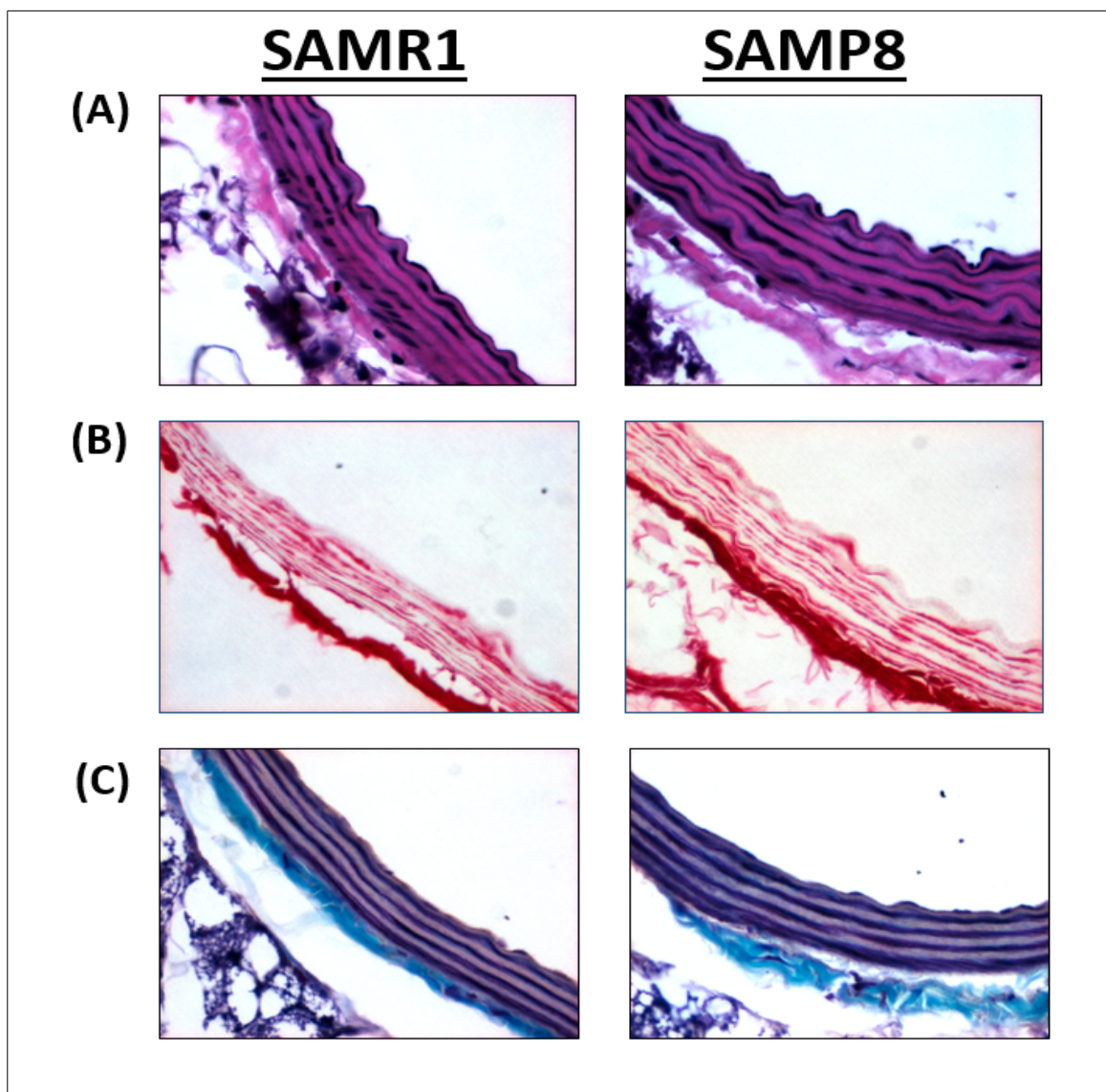


Figura 17. Evaluación del estado de la pared de la aorta en ratones SAMR1 y SAMP8 de 7-8 meses. Las fotografías son representativas de cada grupo que se estudió. **A)** La tinción de hematoxilina-eosina muestra que la pared de la aorta es más gruesa en ratones SAMP8. **B)** La tinción de rojo picrosirio muestra que no existen diferencias en la cantidad de colágeno en la pared de la aorta entre SAMR1 y SAMP8. **C)** la tinción tricrómica, que permite marcar las fibras de elastina, muestra que no existen diferencias en el estado ni la cantidad de las fibras de fibras de elastina entre SAMR1 y SAMP8.

RESULTADOS

Para averiguar si las células musculares lisas de la pared vascular son la causa de la hiperplasia, se llevó a cabo la medición la cantidad de proteína FSP-1 en la pared de aorta (fig. 18A). Esta proteína es un marcador de proliferación en células musculares lisas y se ha asociado a la formación de capa neointima que se encuentra asociada a ciertos procesos patológicos. Tanto la medición por western-blot como por inmunofluorescencia (fig. 18B) muestran que los ratones SAMP8 tienen más cantidad de proteína FSP-1 que los ratones control en la pared arterial, sugiriendo que las células musculares lisas de la pared arterial se encuentran en fenotipo proliferativo y que pueden ser las causantes de la hiperplasia asociada al envejecimiento que se observó previamente.

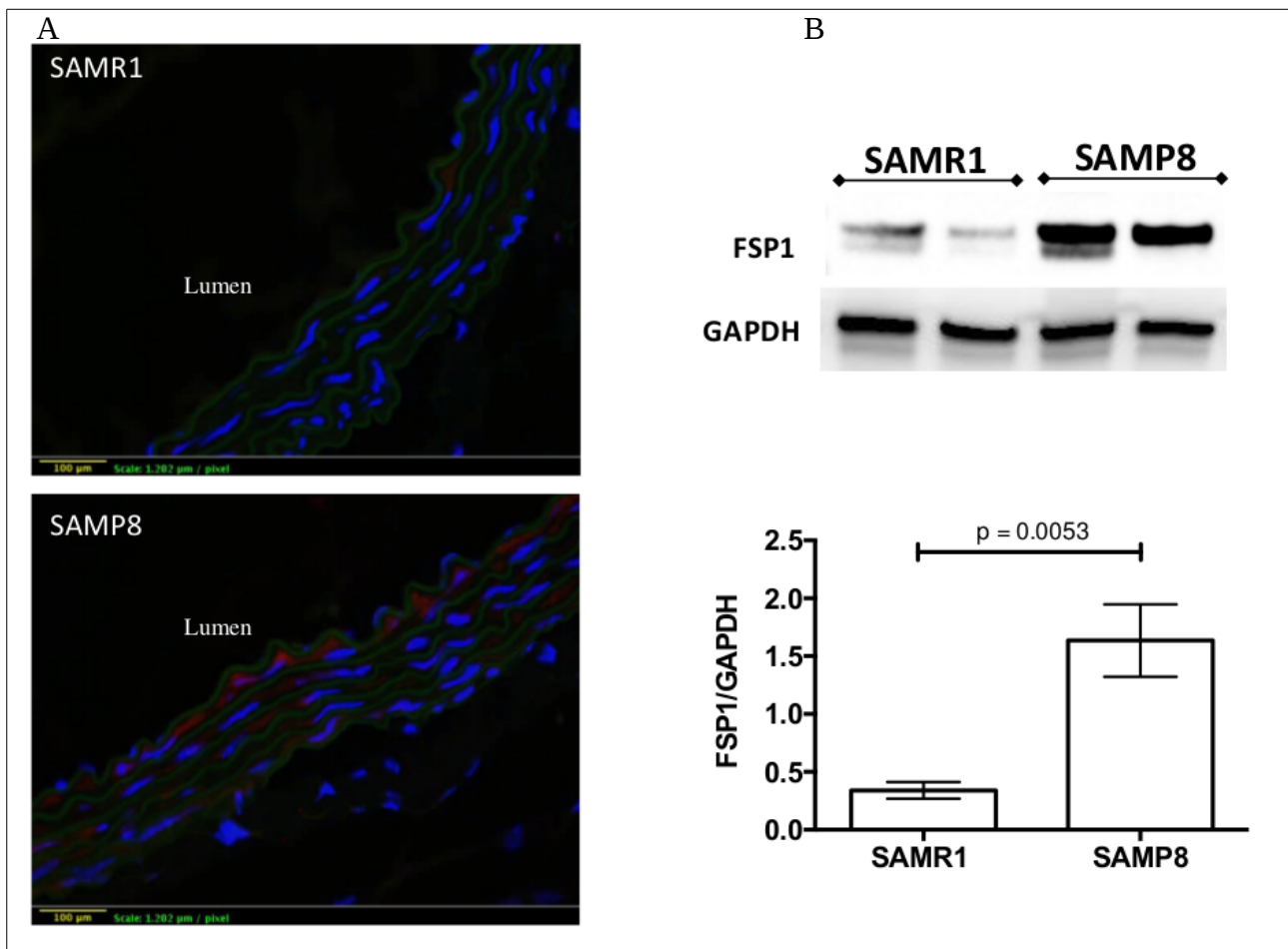


Figura 18. Medición de FSP1, marcador de cambio de fenotipo de las células musculares lisas, en aorta de ratones SAMR1 y SAMP8 de 7-8 meses. **A)** Localización de FSP1 en corte transversal de aorta. Se puede apreciar como apenas se detecta en SAMR1, mientras que existe una gran cantidad en SAMP8. **B)** Cuantificación de FSP1 en aorta por *Western Blot*, utilizando GAPDH como control endógeno para la normalización. SAMP8 tiene mayor cantidad de FSP1, indicando que las células musculares lisas de SAMP8 cambian a un fenotipo proliferativo. Los gráficos de barras representan la media y error estándar de la media. Los valores de P comparativos se muestran por encima de los gráficos de barras.

4. Las células musculares lisas de la aorta son más proliferativas en ratones SAMP8.

Para dilucidar si las células musculares lisas de la pared arterial tienen mayor capacidad proliferativa en ratones envejecidos, se obtuvieron dichas células de la aorta de ratones SAMP8 y SAMR1 y se llevó a cabo un experimento de proliferación. El modelo elegido para medir la proliferación de las células musculares lisas fue el ensayo de herida (fig. 19A), y los resultados demuestran que las células de los ratones envejecidos tienen una mayor capacidad proliferativa que las de los animales control. Así pues, las células musculares lisas de las arterias aorta y femoral son las responsables de la hiperplasia asociada al envejecimiento que se observó previamente.

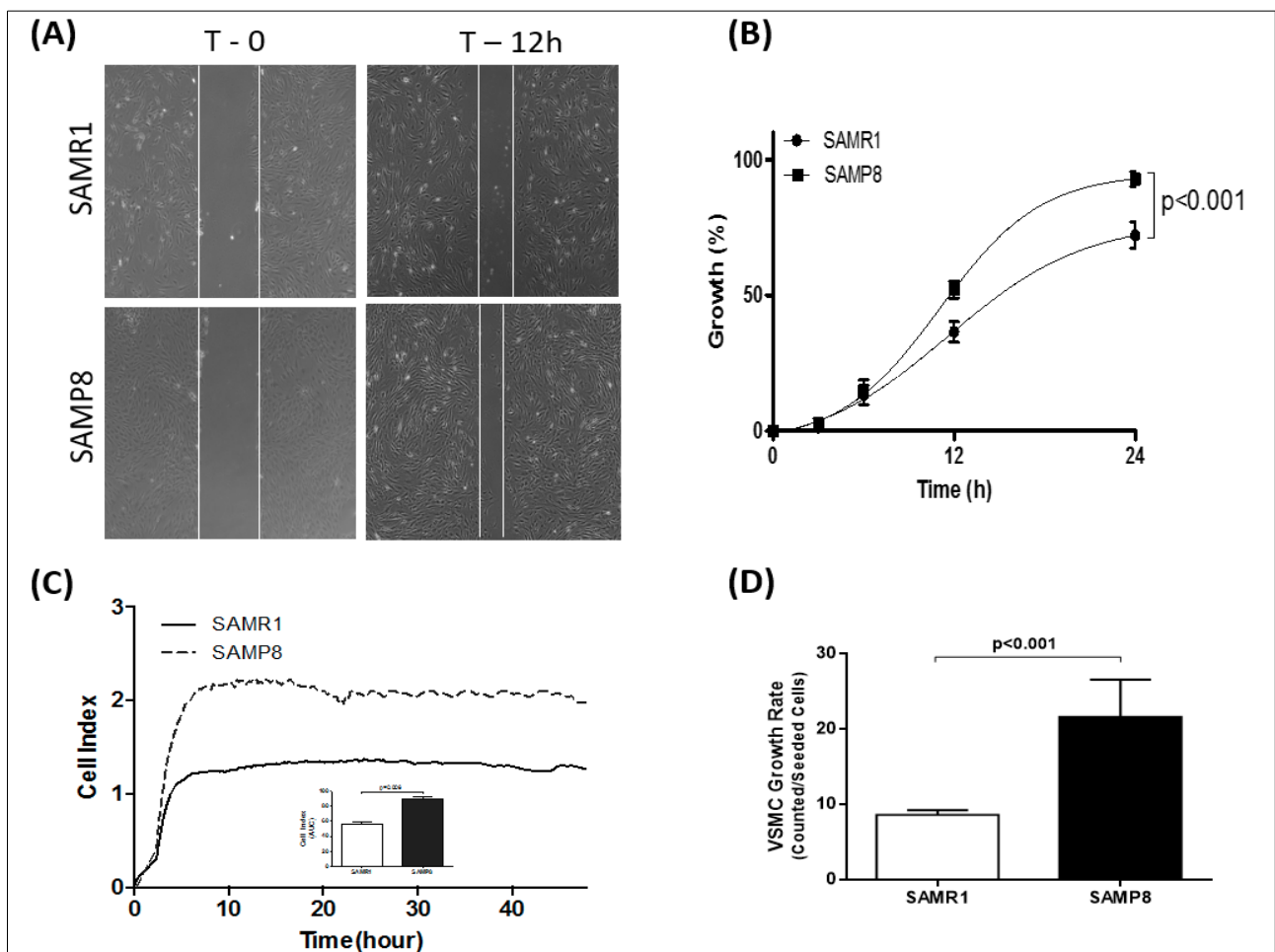


Figura 19. Medición de la capacidad de proliferación de las células musculares lisas procedentes de aorta de SAMR1 y SAMP8 de 7-8 meses. **A)** Ensayo de herida *in vitro*. T-0 corresponde a la herida recién realizada. T-12h corresponde a la herida 12 horas tras ser realizada. Se llevaron a cabo mediciones en un mínimo de 6 réplicas independientes a 0, 3, 6, 12 y 24 horas tras la realización de la herida. Las microfotografías son representativas de los tiempos 0 horas y 12 horas. Las líneas blancas delimitan la herida. **B)** La cuantificación, representada en una curva de crecimiento, muestra el ritmo al que se cierra la herida. Las células musculares lisas procedentes de SAMP8 llegan prácticamente al 100% (herida completamente cerrada) al cabo de 24 horas, mostrando un ritmo mayor de proliferación que la células musculares lisas procedentes de SAMR1. Las barras representan el error estándar de la media. **C)** Medición del crecimiento de células musculares lisas procedentes de aorta de SAMR1 y SAMP8 de 7-8 meses *in vitro*. El ensayo se basa en impedancia y se mide en unidades arbitrarias (*Cell Index*). Las mediciones se llevaron a cabo de forma continua durante 48 horas en 6 réplicas independientes para cada grupo. En pequeño se muestra el área bajo la curva del ensayo por impedancia. Se muestra como las células musculares lisas procedentes de SAMP8 tienen mayor capacidad de proliferación. Las barras muestran la media y el error estándar de la media. **D)** Conteo de células mediante hemocitómetro. Se plantaron cantidades iguales de células musculares lisas (2.5×10^4 células/cm²) y se contaron después de 7 días de incubación. El conteo se realizó mediante hemocitómetro automatizado. En el gráfico de crecimiento celular se muestra la relación entre células contadas a los 7 días de cultivo y las células sembradas. Las células de SAMP8 resultaron ser más proliferativas.

RESULTADOS

También se quiso comprobar este resultado por otras metodologías. Se utilizó una medición de la proliferación de las células musculares lisas en tiempo real mediante impedancia (fig. 19B) y se validó este resultado por conteo de células tradicional mediante cámara de Neubauer (Fig. 19C). En ambos casos SAMP8 mostró más capacidad de proliferación que SAMR1, de acuerdo con el resultado previo.

5. La lesión de la pared vascular de la femoral produce una mayor hiperplasia en ratones SAMP8.

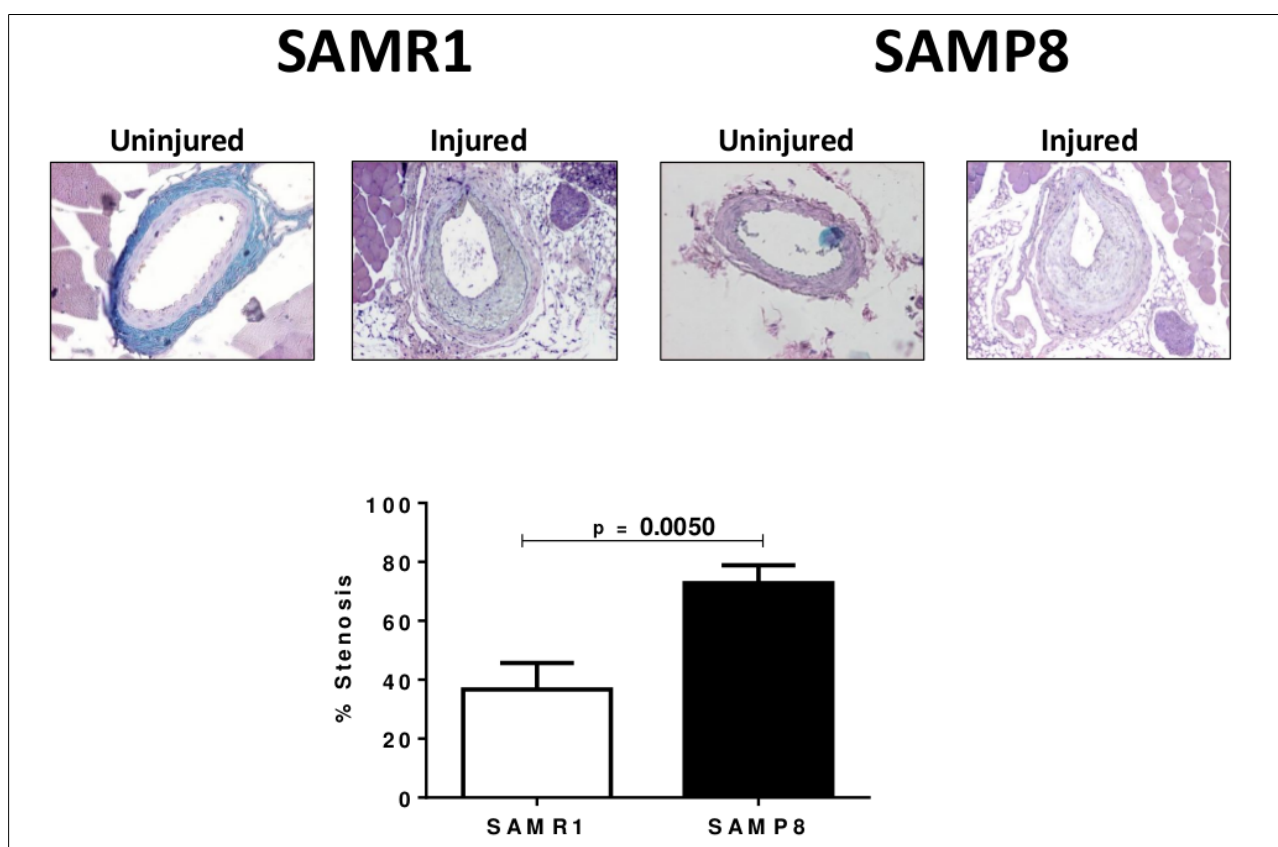


Figura 20. Medición de la hipertrofia de la pared de la arteria femoral un mes tras la lesión arterial. Las microfotografías de cortes transversales de femoral son representativas de cada grupo. El gráfico muestra el porcentaje de estenosis (disminución del área de la luz del vaso) en un mínimo de 6 mediciones independientes. Los gráficos de barras representan la media y error estándar de la media. Los valores de P comparativos se muestran por encima de los gráficos de barras.

A la vista de los resultados obtenidos *in vitro*, se quiso ampliar el estudio *in vivo* y para ello se eligió un modelo de denudación de arteria femoral previamente validado en nuestro grupo^{221,222}. Tras sufrir una lesión de denudación de la arteria femoral, tanto los ratones SAMR1 como los ratones SAMP8 desarrollan hiperplasia de la íntima (fig. 20), que condiciona la estenosis de la luz del vaso. Se observó que los ratones SAMP8 desarrollan un mayor grado de hiperplasia que los ratones SAMR1. Este resultado concuerda con los anteriores, demostrando que existe una mayor capacidad proliferativa en las paredes vasculares de los animales envejecidos.

6. La lesión de la arteria femoral causa una mayor activación de la vía AKT/mTOR en los ratones SAMP8.

Con el objetivo de ahondar más en las vías implicadas en las diferencias encontradas, se llevó a cabo un array de la vía AKT/mTOR, así como de enzimas clave en inflamación, apoptosis y senescencia con muestras de las arterias que sufrieron el procedimiento de denudación (fig. 21).

A este respecto, los resultados son controvertidos, pues hay un incremento de enzimas que participan en la progresión de esta vía, como AKT, PI3K y PDPK1, pero también existe un incremento de enzimas que regulan negativamente dicha vía, como PTEN y AKT1S1. Asimismo, enzimas tan importantes en la vía AKT/mTOR, como son el propio mTOR y Rptor, no muestran cambios con el envejecimiento.

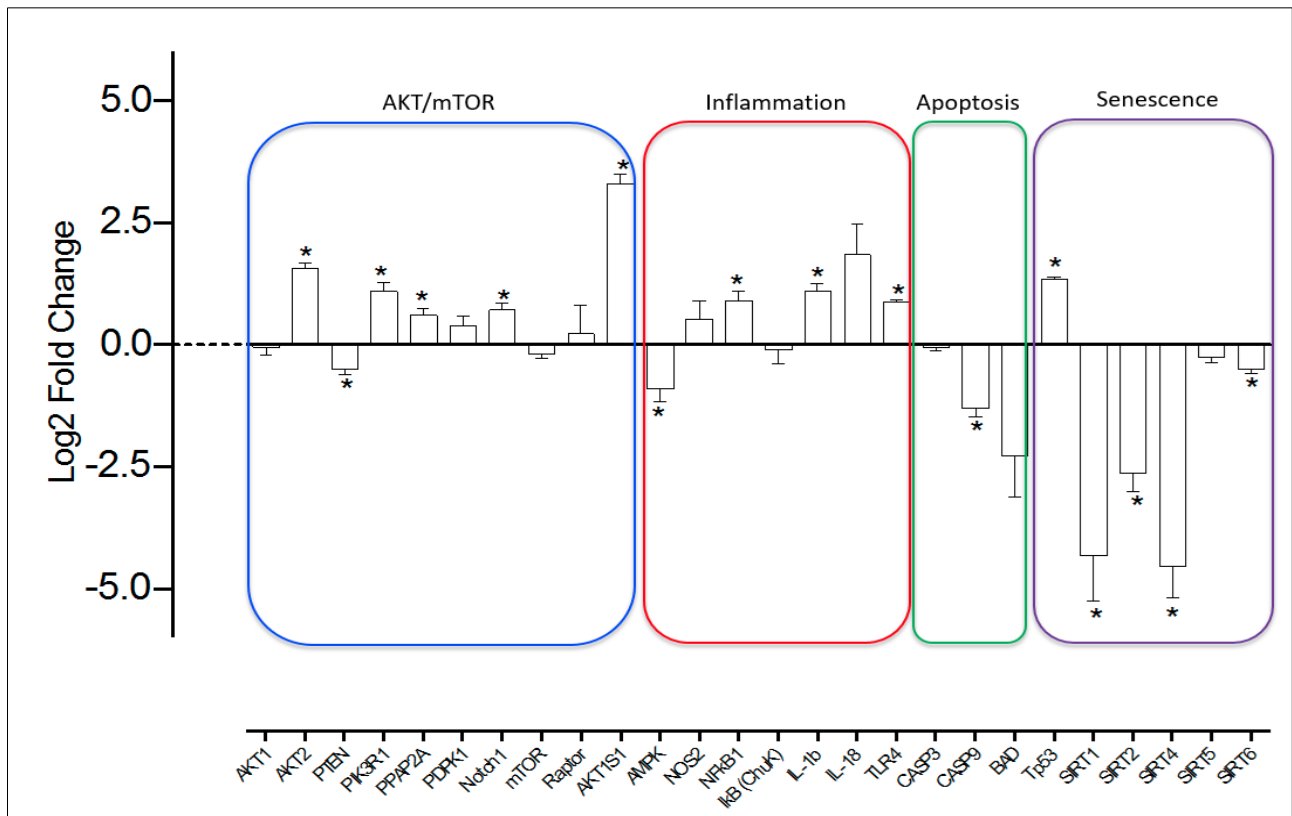


Figura 21. Cambios en la expresión de ARN mensajero en células musculares lisas procedentes de aorta de SAMP8 de 7-8 meses. Los ARNs se muestran agrupados en conjuntos funcionales según la vía de señalización a la que pertenecen. Se llevaron a cabo un mínimo de 6 réplicas independientes para cada medición. Los gráficos de barras representan la media y error estándar de la media. * $p > 0.05$ en comparación con los valores de SAMR1.

7. La inhibición de la vía AKT/mTOR es capaz de disminuir la capacidad proliferativa de las células musculares lisas de SAMP8.

A continuación se llevó a cabo un experimento de medición de la proliferación por impedancia *in vitro*, en células musculares lisas de aorta de ratones SAMP8 y SAMR1. En este experimento se inhibieron enzimas clave en vías de proliferación celular mediante el tratamiento con Wortmanina (inhibidor PI3K, vía AKT-mTOR) o con PD98059 (inhibidor de ERK, vía de las MAPK) (fig. 22). Los resultados muestran que la inhibición de la vía de AKT-mTOR disminuye la proliferación celular en ratones envejecidos, pero no produce cambios en ratones control. Por otro lado, la inhibición de la vía de las MAPK produce una disminución en la proliferación tanto de ratones envejecidos como control.

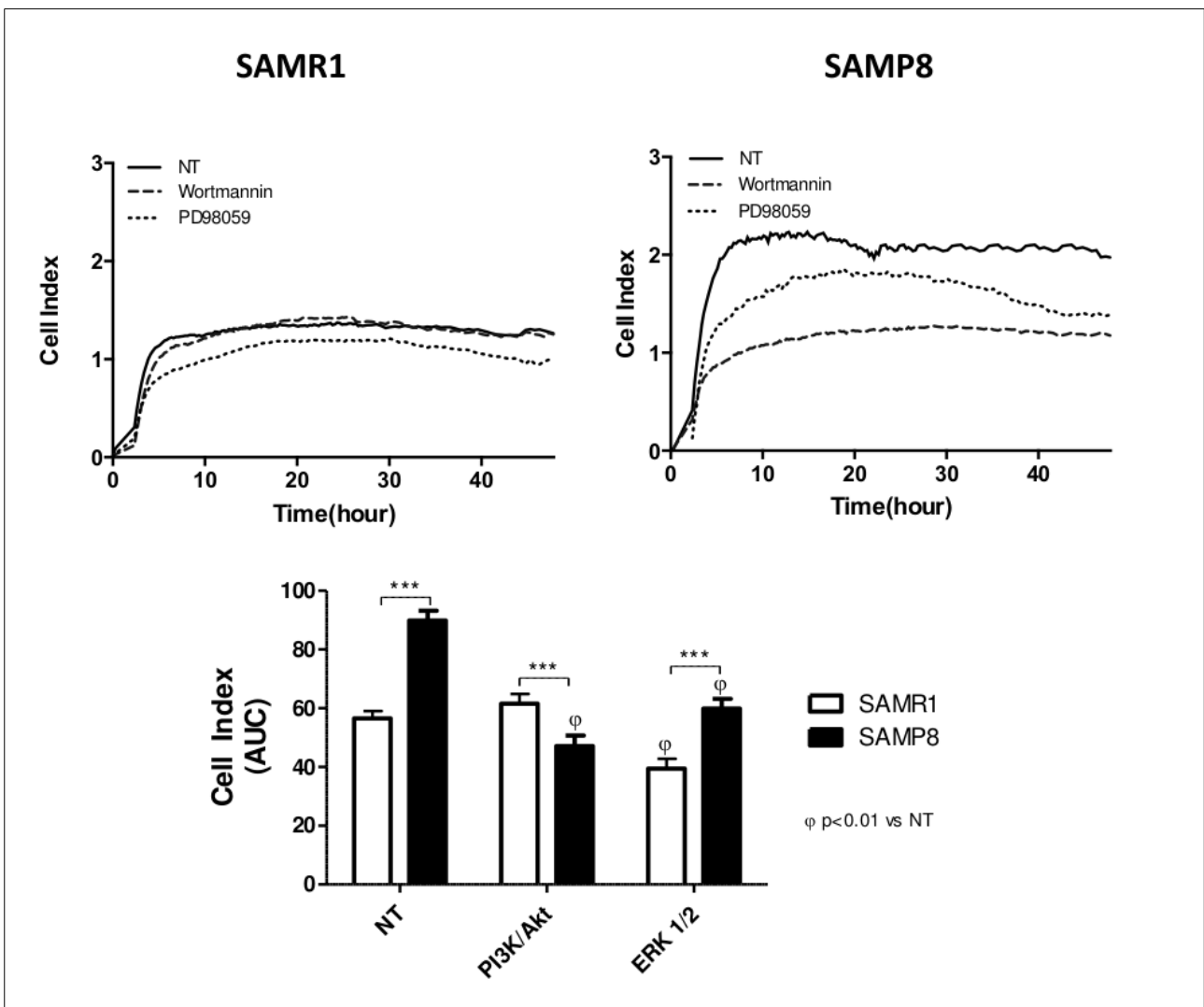


Figura 22. Efecto de 100nM de Wortmanina (inhibidor de PI3K, de la vía AKT) y de 1 μ M de PD98059 (inhibidor de ERK, de la vía de las MAP quinazas). En las curvas de crecimiento se puede apreciar el efecto de ambos inhibidores en el crecimiento de células musculares lisas procedentes de aorta de SAMR1 y SAMP8 de 7-8 meses. Se midió el crecimiento de dichas células durante 48 horas en continuo mediante la medición de la impedancia. En el gráfico se muestra el área bajo la curva de crecimiento. Las células de SAMP8 muestran una tasa de proliferación basal mayor que las de SAMR1. La inhibición de la vía de las MAP quinazas disminuye la proliferación de SAMR1 y SAMP8, mientras que la inhibición de la vía de AKT disminuye solamente la proliferación de SAMP8. Se realizaron 6 réplicas para cada condición experimental. Los gráficos de barras representan la media y error estándar de la media. *** $p < 0,001$ en comparación con los valores de SAMR1; ϕ $p < 0,01$ en comparación con las células no tratadas.

8. La inhibición de miR-21 disminuye la actividad de AKT y reduce la proliferación de células musculares lisas en SAMP8.

Para ahondar más en los cambios que se producen en la regulación del fenotipo y la proliferación de las células musculares lisas de la vasculatura, se llevó a cabo un análisis *in silico* de los miRNA implicados (fig. 23 y 24). Los mejores candidatos relacionados con el envejecimiento, las vías AKT/mTOR y el cambio de fenotipo de células musculares lisas, resultaron ser los miR-21, miR-221, miR-222, miR-143 y miR-145.

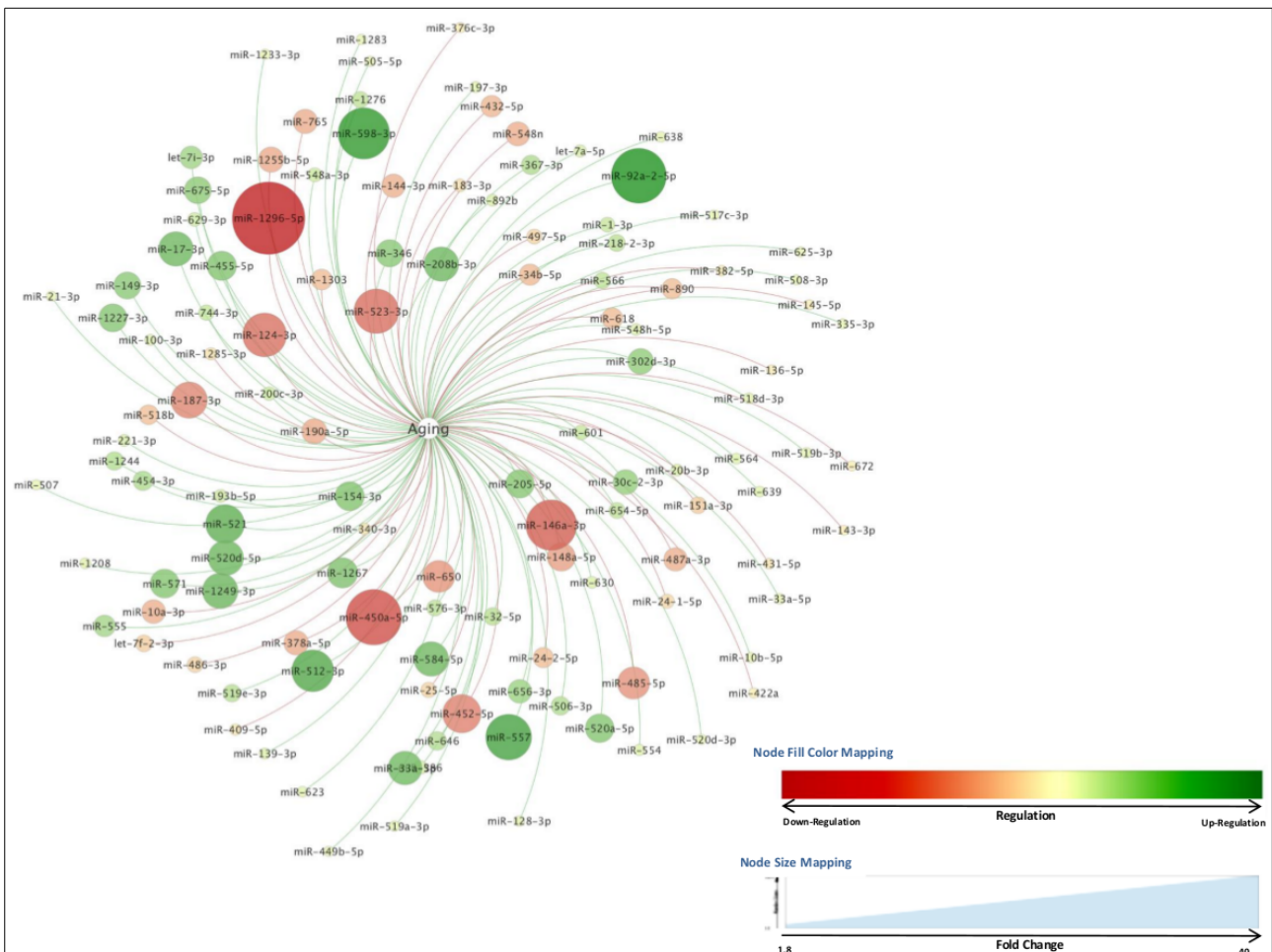


Figura 23. Red de micro ARN (miR) modificados ($p > 0.05$) por la senescencia en aortas de ratón SAMP8 en relación a los valores expresados en SAMR1. El tamaño del círculo es relativo al factor de cambio observado en la expresión de cada miR. El patrón y el grado del color en cada círculo son relativos a la regulación abajo (rojo) o para arriba (verde) en la expresión de miRs. La red se visualizó utilizando el software Cytoscape.

RESULTADOS

De estos miRNA, miR-21, miR-221 y miR-222 se encuentran incrementados en ratones SAMP8 cuando los comparamos con SAMR1, mientras que miR-143 y miR-145 se encuentran disminuidos (fig. 25).

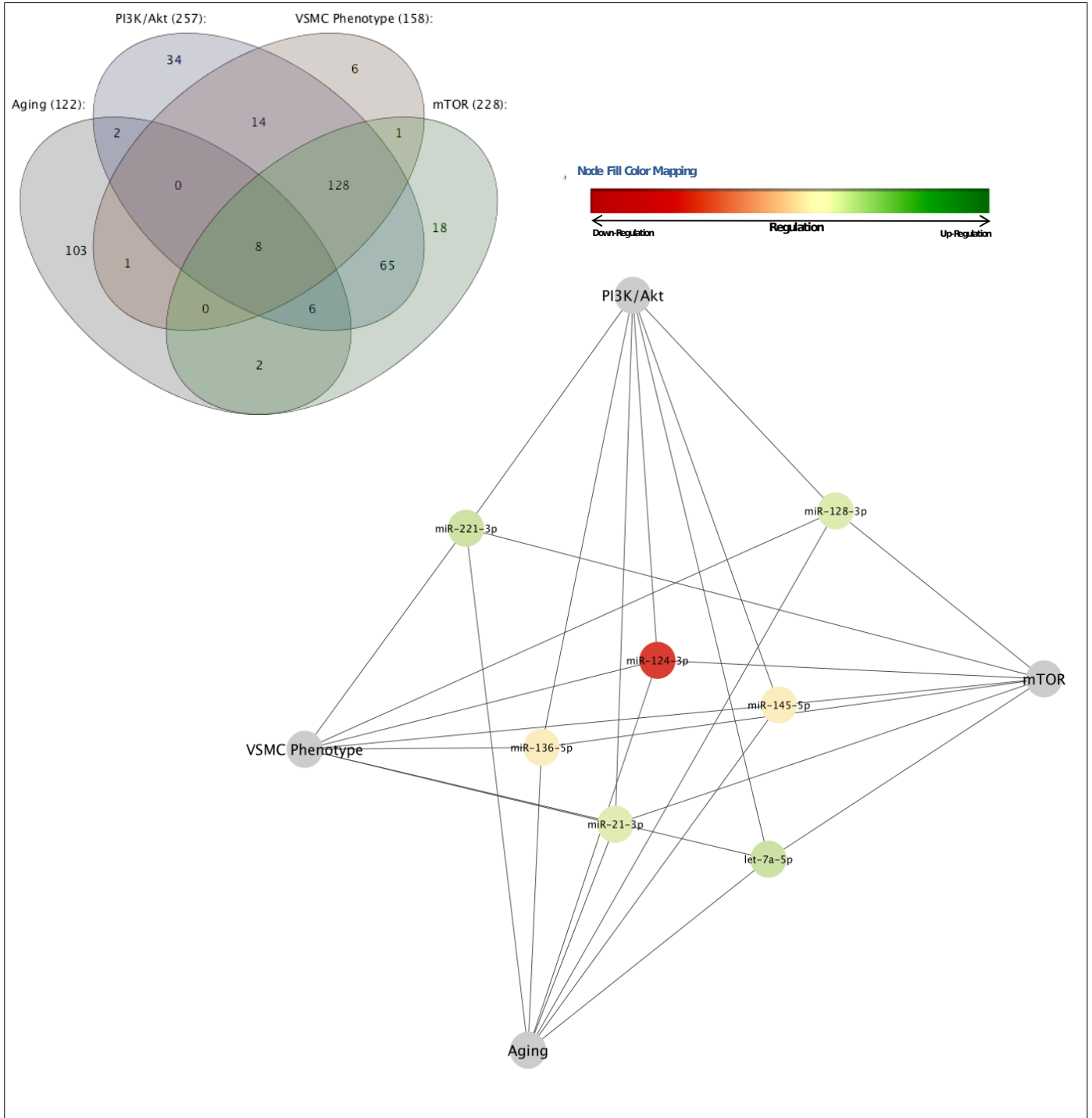


Figura 24. Análisis de la sub-red de los micro ARN (miR) interconectados con los miRs cambiados en aortas de SAMP8 y comunes a las vías de señalización (PI3K/Akt y mTOR) y los cambios de fenotipo de las células musculares lisas (VSMC), según las bases de datos en mirPath v.3. El patrón y el grado del color en cada círculo son relativos a la regulación abajo (rojo) o para arriba (verde) en la expresión de miRs. La sub-red interconexión de miR y el diagrama Venn y Euler se visualizó utilizando el software Cytoscape.

RESULTADOS

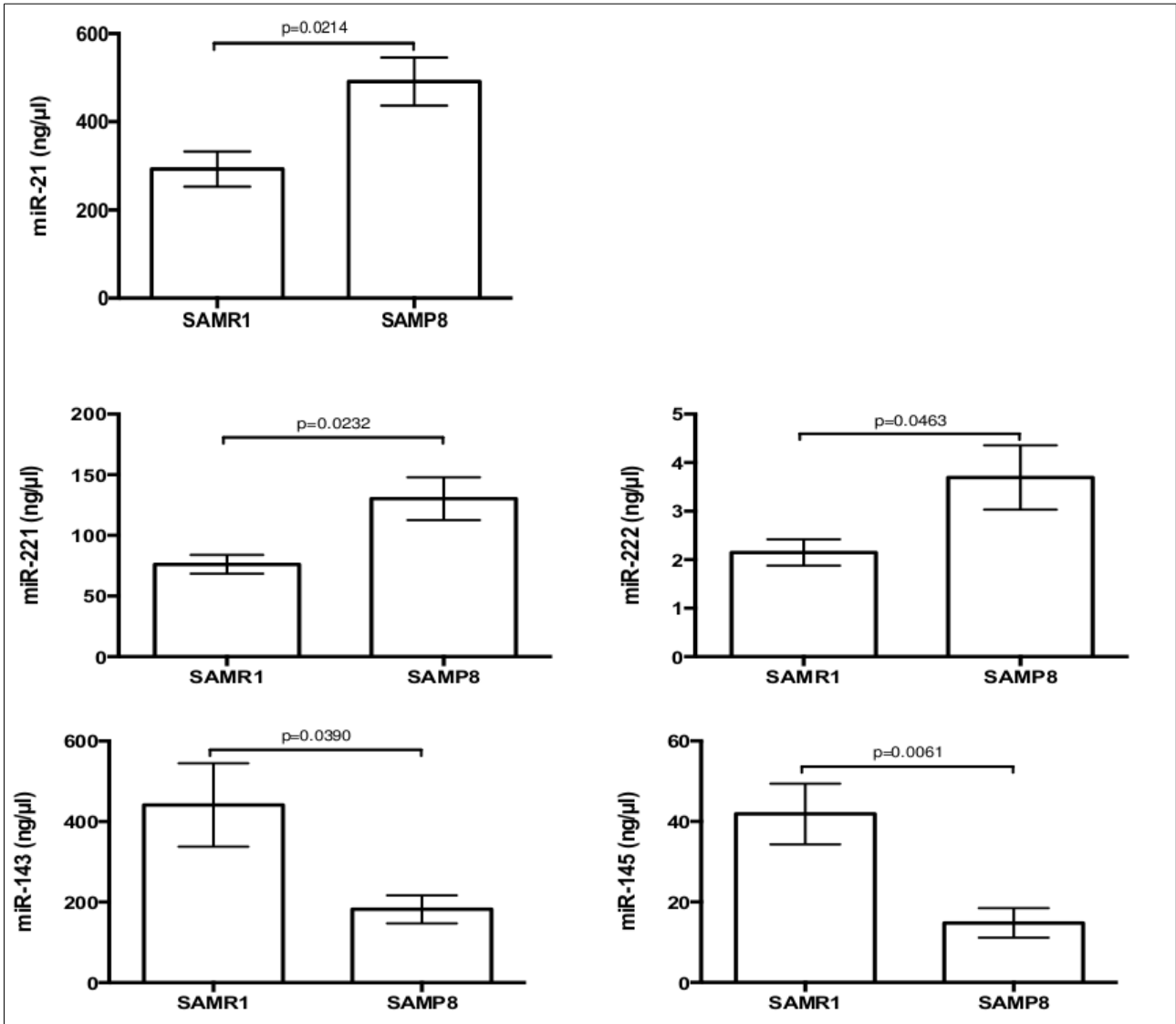


Figura 25. Diferencias en la expresión de miRs cuantificada en aortas de SAMR1 y SAMP8 de 7-8 meses por qRT-PCR. La concentración de miRs se estableció en una curva de calibración basada en cantidades conocidas de cDNA de células musculares lisas de ratón y expresado como número de copias por ng de ARN total normalizado por el valor de Ct del control endógeno (ARN nuclear U6). Se realizaron 6 réplicas para cada condición experimental. Los gráficos de barras representan la media y error estándar de la media. Los valores de P comparativos se muestran por encima de los gráficos de barras.

Con el objetivo de comprobar si las diferencias en los miRNA son capaces de regular la proliferación de la células musculares lisas en cultivo, se llevó a cabo un experimento de proliferación por incorporación de bromodeoxiuridina, incluyendo tratamiento con inhibidores de miRNA para miR-21, miR-221 y miR-222, o con los miR-143 y miR-145 (fig. 26). De estos tratamientos, el que generó diferencias fue el de antimir-21, mostrando una disminución significativa de la proliferación de las células musculares lisas procedentes de SAMP8 en comparación con las de SAMR1.

RESULTADOS

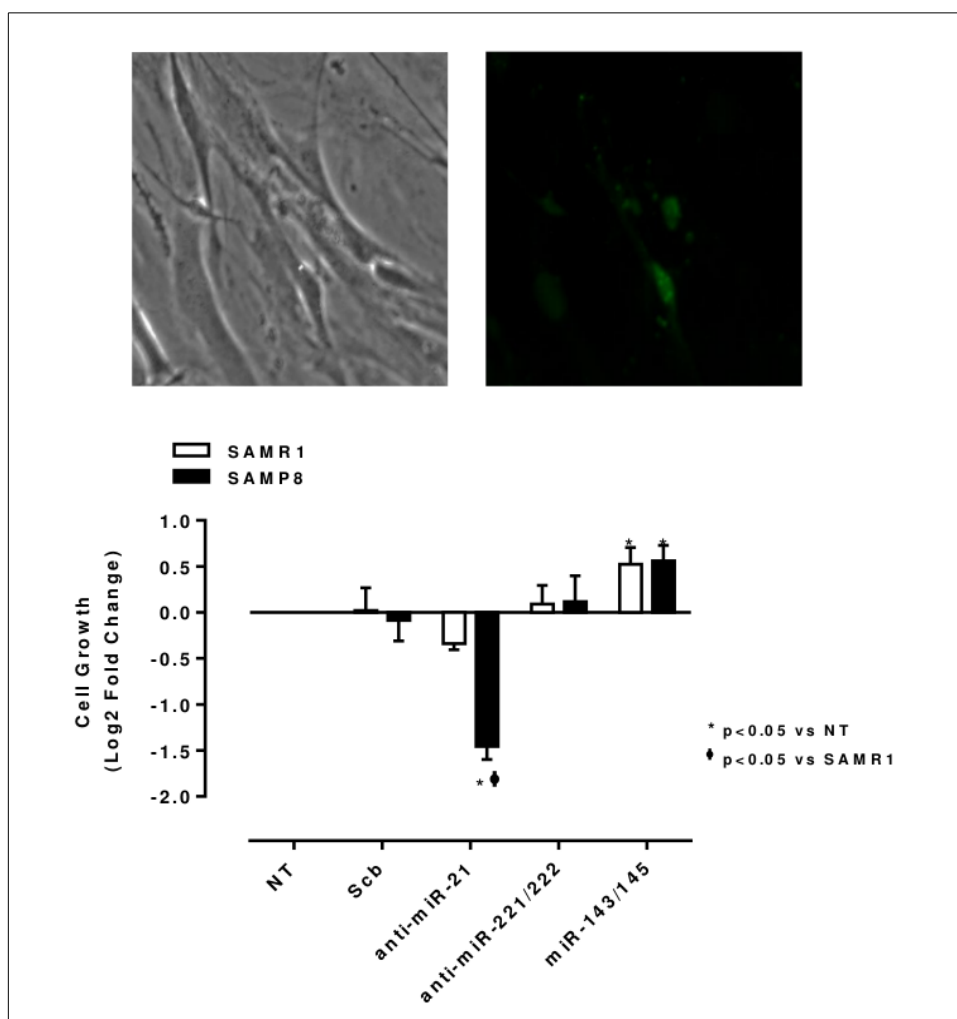


Figura 26. Cambios en la proliferación de las células musculares lisas de aorta de SAMR1 y SAMP8 de 7-8 meses después del tratamiento con mimético de miR o anti-miR. Las microfotografías muestran un ejemplo de transfección de células musculares lisas con miR marcado con FITC. Se sometió a las células a un tratamiento contra miR-21 y miR-221/222, así como un tratamiento con el mimético de los miR-143/145. Se ha tratado un grupo control de la transfección con una secuencia de miR aleatorios que no reconocen ningún miR endógeno (scramble – Scb). El tratamiento contra miR-21 es capaz de disminuir la capacidad de proliferación en SAMP8, mientras que el tratamiento con miR-143/145 incrementa la capacidad de proliferación tanto en SAMR1 como en SAMP8. El tratamiento contra miR-221/222 no muestra efecto alguno. Se realizaron 6 réplicas para cada condición experimental. Los gráficos de barras representan la media y error estándar de la media. * $p < 0.05$ en comparación con los valores de las células no tratadas (NT); $p < 0.05$ en comparación con las células de SAMR1.

9. El tratamiento local *in vivo* mediante anti-miR-21 reduce la hiperplasia en SAMP8.

Para comprobar si estos hallazgos se reflejaban *in vivo*, se llevó a cabo un tratamiento local mediante anti-miR-21, anti-miR-221, anti-miR-222, miR-143 o miR-145 en ratones tras haber llevado a cabo el mismo procedimiento de denudación femoral realizado con anterioridad (fig. 14).

Los ratones que recibieron el tratamiento con anti-miR-221 o anti-miR-222 mostraron una disminución en la hiperplasia posterior a la denudación femoral en SAMR1 así como en SAMP8. Sin embargo estos cambios no resultaron ser significativos.

RESULTADOS

Los animales que recibieron tratamiento con miR-143 o miR-145 mostraron un crecimiento exacerbado de la capa muscular de la arteria femoral en comparación con los controles, siendo que padecieron una mayor hiperplasia en respuesta a la denudación de la femoral tanto en el caso de ratones SAMR1 como SAMP8. Así como en el caso anterior, estos cambios tampoco resultaron ser significativos.

Por último, se llevó a cabo un tratamiento mediante anti-miR-21. Dicho tratamiento no produjo cambios en los ratones SAMR1, pero en ratones SAMP8 disminuyó de forma significativa la hiperplasia producida por la denudación.

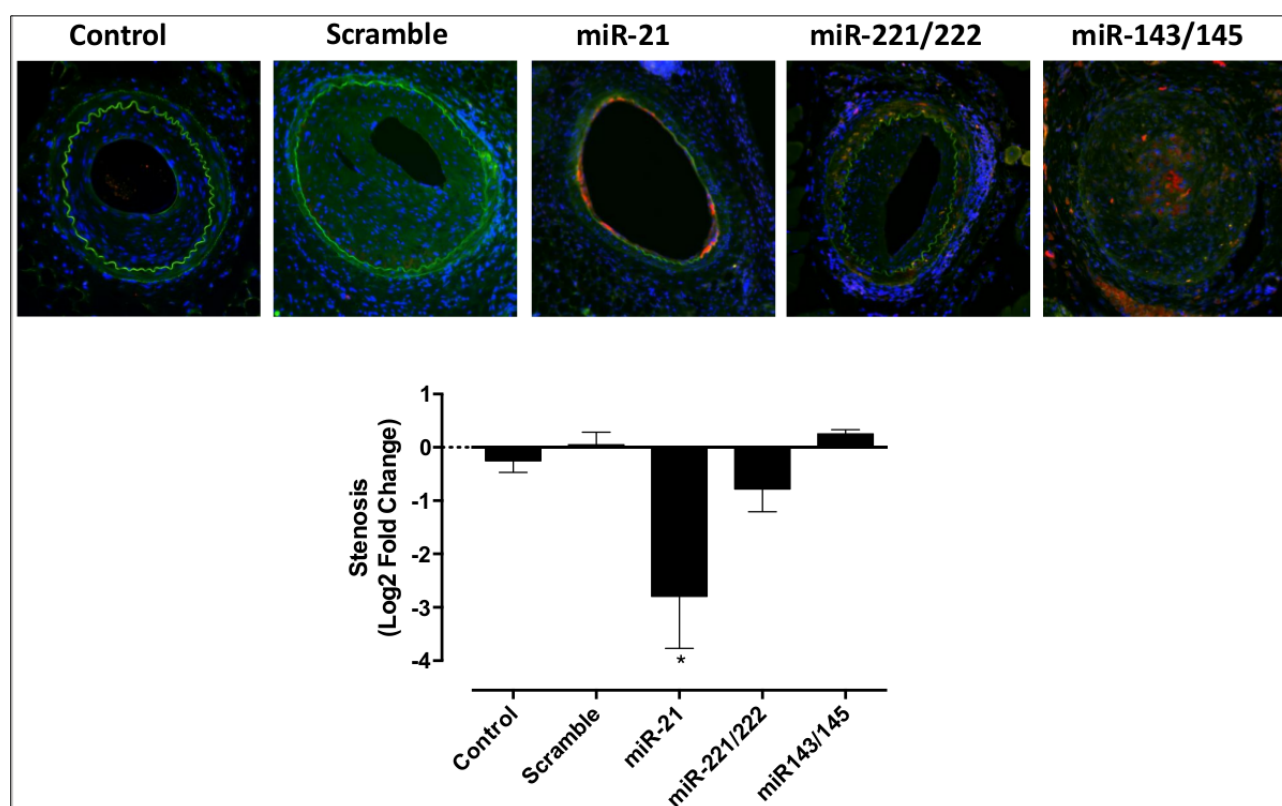


Figura 27. Cambios en la proliferación de las células musculares lisas de la arteria femoral de SAMR1 y SAMP8 a los 7-8 meses de edad tras una lesión después del tratamiento de la arteria con miméticos de miR o anti-miRs. Se llevaron a cabo tratamientos contra los miRs miR-21, miR-221/222 y miR-143/145. Se ha tratado un grupo control de la transfección con una secuencia de miR aleatorios que no reconocen ningún miR endógeno (scramble – Scb). Las fotografías muestran cortes transversales de la arteria femoral representativos de los que se utilizaron en la medición. En azul se muestran los núcleos, marcados con DAPI. En verde se muestran las láminas de elastina, detectadas por autofluorescencia. En rojo se encuentra marcada la localización del tratamiento con miR. Los miRs conjugados al FITC se han detectados con un anticuerpo primario anti-FITC y un anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor-594 (rojo). El gráfico muestra el cambio en la estenosis (disminución de la luz del vaso) en SAMP8 debidos a cada tratamiento. Se puede apreciar como el único tratamiento que produce cambios significativos es el tratamiento contra miR-21, disminuyendo la estenosis. Se realizaron 6 réplicas para cada condición experimental. Los gráficos de barras representan la media y error estándar de la media. * $p < 0,05$

SUBPROYECTO 2

La disfunción endotelial mediada por ciclooxigenasas durante el envejecimiento está regulada por angiotensina II de forma diferente en función del sexo.

1. En ratones CD1 no se producen cambios hormonales entre los 3 y los 12 meses de edad.

Para poder afirmar que no se dan cambios hormonales con el envejecimiento que afecten a los resultados en el modelo de estudio elegido, se llevó a cabo una medición de la cantidad de estradiol y testosterona en suero de ratones de 3 meses de edad y de 12 meses de edad (Tabla 4). Tanto en machos como en hembras, ni el estradiol ni la testosterona sufren cambios significativos al envejecer y por tanto se puede decir que las variaciones en los niveles hormonales no afectan a los cambios observados en cada sexo.

Tabla 4. Niveles de estradiol y testosterona en machos y hembras a los 3 y los 12 meses.

	Machos		Hembras	
	3 meses	12 meses	3 meses	12 meses
Estradiol	N.D.	N.D.-	22,1 ± 1,4 pg/mL	20,7 ± 1,7 pg/mL
Testosterona	4,5 ± 1,1 ng/mL	3,6 ± 1,9 ng/mL	0,11 ± 0,04 ng/mL	0,08 ± 0,03 ng/mL

Los valores expresan la media ± error estándar de la media. N.D. significa que los valores no eran detectables.

2. En ratones CD1 el peso se incrementa con la edad.

También se midió el cambio en el peso de los ratones (Tabla 5). En machos el peso se incrementó de forma significativa, y en hembras sucedió lo mismo. En ambas edades, tanto jóvenes como viejos, los machos siempre pesaban significativamente más que las hembras.

Cabe añadir que el tratamiento con Losartan no modificó el peso corporal en ningún caso, y que, una vez normalizado por el peso corporal, la cantidad de losartan consumido ha sido siempre la misma en todos los ratones, a razón de 0,6 g/L en el agua.

RESULTADOS

Tabla 5. Peso de machos y hembras a los 3, 7 y 12 meses de edad.

	Machos	Hembras
3 meses	38.4±0.96g (33)***	31.2±0.79g (33)
7 meses	45.0±0.82g (32)**	38.9±1.13g (34)
12 meses	53.9±1.10g (40) ***	47.8±1.39 (37) g
Losartan	49.9±0.93g (24)	41.7±0.99g (23)

El grupo de Losartan recibió tratamiento con este fármaco desde los 3 a los 12 meses. Los valores expresan la media ± error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el número de animales. * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** = p<0,001 en comparación con las hembras.

3. El envejecimiento y el Losartán ejercen un efecto sobre la presión arterial

Siendo el incremento de peso un factor de riesgo cardiovascular que incrementa el riesgo de sufrir hipertensión, se midió la presión arterial de los ratones (Tabla 6). Cuando se compararon los grupos sin tratamiento, no se encontraron diferencias en la presión arterial durante el envejecimiento ni en machos ni en hembras, sin embargo si que se vieron diferencias en los grupos tratados con Losartan de forma crónica de los 3 a los 12 meses de edad, cuya presión arterial disminuyó significativamente. Esto señaló la ruta metabólica de la angiotensina II como posible responsable de algunos de los cambios durante el envejecimiento en este modelo, de acuerdo con bibliografía citada previamente en la introducción, de modo que se evaluó su papel en la contracción aórtica mediante miografía.

Tabla 6. Presión arterial de machos y hembras a los 3 y los 12 meses de edad.

	Machos	Hembras
3 meses	51.5 ± 2.5 mmHg	49.9 ± 3.7 mmHg
12 meses	56.2 ± 2.6 mmHg	53.7 ± 3.0 mmHg
Losartan	45.6 ± 0.88 mmHg*	42.4.2 ± 2.6 mmHg*

El grupo de Losartan recibió tratamiento con este fármaco desde los 3 a los 12 meses. Los valores expresan la media ± error estándar de la media. * = p<0,05 en comparación con los animales no tratados.

4. El sexo influye en los cambios en la contractilidad de la aorta durante el envejecimiento.

Tanto la edad como el sexo son factores que afectan a los cambios en la pared vascular, que tienen como resultado diferencias en la capacidad contráctil de los vasos, tanto de forma activa como

pasiva. Mediante miografía de la aorta torácica, la despolarización causada por cloruro de potasio (100 nM) sin ningún otro estímulo, nos muestra que la capacidad de contracción completa de la aorta es significativamente mayor en machos que en hembras a todas las edades (fig. 28A). También nos muestra que la capacidad de contracción de este vaso incrementa de forma significativa con la edad tanto en machos como en hembras, aunque los machos siempre mantienen una mayor capacidad de contracción a pesar de este incremento general.

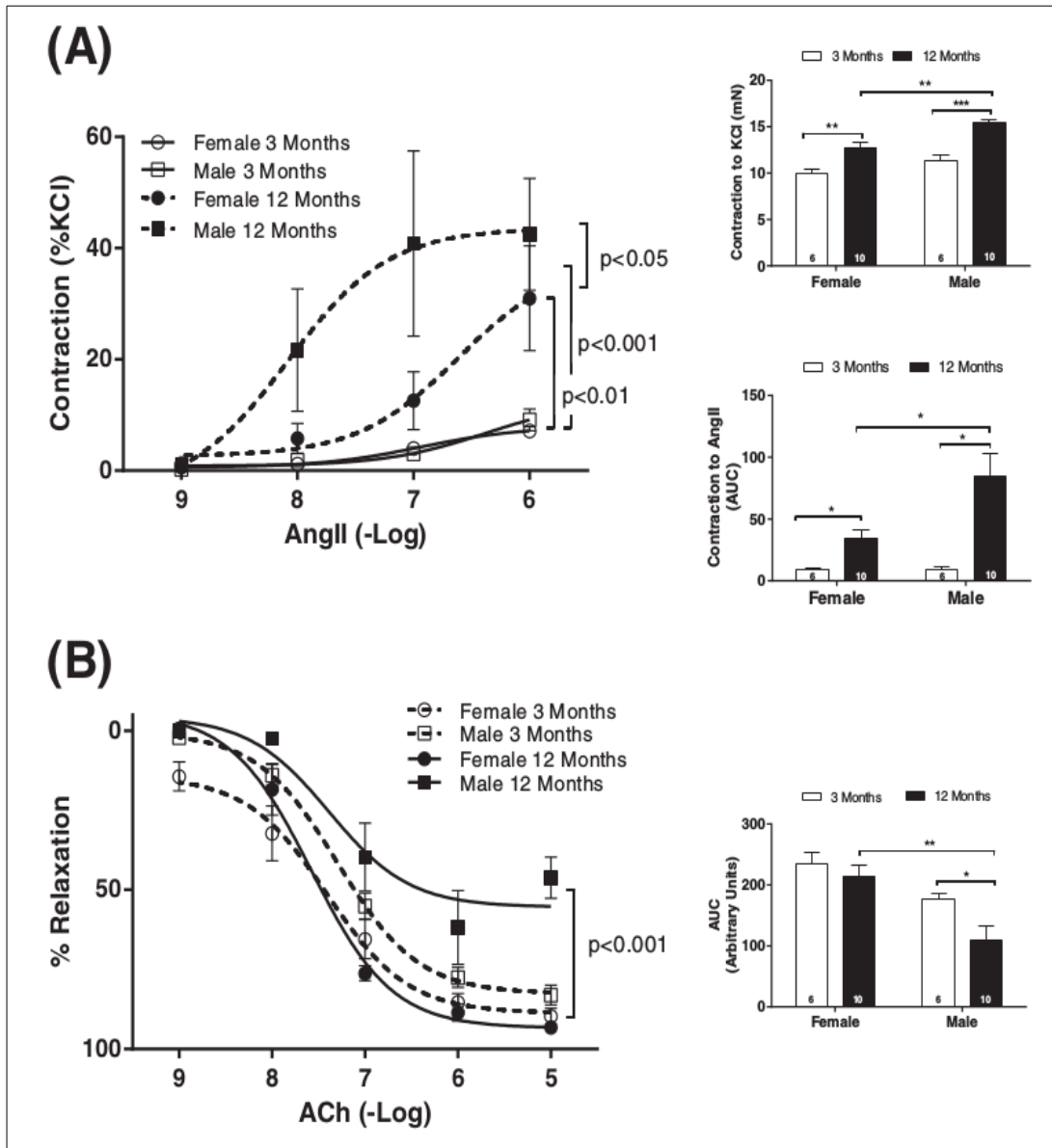


Figura 28. Influencia del sexo y la edad en la contracción inducida por AngII (A) y vasodilatación en respuesta a ACh (B) en aortas de ratones CD1. A) Los gráficos de barras representan la media \pm error estándar de la media de la contracción máxima inducida por 100 mM de KCl (arriba) y el área bajo la curva de las contracciones en respuesta a AngII (abajo). B) Los gráficos de barras representan la media \pm error estándar de la media del área bajo la curva de cada curva de concentración-respuesta individual. Se llevaron a cabo de 6 a 10 experimentos (se muestra en cada barra) para cada punto de cada curva. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

5. La contracción en respuesta a angionensina II incrementa con la edad y está influenciada por el sexo.

Para determinar el papel de posibles agonistas, se llevó a cabo una normalización mediante los resultados obtenidos con la contracción en respuesta a cloruro de potasio. Ésta respuesta es causada por la despolarización del músculo liso de la pared vascular independientemente de otras posibles variables y muestra la capacidad total de contracción del vaso.

La miografía que mide la respuesta normalizada causada por angionensina II (fig. 28A), mostró un incremento de la contracción tanto en machos como en hembras comparando los ratones de 3 meses de edad con los de 12 meses de edad, aunque este incremento fué significativamente mayor en machos, siendo que los machos de 12 meses de edad muestran de forma significativa una mayor contracción en respuesta a angionensina II que las hembras de su misma edad.

6. Las hembras mantienen una mayor capacidad de relajación de la aorta incluso a los 12 meses.

Para medir el papel del endotelio en la relajación de estas aortas, se las sometió a una precontracción en respuesta a fenilefrina (como control positivo de contracción en la aorta), y se llevó a cabo una posterior relajación en respuesta a acetilcolina (fig. 28B), que produce una relajación del vaso dependiente de endotelio. Esto mostró que, a los 3 meses de edad, no existen diferencias entre machos y hembras, pero a los 12 meses de edad los machos pierden mucha capacidad de relajación en la aorta, siendo significativamente menor que la de las hembras de su misma edad.

Para asegurarnos de que se trataba de una respuesta vinculada al endotelio, se llevó a cabo la misma prueba utilizando nitroprusiato en lugar de fenilefrina, que actúa como donador de óxido nítrico y por tanto lleva cabo una relajación del vaso independiente del endotelio. Esta prueba no mostró diferencia alguna entre grupos, demostrando el papel del endotelio en las diferencias encontradas en la relajación de la aorta.

7. A los 12 meses, los machos presentan evidencias de disfunción endotelial.

De forma interesante se encontró que, en machos de 12 meses, había una respuesta bifásica a la acetilcolina, siendo que producía una relajación a bajas concentraciones, mientras que producía una contracción a altas concentraciones. Esto es una respuesta propia de un endotelio disfuncional.

8. A los 12 meses el receptor de angiotensina II AT2 disminuye solamente en machos, sin embargo esto es prevenido por el tratamiento con Losartan.

Para determinar el papel de las diferentes rutas metabólicas que podían ser responsables de los cambios y diferencias observados, se midió la cantidad de RNA mensajero de receptores de angiotensina II en la pared vascular (fig. 29).

La traducción del RNA mensajero del receptor de angiotensina 1 no varía con la edad ni con el tratamiento crónico de Losartan, mientras que la del receptor de angiotensina 2 disminuye de forma significativa en machos de 12 meses cuando los comparamos con los machos de 3 meses. Este cambio es prevenido mediante el tratamiento crónico con Losartan. Por otro lado, la enzima convertidora de angiotensina no muestra cambios con la edad ni con el tratamiento crónico de Losartan. Estos resultados sugieren que un cambio en la proporción de receptores de la vía de la angiotensina puede ser responsable de las diferencias observadas previamente.

Para obtener un mayor detalle de las rutas metabólicas implicadas en los cambios

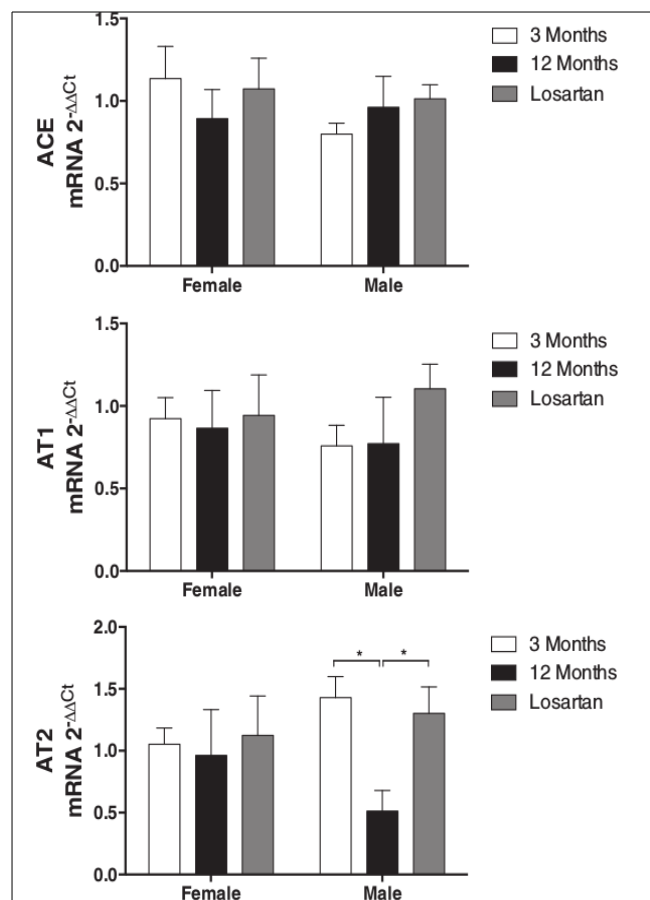


Figura 29. Expresión de los ARN mensajeros de componentes clave del SRA: 1) Enzima convertidora de Ang (ACE), 2) receptor de AngII del tipo 1 (AT1) y 3) receptor de AngII del tipo 2 (AT2) en aorta de ratón CD1. Se llevó a cabo una normalización mediante la expresión de la subunidad ribosomal 18S como control endógeno. Los datos representan la media ± error estándar de la media de 6 a 8 experimentos independientes en ratones de 3 a 12 meses de edad y ratones de 12 meses de edad a los que se administró un tratamiento con Losartan de los 3 a los 12 meses de edad. * = p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** = p<0,001

observados, se llevó a cabo miografías en que se inhibieron la vías del óxido nítrico y de las ciclooxigenasas.

9. La sintasa de óxido nítrico es fundamental en la relajación de la aorta.

La inhibición de la sintasa de óxido nítrico mediante L-nitroarginin metil éster (L-NAME) frustró la relajación en respuesta a acetilcolina en todos los grupos, por tanto la sintasa de óxido nítrico tiene un papel fundamental independientemente del sexo y la edad en la relajación de la aorta (fig. 32A).

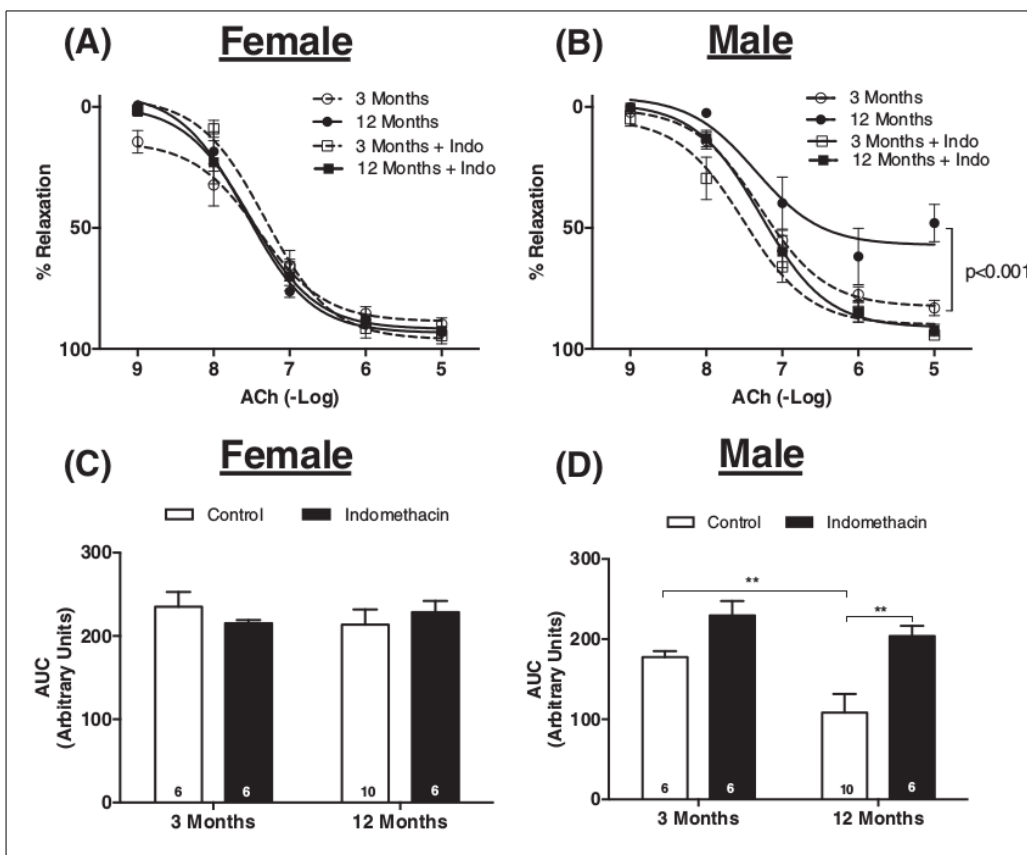


Figura 30. Rol de las COX en la relajación inducida por ACh. Se muestran las curvas de concentración-efecto en aortas de hembras (A) y machos (B) de ratones CD1. Las aortas se trataron con 10 μ M de Indometacina (inhibidor no selectivo de COX). Las gráficas de barras muestran la media \pm error estándar de la media del área bajo la curva en hembras (C) y machos (D). Se llevaron a cabo de 6 a 10 experimentos individuales para cada experimento, tal como se muestra en cada barra. * = $p < 0,05$

10. La inhibición de las ciclooxigenasas mejora la vasodilatación en machos de 12 meses.

La inhibición de las ciclooxigenasas mediante indometacina (fig. 30) no mejora la vasodilatación respuesta a acetilcolina en hembras a ninguna edad (fig. 30A y 30C), pero si que lo hace en machos de 12 meses, siendo esta una diferencia dependiente del sexo con el envejecimiento (fig. 30B y 30D).

11. La vía de la angiotensina es responsable de la peor relajación de los machos a los 12 meses.

Para medir la contribución de los cambios observados en la vía de la angiotensina II se realizó una prueba de relajación en respuesta a acetilcolina de nuevo en animales tratados de forma crónica con Losartan (fig. 31). El tratamiento no afectó a la relajación en hembras de ninguna edad (fig. 31A), pero si que fue capaz de prevenir los efectos vistos en los machos de 12 meses (fig. 31B), siendo así que el tratamiento con Losartan hizo que los machos tratados desde los 3 a los 12 meses tuvieron la misma respuesta que los machos de 3 meses. Por tanto, este resultado muestra otra diferencia en el envejecimiento vinculada al sexo.

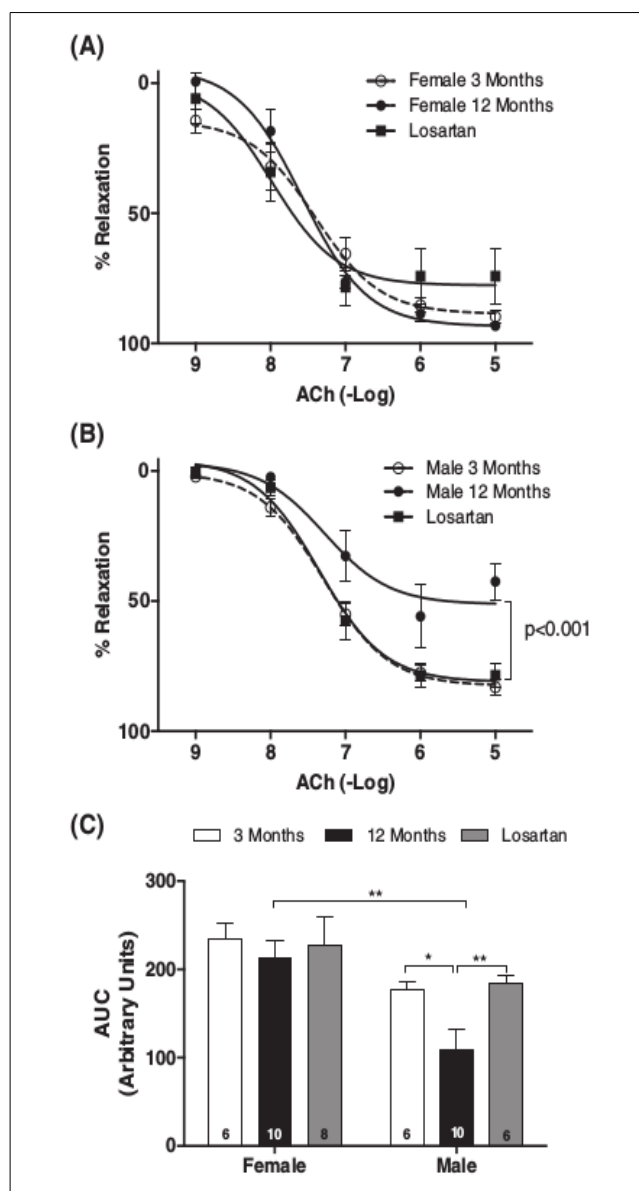


Figura 31. Papel de la AngII en la vasodilatación en respuesta a ACh. Se muestra la relajación en respuesta a ACh en aortas de hembras (A) y machos (B) de ratones CD1 sin tratar y de ratones que han recibido un tratamiento profiláctico con Losartan. Las gráficas de barras muestran la media \pm error estándar de la media del área bajo la curva (C). Se llevaron a cabo de 6 a 10 experimentos individuales para cada experimento, tal como se muestra en cada barra. * = $p < 0,05$

RESULTADOS

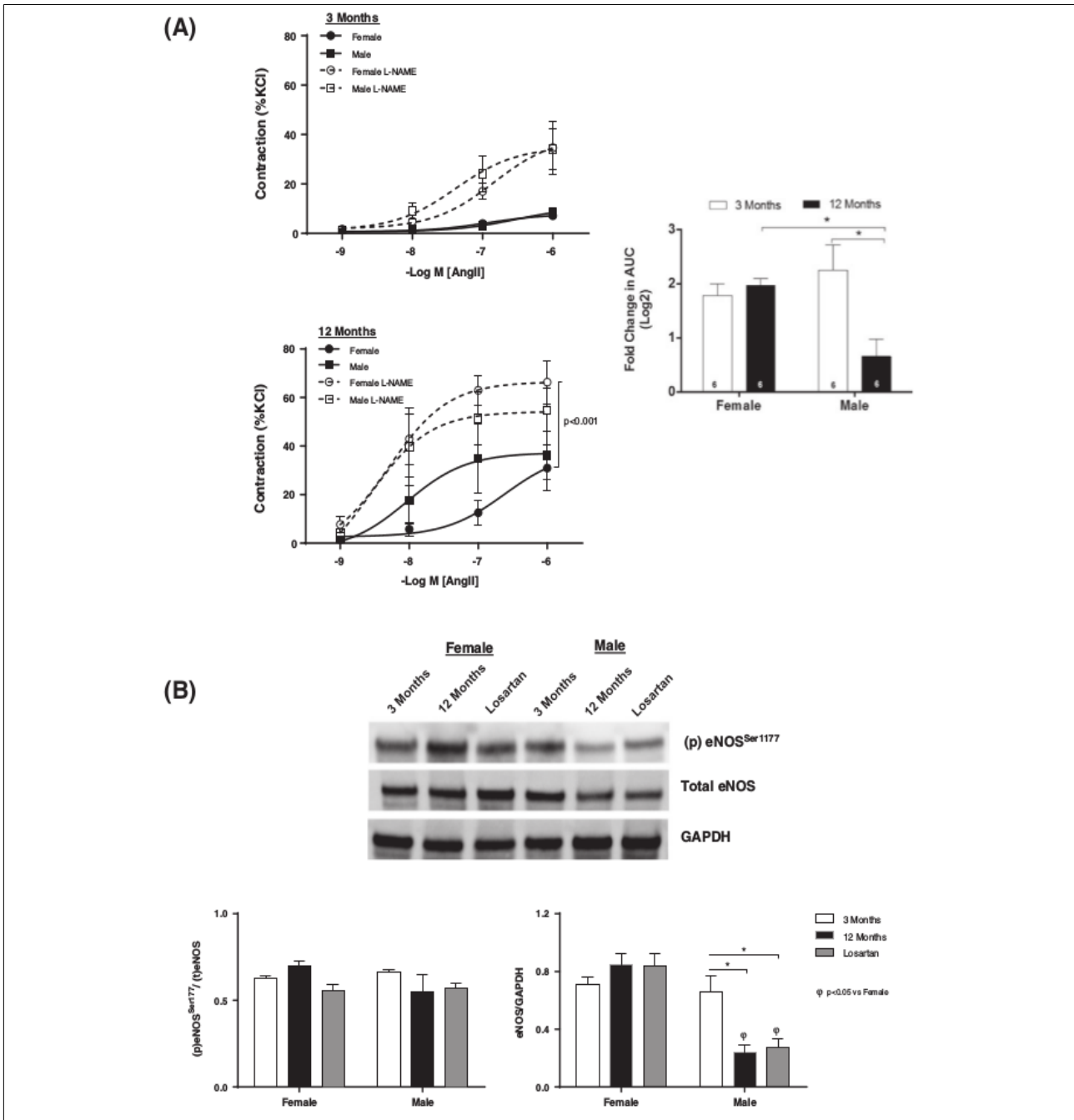


Figura 32. Rol de la NOS en las contracciones inducidas por la AngII. Se evaluó el papel de la NOS mediante el tratamiento con su inhibidor L-NAME (100 μ M). **A)** Curvas de concentración-respuesta a AngII. Las gráficas de barras representan la media \pm el error estándar de la media del área bajo la curva tras el tratamiento con L-NAME. **B)** Análisis por *Western Blot* para medir la expresión de eNOS (derecha) y su estado de fosforilación en la Serina 1177 (izquierda). Se llevaron a cabo de 6 a 10 experimentos individuales para cada experimento. * = p<0,05

12. El óxido nítrico tiene menos actividad vasorelajadora en machos de 12 meses.

Al tener la edad un efecto negativo en la producción de óxido nítrico en la vasculatura, se llevó a cabo una miografía para averiguar el papel del óxido nítrico en la contracción en respuesta a angiotensina II (fig. 32A).

El inhibidor de la producción de óxido nítrico L-NAME es capaz de incrementar la capacidad contráctil en respuesta a angiotensina II tanto en machos como en hembras. Sin embargo, este incremento fue menor en machos de 12 meses que en el resto de grupos, indicando que el óxido nítrico tiene un papel menos importante en machos envejecidos. Por tanto, la actividad vasorelajadora del óxido nítrico se da menos en machos envejecidos que en el resto de grupos.

13. Los machos de 12 meses expresan menos eNOS.

El descubrimiento anterior muestra otra diferencia en el envejecimiento vinculada al sexo, y para averiguar más sobre ello se llevó a cabo una medición de la cantidad de óxido nítrico sintasa endotelial en la pared del vaso (fig. 32B). Este experimento mostró que la expresión de esta proteína disminuye en machos de 12 meses, mientras que en el resto de grupos se mantiene estable, en concordancia con los resultados anteriores.

También se realizó una medición de la cantidad de sintasa de óxido nítrico endotelial fosforilada, esto es, activa (fig. 32B). El resultado muestra que la proporción de proteína fosforilada con respecto a la total se mantiene igual en todos los grupos, sugiriendo que las diferencias encontradas se deben a diferencias en la expresión de esta enzima más que en su activación. Curiosamente, el tratamiento crónico con Losartan no es capaz de prevenir este cambio en la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (fig. 32B).

14. La vía de la angiotensina II causa una mayor activación de COX1 y COX2 en machos de doce meses.

Las alteraciones en la expresión y actividad de ciclooxigenasas también se han vinculado al proceso de envejecimiento vascular, por lo que se midió su expresión y actividad en las aortas estudiadas.

RESULTADOS

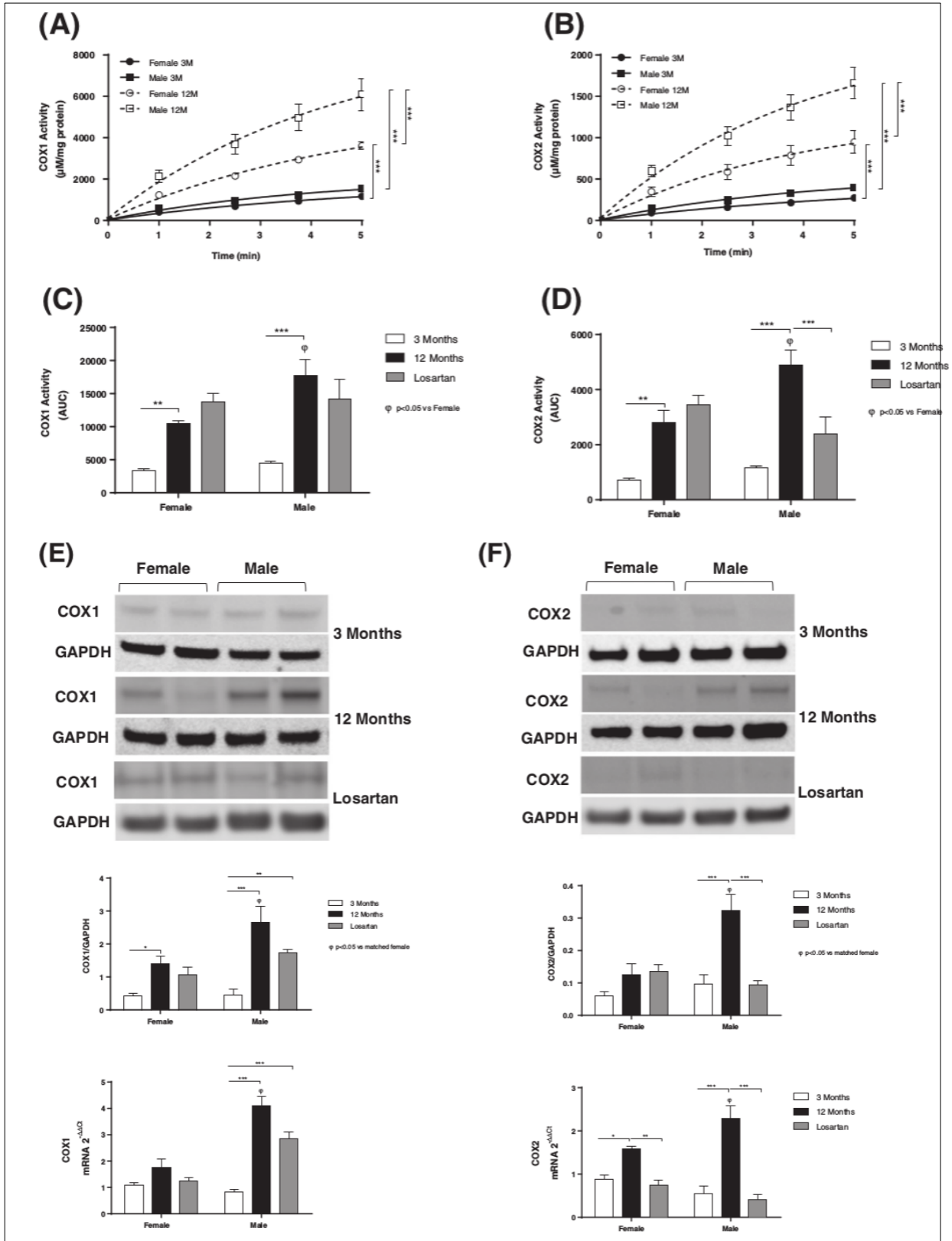


Figura 33. Influencia del sexo, la edad y la AngII en la actividad y expresión de las COX en aorta. **A)** Seguimiento de la actividad de la COX1 durante el tiempo; **B)** Seguimiento de la actividad de la COX2 durante el tiempo. Las gráficas de barras muestran la media \pm error estándar de la media del área bajo la curva para la actividad de COX1 **(C)** y de COX2 **(D)**. **E)** Expresión de proteína y ARN mensajero de COX1; **F)** Expresión de proteína y ARN mensajero de COX2; los valores se normalizaron utilizando GAPDH como control endógeno para la proteína y la subunidad ribosomal 18S para el ARN mensajero. Se llevaron a cabo de 6 a 10 experimentos individuales para cada experimento. * = $p < 0,05$

Se descubrió que la edad incrementa la actividad de la ciclooxigenasa 1 y 2 tanto en machos como en hembras (fig.33A-D). Por otro lado, la actividad de estas enzimas muestra diferencias entre machos y hembras con el envejecimiento. Así, los machos de 12 meses muestran el doble de actividad de ambas ciclooxigenasas cuando lo comparamos con las hembras de la misma edad. Esta diferencia en el incremento de actividad hace más importante las pequeñas diferencias encontradas entre machos y hembras en el incremento de la expresión de las ciclooxigenasas (fig. 33E y 33F), pues si tanto machos como hembras muestran un incremento en su expresión, los machos muestran una mayor expresión a los 12 meses. En todos los casos el tratamiento crónico con Losartan es capaz de prevenir estos cambios, sugiriendo que se encuentran vinculados a la vía de la angiotensina II. La capacidad del Losartan de prevenir estos cambios se ve de forma significativa en todos los casos, excepto en la ciclooxigenasa 1 en los machos, cuya disminución en expresión y actividad gracias al tratamiento con Losartan es tan solo una tendencia.

También se midió la cantidad de las enzimas PGI2 sintasa y TXA2 sintasa, no encontrándose cambios en ningún caso.

15. El estímulo mediante acetilcolina incrementa las prostaglandinas vasodilatadoras en hembras y vasoconstrictoras en machos.

Se midió también la cantidad de diversas prostaciclina y tromboxanos (Tabla 7). Se encontró que, tras el estímulo con acetilcolina en aortas de hembras de 12 meses el incremento de la actividad y expresión de las ciclooxigenasas favorece un incremento de la prostaglandina PGI2 con actividad vasodilatadora sobre las prostaglandinas y tromboxanos vasoconstrictores $\text{PGF2}\alpha$ y TXA2. Sin embargo en machos este caso no se da, y no hay cambios en PGI2 ni en TXA2, mientras que incrementa la cantidad de prostaglandina vasoconstrictora $\text{PGF2}\alpha$.

Tabla 7. Niveles de prostanoïdes después de la curva de concentración-efecto a la ACh.

pg/mL	Machos			Hembras		
	<i>3 meses</i>	<i>12 meses</i>	<i>Losartan</i>	<i>3 meses</i>	<i>12 meses</i>	<i>Losartan</i>
6-keto PGF-1 α	512,0 \pm 144,5	611,4 \pm 63,4	111,6 \pm 116,6 ^z	552,8 \pm 120,4	1062,9 \pm 81,2*	904 \pm 97,6
TXB2	11,05 \pm 1,16	12,36 \pm 0,89	12,12 \pm 0,98	7,82 \pm 1,44	8,72 \pm 1,42	7,72 \pm 1,84
PGF2 α	651,5 \pm 53,9	883,5 \pm 72,2*	356,9 \pm 36,4*	681,9 \pm 105,5	532,0 \pm 75,9	484,4 \pm 49,1

Los valores representan la media \pm el error estándar. *p<0,05 contra ratones de 3 meses del mismo sexo. α p<0,05 contra ratones de 12 meses del mismo sexo.

16. La vía de la angiotensina II actúa de forma diferente en machos y hembras durante el envejecimiento y es responsable de los efectos perjudiciales observados en machos.

En células vasculares, se sabe que las ciclooxigenasas son un medidor de daño vascular por parte de angiotensina II, así pues, se llevó a cabo las mismas mediciones para productos de ciclooxigenasas en los animales que recibieron tratamiento crónico con Losartan (Tabla 7).

El tratamiento con Losartan mostró un incremento de la prostaglandina vasodilatadora PGI₂ tras el estímulo con acetilcolina con respecto a los machos de 12 meses, equiparando estos resultados a los resultados encontrados en hembras de 12 meses. También se encontró una disminución de la prostaciclina vasoconstrictora PGF_{2 α} . No se encontraron cambios en las hembras, sugiriendo una diferencia entre machos y hembras en la vía de la angiotensina II durante el envejecimiento.

SUBPROYECTO 3

Diferencias asociadas al sexo en el remodelado durante el envejecimiento vascular: el rol del sistema
renina-angiotensina

1. Al envejecer, la aorta sufre una hiperplasia causada por la vía de la angiotensina II que se da a diferente ritmo en machos y hembras.

Tras encontrar estos cambios causados por el envejecimiento en la fisiología de la aorta, quisimos averiguar si se correspondían con cambios en su anatomía.

Se descubrió que la aorta se vuelve más gruesa con la edad, tanto en machos como en hembras. A los 3 meses machos y hembras presentan un grosor similar, sin embargo en los machos la aorta incrementa su grosor antes, ya que a los 7 meses ya tienen una aorta del mismo grosor que a los 12 meses, mientras que las hembras sufren este proceso de forma más gradual, siendo que presentan aortas de grosor intermedio entre los 3 y los 12 meses a los 7 meses, y no alcanzan el nivel de los machos hasta los 12 meses (fig. 34A y 34B).

El tratamiento con Losartan previene el proceso de engrosamiento de la aorta tanto en machos como en hembras, permanienciendo esta del mismo tamaño que a los 3 meses a la edad de 12 meses tras 9 meses de tratamiento (fig. 34D)

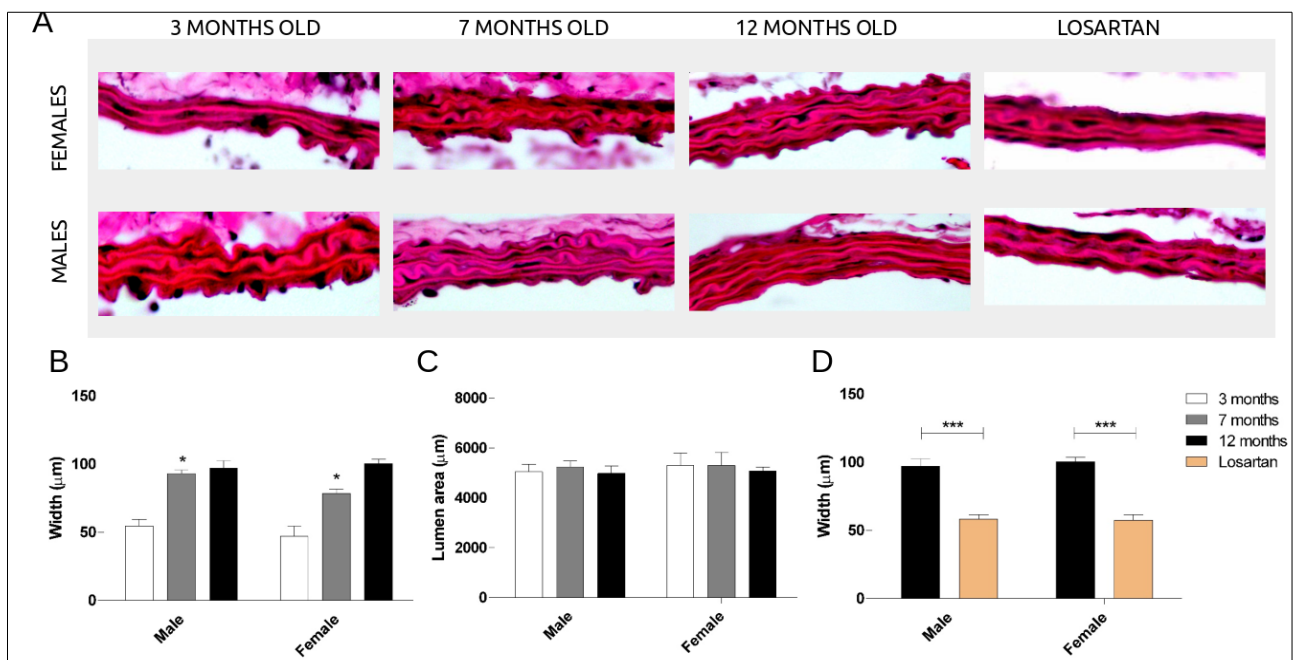


Figura 34. A) Microfotografías de cortes transversales de la pared de la aorta teñidas mediante hematoxilina-eosina y representativas de cada grupo. Se evaluaron ratones CD1 de 3, 7 y 12 meses, así como ratones a los que se administró Losartan de los 3 a los 12 meses de edad. B) Grosor de la pared de la aorta obtenido a partir de la medición de su perímetro interno y externo. C) Área de la luz de la aorta obtenida a partir de la medición del perímetro interno de la pared de la aorta D) Efecto del tratamiento crónico con Losartan en el grosor de la pared de la aorta. Se llevaron a cabo de 6 a 10 mediciones individuales en cada caso. Las gráficas de barras muestran la media \pm error estándar de la media * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

RESULTADOS

Cabe mencionar que esta hiperplasia de la pared de la aorta se produce por un crecimiento de la capa intermedia hacia afuera de la luz del vaso, pues el área de la luz del vaso permanece invariable a todas las edades (fig. 34C).

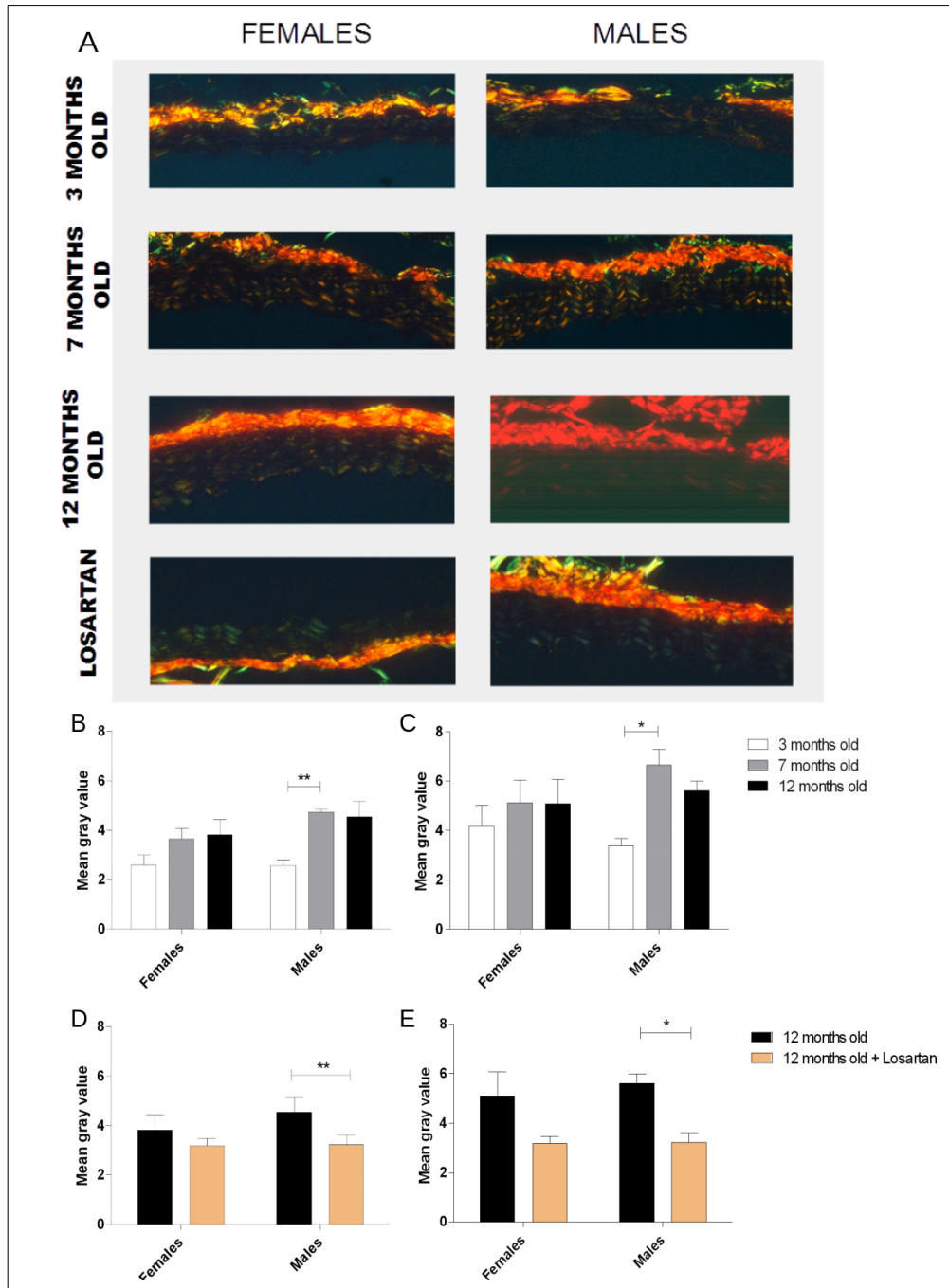


Figura 35. A) Microfotografías bajo luz polarizada de cortes transversales de la pared de la aorta teñidas mediante rojo picosirio y representativas de cada grupo. Se evaluaron ratones CD1 de 3, 7 y 12 meses, así como ratones a los que se administró Losartan de los 3 a los 12 meses de edad. Cuantificación de colágeno maduro (B) y de nueva formación (C) en la pared de la aorta. Efecto del Losartan en la cantidad de colágeno maduro (D) y de nueva formación (E) en la pared de la aorta. Se llevaron a cabo de 6 a 10 mediciones individuales en cada caso. Los valores utilizados (Mean Gray Value) son arbitrarios. Las gráficas de barras muestran la media \pm error estándar de la media * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

2. Existe un mismo patrón para la fibrosis en la aorta durante el envejecimiento.

Tras descubrir estos patrones de hiperplasia en la aorta, diferentes en machos y hembras, quisimos ver si existe algún proceso de fibrosis en la aorta que relacionado con ello. Por tanto se midió la cantidad de colágeno, tanto de nueva formación como colágeno ya consolidado, en las aortas de machos y hembras a diferentes edades (fig. 35A).

Esto mostró que, partiendo ambos sexos de un nivel similar a los 3 meses, los machos presentan un incremento significativo de la fibrosis ya a los 7 meses y que permanecen iguales a los 12 meses. Por otro lado, las hembras solo muestran una tendencia no significativa de incremento de la cantidad de fibras de colágeno en la aorta. Esto se reproduce tanto en fibras de colágeno de nueva formación como en las ya consolidadas. (fig. 35B y 35C).

El tratamiento crónico con Losartan previene los cambios antes mencionados, permaneciendo las aortas de los animales tratados de forma crónica con una cantidad de fibra de colágeno similar a la que se encuentra a los 3 meses (fig. 35D y 35E).

Así pues, tanto la hiperplasia como la acumulación de fibra de colágeno en la aorta siguen el mismo patrón de envejecimiento dependiente del sexo, en el cual los machos sufren estos cambios de forma brusca y temprana, mientras las hembras los sufren de forma gradual y más tardía. Además se puede decir que estos cambios están causados por la vía de la angiotensina II, pues el bloqueo de los receptores de angiotensina II previene estos cambios.

3. El estrés oxidativo incrementa con la edad de forma independiente a la vía de la angiotensina II, pero con un ritmo diferente en machos y hembras.

Siendo la vía de la angiotensina II una ruta metabólica implicada en la producción del estrés oxidativo, quisimos ver si las diferencias encontradas en esta vía tanto, anatómicas como fisiológicas, también se corresponden a diferencias en el estrés oxidativo de la aorta.

Se midió el nivel de estrés oxidativo de la aorta a diferentes edades en machos y hembras (fig. 36A), y se encontró el mismo patrón asociado al envejecimiento y dependiente del sexo visto en resultados anteriores. A los 3 meses machos y hembras tienen un nivel similar de estrés oxidativo, pero los machos sufren un brusco incremento del nivel de estrés oxidativo a los 7 meses y este se mantiene estable a los 12 meses, mientras que las hembras no sufren un incremento de estrés oxidativo en la aorta hasta los 12 meses (fig. 36C).

RESULTADOS

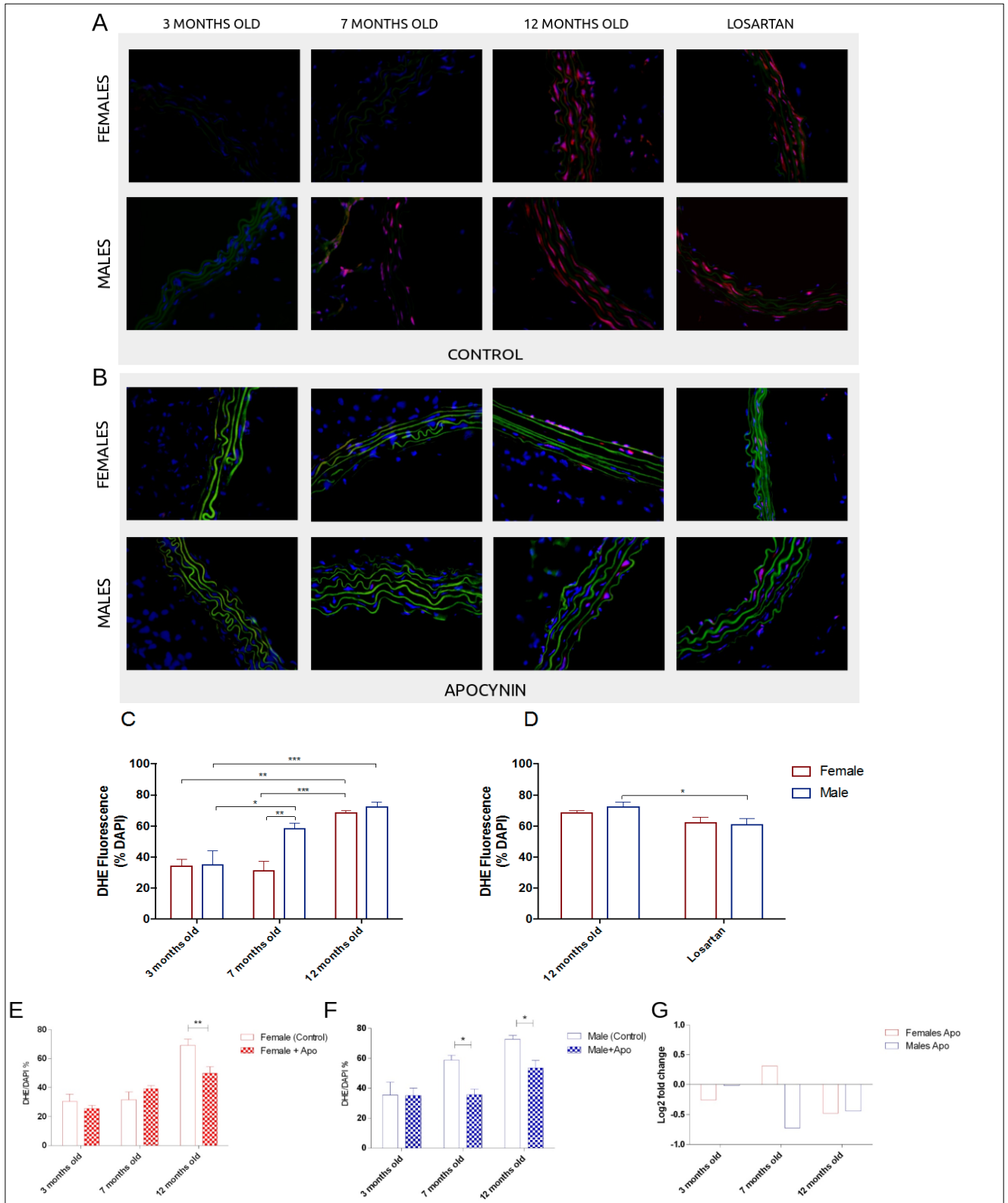


Figura 36. A) Microfotografías de cortes transversales de la pared de la aorta representativas de cada grupo. Se evaluaron ratones CD1 de 3, 7 y 12 meses, así como ratones a los que se administró Losartan. B) Medición del estrés oxidativo en pared de aorta en la que se ha inhibido la NADPHox mediante el tratamiento con Apocinina. C) Las gráficas de barras muestran la cuantificación del estrés oxidativo en ratones machos y hembras de 3, 7 y 12 meses de edad. D) Efecto del tratamiento crónico con Losartan en el estrés oxidativo. Efecto de la inhibición de la NADPHox mediante la Apocinina en el estrés oxidativo en aorta de hembras (E) y de machos (F), respectivamente. G) Proporción del cambio del estrés oxidativo a causa de la inhibición de la NADPHox. Se llevaron a cabo 6-10 experimentos. Las gráficas de barras muestran la media \pm error estándar de la media * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Sorprendentemente, el tratamiento con Losartan no previene estos cambios asociados al envejecimiento, por lo que este resultado sugiere que a vía de la angiotensina II no es la responsable de estos resultados, a pesar de la similitud del patrón observado (fig. 36D).

4. La NAD(P)H oxidasa es la enzima responsable de producir el incremento de estrés oxidativo durante el envejecimiento.

A la luz de los resultados anteriores, quisimos averiguar que ruta metabólica está implicada en los cambios observados en el estrés oxidativo, de modo que llevamos a cabo una inhibición de la enzima NAD(P)H oxidasa mediante Apocinina para ver si esto modificaba la producción de óxido nítrico en la aorta a diferentes edades (fig. 36B).

El resultado de este experimento muestra que la inhibición de la NAD(P)H oxidasa de forma aguda es capaz de revertir la capacidad de la aorta de producir estrés oxidativo a niveles equivalentes a los encontrados en animales de 3 meses, tanto en machos como en hembras a todas las edades (fig. 36E y 36F). Así, en machos de 7 meses se revierte el incremento significativo que se encontró previamente, mientras que en hembras no se da el caso, pues no hay incremento a esta edad y los niveles de estrés oxidativo permanecen invariables. Lo mismo sucede a los 12 meses, edad a la que tanto machos como hembras muestran un significativo incremento del estrés oxidativo cuando los comparamos con animales de 3 meses del mismo sexo. El tratamiento agudo con Apocinina logra que a los 12 meses, tanto machos como hembras, reduzcan los niveles de estrés oxidativo producido por la aorta a niveles similares a los encontrados a los 3 meses de edad.

5. El TNF α no es responsable directo del patrón de actividad de la NAD(P)H oxidasa.

Siendo la enzima NAD(P)H oxidasa la responsable de los cambios observados en la producción de estrés oxidativo a diferentes edades, incluyendo las diferencias encontradas entre machos y hembras, quisimos averiguar mediante qué vía metabólica se lleva a cambio este cambio en la enzima NAD(P)H oxidasa.

Por ello se repitió el mismo experimento, esta vez llevando a cabo una inhibición aguda de TNF α (fig. 37B).

Sorprendentemente, la inhibición aguda de TNF α solamente disminuye la producción de estrés oxidativo en la aorta a los 7 meses en machos, permaneciendo el resto de grupos igual a los controles (fig. 37C y 37D).

Así pues, quisimos averiguar si los niveles de traducción y transcripción de TNF α varían con la edad en machos y hembras, pues un cambio continuado en el tiempo podría explicar los cambios mejor que la información que obtuvimos mediante inhibición aguda.

Midiendo la cantidad de ARN mensajero de TNF α , no se detectaron diferencias entre sexo, pero se vio una tendencia a incrementar la transcripción de TNF α con el envejecimiento (fig. 37F).

Si que se detectaron diferencias en la expresión de TNF α en la pared arterial, teniendo estas diferencias el mismo patrón de cambio observado en la producción de estrés oxidativo en la aorta, lo que sugiere que TNF α está implicada en este proceso (fig. 37G).

La expresión de TNF α se incrementa con la edad en ambos sexos, pero en machos este incremento es más temprano, siendo significativo a los 7 meses y permaneciendo igual a los 12 meses, mientras en hembras este incremento significativo se produce más tardíamente, a los 12 meses, cuando alcanzan el nivel de expresión de TNF α de los machos.

Para dilucidar el contexto metabólico de estos cambios y encontrar una explicación coherente que los explicase, llevamos a cabo un estudio exhaustivo de diversas vías metabólicas que se sabe que están relacionadas con la proliferación, la producción de estrés oxidativo y con TNF α .

RESULTADOS

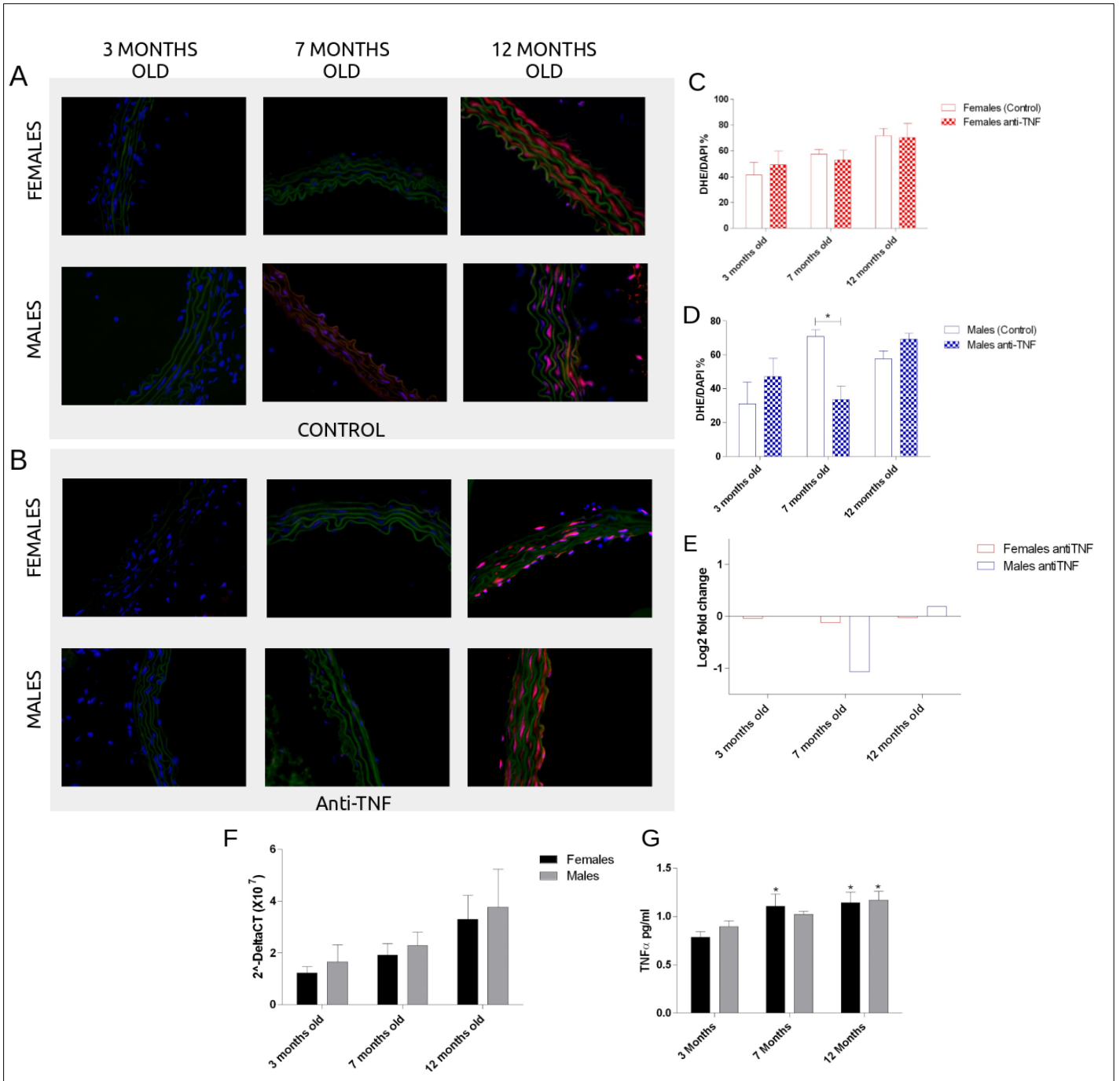


Figura 37. Medición del estrés oxidativo en cortes transversales de pared de aorta. **A)** Microfotografías de cortes transversales de la pared de la aorta representativas de cada grupo. Se evaluaron ratones CD1 de 3, 7 y 12 meses, así como ratones a los que se administró Losartan de los 3 a los 12 meses de edad. **B)** Medición del estrés oxidativo en cortes transversales de pared de aorta en la que se ha inhibido la TNF α mediante el tratamiento con R-7050. Efecto de la inhibición de la TNF α en el estrés oxidativo en corte transversal de aorta de hembras **(C)** y de machos **(D)**, respectivamente. **E)** Proporción del cambio (en logaritmo de base 2) del estrés oxidativo a causa de la inhibición de TNF α . **F)** Cuantificación del ARN mensajero de TNF α en aorta; **G)** Cuantificación de la proteína de TNF α en aorta. Se llevaron a cabo de 6 a 10 mediciones individuales en cada caso. Las gráficas de barras muestran la media \pm error estándar de la media * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

6. La transcripción de RAS sigue el mismo patrón que la hiperplasia durante el envejecimiento.

Mediante PCR encontramos que la enzima Hras incrementa su transcripción con el envejecimiento, siguiendo el mismo patrón encontrado en la hipertrófia y fibrosis de la aorta (fig. 38). Esto es, a los 3 meses de edad ambos sexos tienen niveles similares de transcripción de Hras, pero los machos sufren un incremento en la transcripción más temprana y brusca, a los 7 meses de edad, y estos niveles se mantienen a los 12 meses. Las hembras, en cambio, sufren un cambio más gradual en la transcripción de esta enzima, y solamente se da un incremento significativo a los 12 meses, cuando igualan los niveles vistos en machos ya a los 7 meses.

De la misma forma que se observó previamente en hipertrófia y fibrosis de la aorta, el tratamiento crónico con Losartan previene estos cambios, permaneciendo los animales de ambos sexos en el mismo nivel que encontramos a los 3 meses.

Siendo la enzima Hras de vital importancia en rutas metabólicas de proliferación, esto sugiere que este cambio es responsable de los resultados encontrados en hiperplasia y fibrosis.

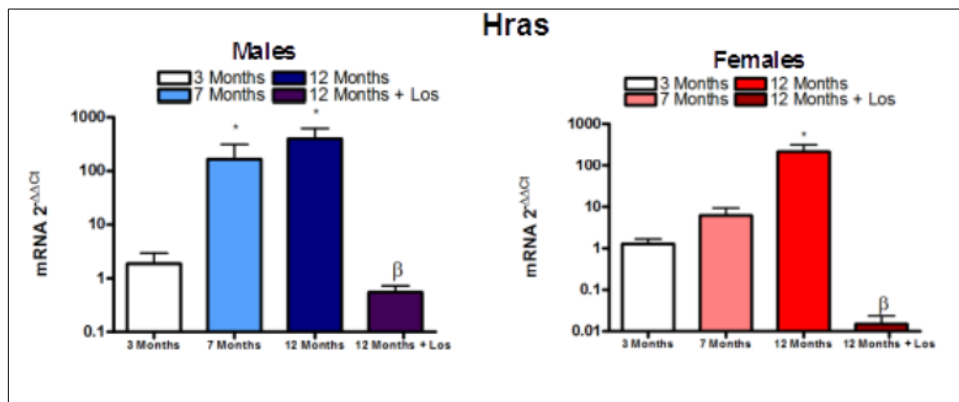


Figura 38. Cuantificación del ARN mensajero de Hras en aorta de ratones CD1 de 3, 7 y 12 meses, así como ratones a los que se administró Losartan de los 3 a los 12 meses de edad. Se utilizó como control endógeno la subunidad ribosomal 18S. Las gráficas de barras muestran la media ± error estándar de la media * = p<0,05 ; β = p<0,05 comparando con ratones de 12 meses de edad.

7. La vía AKT/mTOR y la influencia que la vía de la angiotensina II tiene sobre ella explican los diferentes patrones de hiperplasia en machos y hembras al envejecer.

Asimismo, detectamos diferencias en la vía metabólica AKT-mTOR (fig. 39A y 39B). Tanto machos como hembras sufren un incremento significativo en la transcripción de AKT1, AKT2, Rptor y AKT1S1 con el envejecimiento. Todas estas enzimas se encuentran en relacionadas con la regulación de la proliferación, crecimiento celular, producción de ribosomas y metabolismo mitocondrial entre otros. El incremento encontrado es igual en machos y hembras. Sin embargo solamente en hembras se ha visto un incremento significativo de PTEN, una enzima que regula negativamente a mTOR y por tanto actúa como un freno de esta vía.

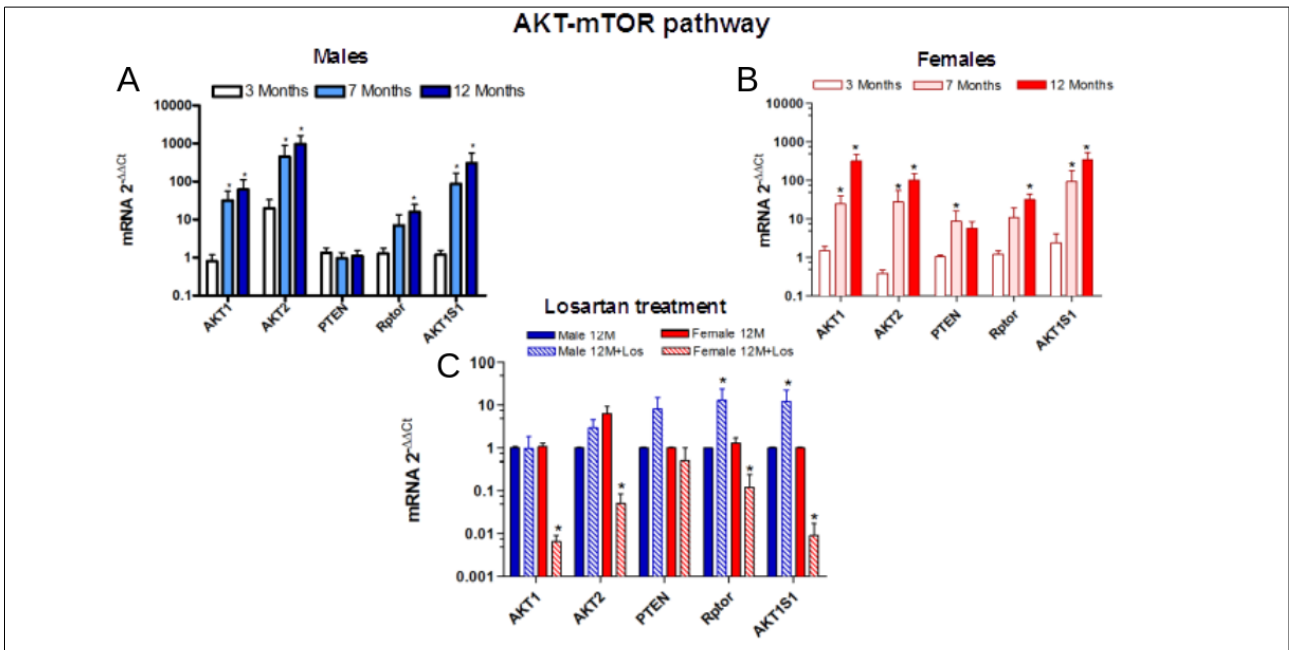


Figura 39. Cuantificación del ARN mensajero de enzimas de la vía AKT/mTOR en aorta de machos (A) y hembras (B) de ratones CD1 de 3, 7 y 12 meses, así como ratones a los que se administró Losartan (C) de los 3 a los 12 meses de edad. Se utilizó como control endógeno la subunidad ribosomal 18S. Las gráficas de barras muestran la media ± error estándar de la media * = p<0,05

También se encontró que, de forma interesante, el efecto del tratamiento crónico de Losartan actúa de forma diferente en la regulación de esta vía metabólica en machos y hembras, sugiriendo una importante implicación de la angiotensina II en esta vía (fig 39C). El hecho que el tratamiento con Losartan tenga un efecto diferente dependiendo del sexo concuerda con los resultados previamente mostrados y proporciona una base teórica acerca de por qué existen estas diferencias.

RESULTADOS

El tratamiento crónico con Losartan no produce en machos cambios en la transcripción de AKT1 ni AKT2, sin embargo en hembras conlleva una disminución significativa en ambos casos. En PTEN, el único caso en que hay diferencias asociadas al sexo y al envejecimiento, no se detectan cambios con el tratamiento de Losartan, sugiriendo que es una diferencia entre machos y hembras independiente de la vía de la angiotensina II, y que se trata de una diferencia muy consolidada. En el caso de Rptor y AKT1S1, ambos reguladores negativos de la vía AKT-mTOR, se ven cambios opuestos en machos y hembras. En machos se produce un incremento significativo de ambos a causa del tratamiento con Losartan, mientras que en hembras se produce una disminución significativa en ambos casos.

Estos resultados demuestran que las respuestas a los eventos que se producen durante el envejecimiento son diferentes en machos y hembras, es decir que hay una regulación diferente del proceso del envejecimiento vascular en machos y hembras.

El tratamiento con Losartan arroja luz sobre este hecho al verse que, tras llevarse a cabo, los machos sufren un incremento de la transcripción de las enzimas que regulan negativamente vías de proliferación, crecimiento celular, etc. Las hembras, por otro lado, disminuyen la transcripción de las enzimas que regulan positivamente estas vías. Esto son, por tanto, dos aproximaciones opuestas al mismo estímulo: al llevarse a cabo el tratamiento con Losartan en los machos se incrementan aquellos factores que frenan los cambios metabólicos asociados al envejecimiento vascular, mientras que en las hembras se reducen aquellos factores que empeoran con el envejecimiento vascular.

Así pues, esto sugiere que la vía de la angiotensina II está promoviendo el envejecimiento vascular de forma diferente en machos y hembras. En machos esta vía disminuye la capacidad para regular negativamente las vías que se exacerban con el envejecimiento vascular, y en hembras incrementa la actividad de estas vías mediante la regulación positiva de las enzimas responsables de su funcionamiento.

DISCUSIÓN

“Time spent arguing is, oddly enough, almost never wasted.”

Christopher Hitchens

En esta tesis hemos tratado de determinar los mecanismos asociados con la disfunción y el remodelado vascular en etapas tempranas de la senescencia. Para ello, se utilizó el modelo murino de senescencia acelerada (en inglés *Senescence Accelerated Mice* - SAM), que ha sido establecido por nuestro grupo y otros como un modelo adecuado para estudiar los efectos de la senescencia vascular espontánea en un período de tiempo conveniente y estándar^{215,218,223-228}. Los ratones SAM se estudiaron a los 7-8 meses de edad, en base a estudios previos de nuestro grupo demostrando que a los 7 meses los ratones propensos a la senescencia acelerada (SAMP8), pero no los resistentes a la senescencia acelerada (SAMR1), empiezan a manifestar signos de senescencia vascular^{215,218,223-228}. En los análisis para biomarcadores de senescencia, como la expresión de la proteína supresora de tumores 53 (p53) y actividad de la β -galactosidasa (β -gal), se encontró que las aortas de SAMP8 en la edad estudiada presentan aumento de la expresión de p53. Además, estas arterias exhiben zonas con un mayor nivel de actividad de β -gal, de acuerdo con estudios previos^{226,229}. Lo mismo pasa con las células musculares lisas aisladas de la aorta. Estos resultados indican la presencia de senescencia celular en parte del tejido vascular, pero no en toda la arteria, indicando un principio del proceso de senescencia en la edad estudiada.

La senescencia vascular se considera un proceso perjudicial que conduce a una remodelación gradual de la pared del vaso, que a su vez lleva al desarrollo de enfermedades cardiovasculares²³⁰. En este estudio se observó que el grosor de la pared vascular de la aorta y la arteria femoral en ratones SAM se incrementa con el envejecimiento sin modificar el diámetro del lumen, es decir que observamos un inicio de remodelado hipertrófico externo. Este resultado está ampliamente validado en la bibliografía en diversos modelos animales y en humanos, respaldando nuestro modelo de envejecimiento^{7,51-60}.

Estudios de nuestro grupo y otros investigadores han demostrado que esta hipertrofia se debe a la proliferación y migración de las células musculares lisas, pero que tanto el colágeno como la elastina mantienen su proporción inalterada en la pared arterial debido a un equilibrio entre su síntesis y su degradación^{215,231}. Por otro lado, otros investigadores han demostrado que sí existen cambios en diversos componentes estructurales de la pared arterial con el envejecimiento, entre ellos el colágeno y la elastina en modelos de ratón con envejecimiento cronológico²³² o con senescencia acelerada²³³, pero se debe tener en cuenta que esto es debido a que el rango de edad a que se obtienen estos resultados es mucho más avanzado, 20-24 meses para ratones con envejecimiento cronológico y 10-12 meses en ratones con senescencia acelerada SAMP11. También se ha demostrado que hay una desorganización y disminución de la elastina y un incremento de la deposición de colágeno en ratas de 30 meses y en primates de 20 años de edad^{57,234-236}. No obstante, no se han encontrado cambios en el contenido de

colágeno y la estructura de la elastina, de modo que planteamos la hipótesis de que, en esta fase de la senescencia vascular, la hipertrofia se caracteriza por una mayor proliferación de las células musculares lisas.

Para confirmar nuestra hipótesis, realizamos una serie de protocolos experimentales *in vitro* e *in vivo* para caracterizar el potencial proliferativo de las células musculares lisas de las arterias de los animales con senescencia. En tres ensayos distintos (análisis de la tasa de crecimiento celular, ensayo de crecimiento basado en impedancia y ensayo de herida) demostramos que las células musculares lisas aisladas de aorta de ratones SAMP8 tienen una mayor tasa de proliferación que las células musculares lisas aisladas de SAMR1. Este resultado también se encuentra respaldado en la bibliografía, al ser más proliferativas las células musculares lisas de la pared vascular a medida que se envejece, y se encuentra en diversos modelos animales y en humanos^{54,57,61}. Por otro lado, el modelo de lesión de la arteria femoral en ratón ha sido ampliamente utilizado por nuestro grupo y por otros investigadores y se ha establecido como un modelo que permite evaluar la proliferación en la pared arterial *in vivo*^{221,237-241}. Realizando este procedimiento demostramos que los ratones SAMP8 desarrollan una mayor hipertrofia de la pared vascular tras la lesión, de acuerdo con los resultados anteriores en que demostramos que las células musculares lisas de la pared vascular son más proliferativas en SAMP8. Asimismo, este resultado también está de acuerdo con los artículos encontrados en la bibliografía, en que las paredes arteriales desarrollan más hipertrofia de la capa media al envejecer^{215,218,223-228}.

Con el objetivo de averiguar que vías metabólicas estaban implicadas en los resultados previos, se llevó a cabo un experimento medición de la proliferación en células musculares lisas de aorta de SAMP8 y SAMR1. Se inhibieron enzimas de vías de proliferación celular que creíamos que estaban implicadas en los resultados obtenidos mediante el tratamiento con Wortmanina (inhibidor PI3K, vía AKT-mTOR) o con PD98059 (inhibidor de ERK, vía de las MAPK). Se eligieron estas vías debido a que ambas son de alta importancia en la migración y la proliferación^{242,243}.

La vía de las MAPK controla diversos procesos, entre ellos la transcripción, el metabolismo, la movilidad, la proliferación y la apoptosis^{242,243} y se ha descrito que la activación de las MAPK se da en la hipertrofia de la capa media²⁴⁵. En nuestro estudio, la inhibición de la vía de las MAPK provoca una disminución de la capacidad de proliferación tanto en SAMR1 como en SAMP8. Una explicación posible para este resultado es que otros estudios han demostrado que la activación de la vía de las MAPK se encuentra activada durante el envejecimiento por una miríada de factores²⁴⁶, entre ellos las ROS, factores de inflamación, el SRA y factores de crecimiento²⁴⁷⁻²⁵¹. A esto hay que añadir que la vía de las MAPK es una vía intrínsecamente compleja, dado que dentro de ella podemos considerar que existen diversas vías metabólicas de transducción de señales que se relacionan, incluyendo la vía de

ERK, la vía de JNK y la vía de p38²⁴². Esto puede causar que exista una regulación compleja de esta vía y que la inhibición solamente de ERK no sea capaz de mostrar diferencias debidas al envejecimiento. Por otro lado, se ha demostrado que ERK no se encuentra relacionada con el incremento de la capacidad de proliferación de las células musculares lisas durante el envejecimiento²⁴⁴, por tanto esto respaldaría nuestro resultado en que la inhibición de ERK produce el mismo resultado independientemente de la edad. Sin embargo otros estudios si que han descrito un incremento de actividad de ERK en células musculares lisas con el envejecimiento^{252,253}, por tanto no queda clara la vinculación de esta vía con el envejecimiento vascular.

La inhibición de la vía AKT/mTOR es capaz de disminuir la capacidad proliferativas de las células musculares lisas únicamente en SAMP8 . La proteína AKT es una serina/treonina quinasa que se ha descrito que actúa promoviendo la proliferación y la migración, e inhibiendo la apoptosis en células musculares lisas²⁵⁴⁻²⁵⁶. También participa en la activación de NF-KB en respuesta a TNF α ^{257,258}, activa la vía de mTOR y se puede encontrar en el núcleo celular donde activa factores de transcripción como FOXO, regulando el ciclo celular²⁴². AKT también promueve la migración remodelando los filamentos de actina²⁵⁹ y activando metaloproteasas²⁶⁰.

Los micro ARN (miR) son una clase novedosa de ARN endógenos, pequeños y no codificantes que regulan la expresión génica a través de la degradación, la inhibición de la traducción o, en condiciones especiales, la activación de la traducción de sus ARN mensajeros (ARNm)²⁶¹. Estos pequeños ARN no codificantes están altamente expresados en el sistema cardiovascular, incluyendo la pared vascular²⁶². Numerosos estudios han puesto de relieve el papel y la función de los miRs en el mantenimiento de condiciones fisiológicas normales y el desarrollo de la enfermedad. En este estudio, nuestro objetivo ha sido determinar las implicaciones de los miRs en el campo de la remodelación vascular.

El primer artículo de que tenemos constancia sobre el rol de un miR en las células musculares lisas se publicó en 2007²⁶³. Entre los miR mencionados en la bibliografía, miR-143/145 se ha establecido como un miR muy expresado de forma habitual en las células musculares lisas sanas, mientras que disminuye en células musculares lisas proliferativas, tanto *in vivo* como *in vitro*, de acuerdo con nuestros resultados^{198,264}. Aunque el mecanismo por el cual actúa el miR-143/145 no está del todo claro, se ha sugerido que promueve la diferenciación de las células musculares lisas¹⁹⁸. Dado que nuestros resultados muestran que los ratones SAMP8 tienen menos miR-143/145 en la pared vascular que los ratones SAMR1, esto sugiere que este miR puede ser responsable de las diferencias que hemos mostrado debidas al envejecimiento. Sin embargo el tratamiento con miR-143/145, tanto *in vitro* como *in vivo*, no es efectivo para impedir la proliferación de células musculares lisas en nuestro

modelo. Esto podría explicarse señalando que la proliferación y la diferenciación son, a menudo, consideradas mutuamente excluyentes. Sin embargo ambas pueden ocurrir de forma independiente uno del otro y están reguladas por mecanismos diferentes²⁶⁵.

El miR-221/222 fue el segundo grupo de miR que se describió que está implicado en la regulación del fenotipo de células musculares lisas, ya que se describió que se incrementa en la respuesta proliferativa al PDGF^{152,267}. Se sabe, también que el incremento de miR-221/222 promueve la proliferación de células musculares lisas y lleva a cabo su efecto inhibiendo proteínas clave en el control del ciclo celular^{152,267} como son p27^{KIP1} y p57^{KIP2}. Estos resultados de otros grupos también se encuentran de acuerdo con los nuestros, ya que los ratones SAMP8 tienen una mayor cantidad de miR-221/222 en la pared vascular que los ratones SAMR1, sugiriendo que este miR puede ser el responsable de las diferencias de proliferación debidas al envejecimiento. No obstante, la inhibición de miR-221/222, tanto *in vitro* como *in vivo*, no es efectivo para impedir la proliferación de células musculares lisas en nuestro modelo. Este resultado contrasta con los encontrados en la bibliografía, pues se ha demostrado que la inhibición de miR-221/222 en arterias que han sufrido una lesión inhibe la proliferación de células musculares lisas, así como la formación de la capa neoíntima^{152,263}.

En nuestro modelo de lesión de femoral encontramos que la vía AKT/mTOR se encuentra exacerbada en SAMP8, causando una mayor hipertrofia en respuesta a la lesión y lo corroboramos *in vitro* con células musculares lisas. Recientemente se ha demostrado que esta vía es modulada por el miR-21 en la formación de la capa neoíntima en respuesta a una lesión vascular. En dicho estudio, la regulación negativa de miR-21 disminuyó la formación de la capa neoíntima en carótida de ratas tras la lesión y se sugirió que PTEN es la diana molecular de miR-21. Por ello, miR-21 modula a AKT alterando la proliferación y la apoptosis en células musculares lisas²⁶³. También se ha demostrado el efecto de miR-21 en humanos, pues regula la fosforilación de AKT en células humanas¹⁸⁴ y tiene un efecto negativo en las células endoteliales y en su capacidad de limitar el crecimiento de la capa media^{185,268}. Además, se ha descrito que en células musculares lisas de origen humano, una disminución de miR-21 inhibe la proliferación y la migración^{189,190} y que en lesiones vasculares el miR-21 se encuentra sobre-expresado y promueve el crecimiento de células musculares lisas¹⁹². En esta tesis también demostramos que miR-21 modula la vía AKT/mTOR, siendo responsable de que los ratones SAMP8 muestren una mayor hipertrofia de la pared vascular tras la lesión y de que las células musculares lisas de SAMP8 sean más proliferativas. Otro estudio reciente también demuestra que el miR-21 promueve la hiperplasia en respuesta a una lesión vascular y además propone que el envejecimiento exagera el papel del miR-21 en este proceso, respaldando nuestros resultados²⁶⁹.

En esta tesis también ampliamos nuestros conocimientos sobre los mecanismos de regulación de la disfunción vascular durante el envejecimiento, incluyendo estudios sobre cómo el sexo influye en el proceso. Para estos estudios se utilizó el modelo de envejecimiento cronológico en la cepa CD1, utilizando ratones que no tenían relación de consanguinidad. La razón para el uso de este modelo experimental de envejecimiento vascular cronológico es por su gran variabilidad fenotípica que puede aleatorizar cualquier influencia genética que si se da en ratones con relación de consanguinidad²⁷⁰. Esto nos permite por un lado establecer los cambios moleculares observados en los ratones SAM que se asocian con la senescencia cronológica natural, y por otro lado dar un enfoque más translacional, ya que representamos mejor la senescencia natural de la población humana, que es altamente heterogénea. Para estos, se realizó un estudio a lo largo del tiempo en los ratones CD1 (a los 3, 7 y 12 meses de edad) con la finalidad de determinar la edad en que se empezarían a observar los cambios en la función y morfología vascular dados por la senescencia.

Las diferencias asociadas al sexo se pueden ver en prácticamente todos los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular²⁷¹, pero principalmente en el rango de edades que hemos considerado en esta tesis, esto es desde jóvenes hasta mediana edad (previamente a los cambios hormonales que se dan durante la senescencia reproductiva). A pesar de la evidente estadística sobre el riesgo cardiovascular entre hombres y mujeres, se conoce poco acerca del papel del sexo sobre los factores de regulación del envejecimiento vascular. Los resultados de este estudio demuestran que machos y hembras envejecen de forma diferente a nivel vascular y proporciona claras evidencias acerca del momento y cómo surgen estas diferencias. Aunque existe una vasta bibliografía acerca del envejecimiento vascular, históricamente se ha tenido poco en cuenta el sexo como factor independiente en el envejecimiento vascular, y no ha sido hasta hace pocos años que se ha empezado a estudiar¹⁰. Además, cuando se ha empezado a estudiar este factor se ha puesto énfasis en el papel de las hormonas y se han llevado a cabo estudios a edades muy avanzadas, cuando los cambios y daños inducidos por la senescencia ya se han iniciado y han progresado de forma subclínica hasta llevar a cambio daños irreparables. Por ello a día de hoy hay realmente pocos estudios que aborden este complejo problema de la forma en que se ha llevado a cabo en la presente tesis.

En nuestro modelo experimental, en que utilizamos ratones CD1, hemos hallado diferencias asociadas al sexo de forma significativa en el inicio de la disfunción vascular. Aunque los estudios se realizaron a tres edades diferentes, el momento de aparición de las diferencias funcionales asociadas al sexo y con el envejecimiento fue de 12 meses de edad. Por lo tanto, los resultados presentados en esta tesis para los estudios funcionales muestran únicamente los grupos de 3 y 12 meses. Nuestros resultados también aportan información importante acerca del rol del Sistema Renina Angiotensina

(SRA) en cuanto a las diferencias asociadas al sexo durante el envejecimiento vascular. Se encontró que los machos manifiestan una disfunción vascular (que se caracteriza por una mayor contracción a la AngII y disminución de la relajación dependiente del endotelio para la ACh) de forma más temprana y más acentuada que las hembras. En los machos, el envejecimiento vascular ocurre de forma más prematura que en las hembras, ya que muestran un desequilibrio en la producción de factores de relajación (disminución del NO) y de contracción (aumento de las prostaglandinas vasoconstrictoras y O_2) derivados del endotelio, que contribuyen a la disfunción vascular. En las hembras de la misma edad, sin embargo, la función vascular se conserva por el mantenimiento de la expresión de eNOS y por el aumento de la liberación de PGI₂, a pesar de que ambos sexos muestran cambios en la regulación de las respuestas a la AngII y el aumento asociado en la actividad COX. A pesar de la cantidad de evidencias que muestran que tanto el sexo como el envejecimiento ejercen un rol central en el SRA y en la regulación de las COX, no nos consta evidencia de que haya un estudio que demuestre la relación entre ambas rutas metabólicas en el contexto del envejecimiento vascular y las diferencias que hay entre ambos sexos. Esta tesis supone el primer estudio en que se establece una relación entre las vías metabólicas de la SRA y de las COX en el control de la disfunción vascular a causa del envejecimiento y dependiendo del sexo.

En este modelo experimental hemos observado diferencias asociadas al sexo de forma significativa en la función vascular durante el envejecimiento. Sin embargo, a la edad de 12 meses, en la que hemos hallado las diferencias a nivel funcional, el envejecimiento no ha causado cambios en la presión sanguínea en ningún caso. Esto puede sugerir que los cambios descritos en la reactividad vascular de la aorta preceden los cambios de incremento de la presión arterial asociados al envejecimiento. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en modelo de envejecimiento prematuro en que la disfunción arterial, concretamente en la aorta, precede a los cambios en la presión arterial¹⁰.

Estudios previos han demostrado que la AngII es un regulador fundamental de la senescencia celular, con lo cual se ha propuesto la vía del SRA como elemento central tanto en el inicio como en la progresión del envejecimiento vascular^{8,166}. La activación de esta vía metabólica ha sido muy bien descrita en ratones como un importante regulador del remodelado vascular con el envejecimiento, mediante mecanismos que implican estrés oxidativo e inflamación⁴⁹. Por otro lado, el papel de la AngII en la reactividad vascular durante el envejecimiento no ha sido tan bien estudiada y se han descrito resultados que entran en conflicto directo entre sí, siendo que se ha descrito que la capacidad de contracción vascular incrementa, decrece o permanece igual en respuesta a la AngII²⁷²⁻²⁷⁵. El sexo también es un factor importante en la regulación que ejerce el SRA sobre la función vascular²⁷⁶ y existen

evidencias de que la vasculatura de los machos es más sensible que la de las hembras a la influencia de la AngII, tanto en el remodelado como en la contracción^{277,278}.

En el presente estudio hemos observado en segmentos de aorta con el endotelio intacto un aumento a la respuesta de contracción vascular a la AngII, y que este incremento puede ir asociado a una disfunción vascular durante el envejecimiento. Los resultados sobre la contracción a la AngII que se observaron en ratones envejecidos concuerda con estudios previos^{274,275}. Sin embargo, existen otros estudios que muestran una marcada disminución de la contracción de AngII durante el envejecimiento. Las discordancias que se encuentran en la literatura se pueden deber a los distintos lechos vasculares y a posibles diferencias en las edades estudiadas. A parte de ello, existe una gran dificultad técnica para evaluar la respuesta inducidas por la AngII en miografía debido a la influencia de la taquifilaxia, y por lo tanto diferentes condiciones experimentales podrían afectar la extensión de las respuestas a la AngII²⁷⁹. Un estudio reciente muestra que, en condiciones experimentales similares, existe un cambio substancial en la respuesta taquifilactica en las contracciones inducidas por AngII²⁷⁵ por el envejecimiento. La vasoconstricción inducida por la primera administración de AngII se incrementa sustancialmente en arterias de ratas jóvenes hasta media edad, y luego disminuye cuando las ratas son seniles. No obstante, la segunda administración de AngII provocó una reducción de las contracciones, que fueron aún mayores en ratas de media edad, pero la taquifilaxia disminuyo a medida que las ratas envejecían. Por lo tanto, solo se ha llevado a cabo una medición de la contracción en respuesta a AngII en cada segmento aórtico para evitar los problemas metodológicos mencionados.

La AngII actúa a través de los receptores AT1R y AT2R, pero la mayoría de los efectos perjudiciales observados se deben al receptor AT1R, mientras que el receptor AT2R compensa los efectos perjudiciales del anterior²⁸⁰. En este estudio, el incremento de la contracción en respuesta a AngII en los machos se da de forma paralela a una disminución de la expresión del AT2R, lo que sugiere que, con el envejecimiento en machos, se va perdiendo la capacidad de compensación de los efectos negativos causados por el receptor AT1R, lo que empeoraría los efectos que causa la AngII²⁸¹.

Por otro lado, la disfunción endotelial como estado fisiopatológico es multifactorial y compleja, pero se sabe que puede sufrir influencia del envejecimiento y del sexo^{224,282,283}. Además, el SRA es un importante regulador de la función endotelial y puede contribuir como un desencadenante y en la progresión de la disfunción endotelial²⁸². Diversos estudios muestran que un incremento crónico de los niveles de AngII contribuyen a la disfunción endotelial en diversos lechos vasculares¹⁵⁸. Asimismo, se ha descrito que inhibidores del SRA son capaces de mejorar la disfunción endotelial²⁸⁴. En este estudio se observó que el aumento de respuesta a la AngII en los machos se asocia con una disminución de la relajación dependiente del endotelio. Por esa razón, se evaluaron los efectos de la inhibición crónica de

las acciones de la AngII, mediante el tratamiento con Losartan (un antagonista selectivo competitivo de AT1R) sobre la disfunción endotelial en ratones envejecidos. Encontramos que el Losartan supone un tratamiento efectivo para mejorar la vasodilatación dependiente del endotelio en machos envejecidos, estableciendo, por tanto, una relación entre el incremento de la actividad de AngII a través del AT1R con la disfunción endotelial en este grupo. Esta relación muestra diferencias dependiendo del sexo, pues las hembras de la misma edad muestran una menor respuesta a AngII y no evidencian disfunción endotelial. Sin embargo, a los 12 meses no se puede asegurar que más adelante las hembras vayan o no desarrollar un incremento en la contracción en respuesta a AngII acompañado de disfunción endotelial, tal como se aprecia en machos de la misma edad. En este caso podría tratarse de una diferencia en función del sexo en el momento de la aparición de las características asociadas al envejecimiento. En cualquier caso, nuestros datos nos permiten sugerir que el SRA no contribuye de la misma forma a la disfunción endotelial en ambos sexos.

Con esos hallazgos, nuestro siguiente paso fue averiguar por medio de qué vías de señalización el envejecimiento está ejerciendo sus efectos en las respuestas a la AngII y la ACh. Como primera aproximación se eliminó la influencia del NO en las respuestas a la AngII y la ACh mediante la inhibición de la NOS con L-NAME. El tratamiento con L-NAME abolió completamente la relajación inducida por ACh, proporcionando evidencia de que el NO es el principal factor que contribuye para la relajación dependiente del endotelio en las aortas de todos los grupos. Por otro lado, la inhibición de la NOS conduce a un mayor incremento en la contracción inducida por la AngII en las arterias de los ratones jóvenes y las hembras envejecidas (~ 4 veces en el área bajo la curva) que en los machos envejecidos (~ 2 veces). En paralelo, se observó una marcada disminución de la expresión eNOS en las aortas de machos de 12 meses. Estos datos establecen claramente una diferencia asociada al sexo y a la senescencia en la contribución del NO a la reactividad vascular. Existen diversos estudios que describen la reducción de la producción del NO durante el envejecimiento^{282,285-287}. Igualmente, el sexo desempeña un papel clave en la regulación de la eNOS y, por tanto, de la producción de NO^{218,228}. Estas diferencias se han establecido un factor clave que contribuye a las diferencias sexuales en la función vascular. Pese a estas evidencias, poco se conoce acerca de la interacción entre ambos factores (envejecimiento y sexo) en la regulación del NO.

Además del sistema del NO, la función vascular también está controlada por los productos derivados de la COX. Se ha descrito que el equilibrio entre la liberación de prostaglandinas vasoconstrictoras y vasodilatadoras en la vasculatura influye en la respuesta a los agonistas en condiciones fisiológicas y modulan la disfunción vascular en condiciones fisiopatológicas, incluyendo el envejecimiento^{152-154,226-228}. Los resultados muestran que la inhibición de las COX por la Indometacina

supone un tratamiento efectivo para restaurar la capacidad de vasodilatación en machos envejecidos, y no tiene efecto en las hembras o en individuos jóvenes de cualquier sexo. Esto sugiere que la disfunción endotelial observada en los machos envejecidos es, en parte, mediada por cambios en actividad de las COX y aumento en la producción de prostaglandinas vasoconstrictoras.

Esta tesis supone el primer estudio en que se establece una relación entre las vías metabólicas del SRA y de las COX en el control de la disfunción vascular a causa del envejecimiento y dependiendo del sexo. Estudios bioquímicos y de biología molecular en homogenados de arteria aorta revelan un incremento de la actividad y expresión de las COX-1 y COX-2 con el envejecimiento, aunque en machos este aumento es de 2 veces mayor que el observado en las hembras. Este hecho podría explicar, en parte, porque encontramos disfunción endotelial solamente en machos de esta edad. A parte de esto, es interesante mencionar que las arterias de las hembras son capaces de mantener la función endotelial a pesar del incremento de la actividad de la AngII y las COX durante el envejecimiento, sugiriendo algún mecanismo de compensación. Una explicación posible es que la eNOS (que no ha sufrido cambios con el envejecimiento en hembras), es capaz de compensar los efectos negativos causados por el incremento de vasoconstrictores producidos por las COX. Además de esto, el incremento de la actividad de las COX en machos de 12 meses fue acompañado por un aumento de la liberación de prostaglandinas vasoconstrictoras, mientras que el incremento de la actividad de las COX en hembras de 12 meses iba acompañado por un aumento en la liberación de la prostaglandina vasodilatadora PGI₂.

La síntesis de prostaglandinas es compleja y se encuentra regulada por miembros de la súper-familia del citocromo P450. El proceso implica la conversión de PGH₂, producido por las COX, en la prostaglandina vasodilatadora PGI₂ o en las prostaglandinas vasoconstrictoras TXA₂ y PGF₂α²⁸⁸. El hecho de que la síntesis de prostaglandinas vaya en un sentido u otro depende de expresión y localización de las enzimas que se encuentran más adelante de las COX en la vía de síntesis de las prostaglandinas. Por ejemplo, la sintasa de PGI₂ (PGI₂S) se encuentra de forma predominante en el endotelio, mientras que la sintasa de TXA₂ (TXA₂S) se encuentra de forma predominante en las células musculares lisas de la pared arterial. Una diferencia en la proporción de estas enzimas o en su actividad puede modificar la liberación de unas prostaglandinas u otras^{287,289-292}. Por ello determinamos la expresión de dos de las enzimas más importantes en este aspecto, PGI₂S y TXA₂S en la aorta torácica. Sorprendentemente no encontramos variaciones en la expresión de estas enzimas que podrían justificar los resultados previamente hallados. Sin embargo, las limitaciones técnicas pueden haber supuesto un enmascaramiento de estos resultados, pues se llevaron a cabo en homogenado de aorta, que incluye

tanto células endoteliales como musculares lisas. Cabría la posibilidad de encontrar diferencias si se llevase a cabo el mismo experimento en cultivos, separando los tipos celulares.

Otra explicación para este resultado es que las diferencias en la producción de prostaglandinas se deben a una regulación diferente de las COX. La COX-1 favorece la producción de TXA₂, mientras que la COX-2 favorece la producción de PGI₂^{293,294}. Por tanto, se realizó un análisis de la proporción entre la actividad y expresión de ambas formas de COX en cada animal y no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos. En este sentido, es posible que la actividad de las prostaglandinas se regule por estímulos endógenos como estrés oxidativo, presencia de substratos lipídicos, hormonas, hipoxia y citoquinas proinflamatorias²⁹⁴, justificando los resultados obtenidos. Más aún, la producción de prostaglandinas puede ser modulada mediante la separación física de las enzimas, esto es, que se encuentre en diferentes compartimentos de forma que se favorezca la producción de una u otra prostaglandina. Aunque hay evidencias de este hecho, no se sabe como esto puede ser regulado por condiciones fisiopatológicas²⁹⁴.

En este punto de nuestra investigación se ha demostrado que el envejecimiento va acompañado de un incremento de las contracciones en respuesta a AngII en ambos sexos. También se ha demostrado que una mayor respuesta en machos envejecidos que en hembras de su misma edad iba acompañada, a su vez, de una disfunción endotelial solamente encontrada en los machos. En este sentido, hemos planteado la hipótesis de que esta disfunción involucra la activación de las COX a través de la vía de la AngII, llevando a la producción de vasoconstrictores. La relación entre el SRA y las COX se ha descrito ampliamente en la vasculatura renal y en otros lechos vasculares²⁹⁵⁻²⁹⁷. Igualmente, se ha descrito que la inhibición del receptor de AT₁R mejora la función vascular disminuyendo la liberación de los vasoconstrictores derivados de la COX²²⁷. Estudios previos^{293,294} han mostrado que existe una contribución esencial de las prostaglandinas vasoconstrictoras en la disfunción endotelial durante el envejecimiento y por ello formulamos la hipótesis que la AngII puede contribuir a la disfunción vascular asociada al envejecimiento en machos a través de mecanismos que implican la activación de las COX. El presente estudio presenta la primera correlación entre las vías de la AngII y la COX en el control de la disfunción vascular por el envejecimiento y el sexo. Se encontró que el bloqueo crónico del AT₁R disminuyó significativamente la actividad y expresión de la COX₂ en los machos de 12 meses. El grado de disminución en la actividad de la COX₂ en machos viejos se asoció con un aumento de la producción de PGI₂ y disminución de PGF-2a, similar al que se ha observado en las hembras viejas.

Además de los cambios en el tono vascular, el envejecimiento también está asociado con alteraciones bioquímicas que están implicadas en el desarrollo y la progresión de la remodelación vascular. Estudios en ratas seniles indican que hay diferencias sexuales en el grado de remodelado

vascular asociado al envejecimiento, y que la rigidez aumenta más en machos que en hembras seniles^{298,299}. En primates no humanos, se ha demostrado un aumento en la rigidez aórtica mayor en los machos seniles que en las hembras³⁰⁰. En humanos, aunque se hayan realizados muchos estudios sobre la correlación del envejecimiento con el remodelado arterial, los análisis de estos estudios han considerado los resultados en los hombres y las mujeres por separado^{9,301-303}. El campo todavía carece de un gran estudio poblacional y estudios de investigación básica para identificar si los efectos relacionados con el envejecimiento siguen la misma progresión y afectan a hombre y mujeres de la misma forma.

Para abordar este tema, se determinaron cambios en el grosor de la pared de la aorta torácica a diferentes edades tanto en machos como en hembras. Ambos sexos parten de un grosor de la pared alrededor de los 50µm a los 3 meses de edad, pero los machos incrementan rápidamente el grosor de la aorta torácica a los 7 meses de edad hasta niveles que ya se mantienen hasta la última medición a los 12 meses de edad. Las hembras, por otro lado, sufren este proceso de forma más gradual y atenuada, siendo que a los 7 meses de edad el grosor de la aorta torácica en hembras es menor que el de machos, e intermedio entre el grosor que presentan a los 3 meses y los 12 meses de edad. Con estos resultados nos encontramos frente a una diferente progresión de la hipertrofia aórtica en función del sexo. Este resultado puede arrojar luz sobre los resultados anteriores ya que sugiere que las hembras se encuentran, de algún modo, protegidas frente a estos cambios asociados al envejecimiento y que la progresión hacia características propias de la vejez es más lenta en hembras. Por otro lado, se ha determinado también el diámetro del lumen del vaso para averiguar el tipo remodelado que ocurre en función del envejecimiento. Al no cambiar la luz del vaso en ninguno de los casos, se puede sugerir que se trata de un remodelado hipertrófico externo. Estos resultados coinciden con otros estudios que describen la presencia de remodelado hipertrófico externo sobre las arterias con el envejecimiento^{8,304,305}.

El remodelado vascular es producido por el SRA al activar quinasas proproliferativas en células musculares lisas de la pared vascular, como cSrc, JAK y PI3K^{162,163}. Estas quinasas además también promueven la migración de las células musculares lisas y activa a su vez otras quinasas de la vía de las MAP quinasas así como la NAD(P)Hox, que también contribuyen al remodelado vascular que observamos en la hipertrofia externa promoviendo la proliferación y migración de las células musculares lisas^{164,165}. Estudios han demostrado que AT1R es el receptor a través del cual el SRA produce el remodelado vascular y el estrés oxidativo¹⁶⁷ y también se ha demostrado que la inhibición del SRA es capaz de prevenir el remodelado vascular¹⁶⁹. Por esto también quisimos comprobar la influencia del SRA en el proceso de remodelado vascular en el envejecimiento mediante el tratamiento con

Losartan, un inhibidor del SRA, concretamente del receptor AT1R. El tratamiento con Losartan desde los 3 meses de edad hasta los 12 meses de edad fue capaz de prevenir la hipertrofia que se observa durante el envejecimiento, permaneciendo las aortas de los animales tratados con el mismo grosor y lumen que se encontró a los 3 meses de edad. Este resultado demuestra que la actuación de la AngII, a través del receptor AT1, es un factor contribuyente importante para la hipertrofia en la aorta que se observa de forma natural con el envejecimiento.

El análisis histológico de las aortas no muestra, en ningún caso, una alteración en el aspecto de las capas de la aorta, de manera que se mantiene la integridad de las capas íntima, media y adventicia. En este sentido, podemos descartar entidades claramente patológicas como una proliferación anómala de la íntima, y nos encontramos ante el progreso de características preclínicas asociadas al envejecimiento. La hipertrofia observada se da en la capa media, y por tanto puede ser debida a la proliferación de las células musculares lisas que conforman gran parte de esta capa, o a la deposición de matriz extracelular, también muy importante en esta capa. Para dilucidar si el sexo afecta a la acumulación de matriz extracelular en la pared arterial, se llevó a cabo una tinción de colágeno con rojo de sirio, pues es el componente principal de la matriz extracelular de la pared de la aorta. En un estudio detallado utilizando microscopia de fluorescencia con luz polarizada, se puede determinar por separado la cantidad de fibras de colágeno de nueva formación y de fibras de colágeno ya consolidadas (maduras). Gracias a que estas fibras muestran birrefringencia, se pueden diferenciar bajo la polarización de la emisión dos tipos de colágenos distintos: en verde las fibras jóvenes y en rojo/naranja las fibras maduras. Los resultados en la medición de la cantidad de ambos tipos de fibra de colágeno arrojaron los mismos resultados, sugiriendo que se trata de un proceso en equilibrio entre la síntesis y degradación de colágeno de forma mantenida en el principio del proceso de envejecimiento. Sin embargo, con en las edades estudiadas no se puede asumir que la el aumento en la formación de nuevo colágeno no conducirá a la acumulación de colágeno maduro con el tiempo. La acumulación de colágeno en la pared de la aorta progresa de forma coherente con la hipertrofia. Partiendo ambos sexos de cantidades equivalentes de colágeno en la pared vascular a los 3 meses de edad, y que se incrementa de forma brusca en machos ya a los 7 meses de edad y permanece así ya hasta el final del experimento a los 12 meses de edad. Por otro lado, la acumulación de colágeno en las arterias de las hembras es mucho más gradual y menos intensa. También quisimos averiguar si la vía del SRA era importante en este proceso, y realizamos la misma medición en animales tratados con Losartan desde los 3 meses de edad hasta la finalización del experimento a los 12 meses. Los resultados muestran que la inhibición de la actividad de la AngII a través de su receptor AT1R es eficaz para evitar la acumulación de colágeno en la pared vascular, en concordancia a los resultados vistos en la medición de la hipertrofia. Estos

resultados concuerdan con estudios realizados en pacientes en que el Losartan tiene efectos beneficiosos en el remodelado vascular¹⁵⁶.

A continuación, quisimos valorar cómo evoluciona el estrés oxidativo durante el envejecimiento en machos y hembras. Además de un importante regulador de remodelado vascular, el estrés oxidativo sufre gran influencia del SRA^{164,165}. Bajo condiciones normales, las ROS actúan como mensajeros en el metabolismo, ya sean intercelulares o intracelulares. Como mensajeros, las ROS tienen un papel fisiológico en el tono vascular y la proliferación de las células de la pared vascular, pero cuando aparecen condiciones fisiopatológicas estas funciones se ven alteradas³⁰⁶⁻³¹¹. La AngII promueve la generación de ROS a través del receptor AT1R en células musculares lisas y en células endoteliales de la pared vascular^{162,312-315}. Estudios han demostrado que las ROS estimulan la proliferación de las células musculares lisas de la pared vascular, ya que los antioxidantes inhiben este proceso, promueven la apoptosis y atenúan el efecto de factores de crecimiento al disminuir las ROS³¹⁶⁻³¹⁹. Otros estudios han propuesto que la MAP quinasa p38³¹⁵, una enzima que reacciona al estrés oxidativo promoviendo la proliferación de las células musculares lisas, así como la vía AKT/mTOR³¹⁵ como responsables de la proliferación en respuesta al ambiente oxidativo.

Por tanto, cabría esperar que los resultados previos en la función y remodelado vascular se reprodujeran en este caso también, mostrando la importancia del estrés oxidativo en las diferencias entre machos y hembras durante el envejecimiento. No obstante, los resultados que arrojó la medición del estrés oxidativo fueron sorprendentes. La evolución de este parámetro sigue la misma evolución dependiente del sexo vista en la hipertrofia y la fibrosis, es decir, más temprana y más severa los machos que las hembras. Este resultado sugiere que el estrés oxidativo va asociado al remodelado, pues ambos siguen el mismo progreso durante el envejecimiento. Sorprendentemente, al medir los niveles de estrés oxidativo en aortas de animales que recibieron tratamiento profiláctico de Losartan desde los 3 meses de edad hasta los 12 meses de edad, se vio que la inhibición de la actividad de la AngII a través de su receptor AT1R no tiene ningún efecto en los niveles de ROS en hembras, mientras en machos el Losartan ejerce un efecto pequeño, aunque significativo, en la producción de ROS. Estos resultados entran en conflicto con la bibliografía, pues existen múltiples estudios que muestran que el Losartan y sus metabolitos inhiben la producción de estrés oxidativo en diversos casos. Se ha descrito que el Losartan inhibe el estrés oxidativo medido en células mononucleadas de sangre periférica de pacientes³²⁰, en plasma de pacientes que reciben hemodiálisis³²¹ y en plasma de voluntarios en que se induce hipoxia intermitente³²². No obstante, también se han descrito casos en que el Losartan tiene efectos ambiguos, pues existen estudios que describen que mejora los niveles de antioxidantes en suero de pacientes hipertensos sin disminuir los niveles de estrés oxidativo³²³. Por otro lado, en modelos

animales también se ha descrito que el Losartan es capaz de disminuir el estrés oxidativo en cerebro de ratas hipertensivas³²⁴ y en arteria mesentérica de ratas que han sufrido una nefrectomía³²⁵. En aorta también se ha descrito que el Losartan es capaz de disminuir el estrés oxidativo en el caso de ratas hipertensivas³²⁶⁻³²⁸. La razón para esta disparidad puede deberse a diferentes métodos de medición, también a que muchos de estos estudios han tenido en cuenta las enzimas antioxidantes a la hora de establecer el perfil de estrés oxidativo mientras que en nuestro caso solamente hemos considerado los niveles de ROS. En nuestro modelo experimental, los resultados encontrados desvinculan, en parte, el SRA del aumento de estrés oxidativo durante el envejecimiento. Por último, otra explicación más plausible, es que estos estudios han utilizado dosis de Losartan mucho mayores a las que nosotros hemos utilizado dado que nuestra pretensión era llevar a cabo un tratamiento crónico profiláctico de baja concentración, mientras que estos estudios tratan pacientes o animales que padecen alguna ECV y pretenden llevar a cabo un tratamiento para corregir el incremento del estrés oxidativo utilizando mayores concentraciones de Losartan. Sea como fuere, no hemos hallado evidencias de que existan otros estudios que hayan contemplado el efecto del tratamiento de Losartan, crónico, profiláctico y de baja concentración, en la producción de ROS en individuos sanos antes del presente estudio.

La enzima NAD(P)H oxidasa es la principal fuente de O_2^- en la pared vascular. La activación de la NAD(P)H-oxidasa requiere la asociación de sus subunidades citosólicas (p47phox, p67phox y Rac) con el flavocitocromo ligado a la membrana (NOX / p22phox)^{329,330}, que cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH utilizando oxígeno molecular al que transfiere electrones, generando especies reactivas de oxígeno. Cambios en la expresión de las NOXs y aumento en la actividad de la subunidad p47phox suponen responsables de la activación anómala de esta enzima. Estudios previos de nuestro grupo han descrito cambios en la actividad y expresión de las subunidades de la NAD(P)Hox en asociación con el aumento de la producción de O_2^- en la pared de aortas de ratones senescentes SAM²²⁰. Por otro lado, se han descrito diferencia asociadas al sexo en la producción de O_2^- por la NADPH-oxidase³³¹, aunque no se ha descrito la interacción entre el sexo y el envejecimiento en esta vía. Mediante la inhibición aguda de esta enzima con Apocinina en secciones de aorta previamente a la medición de la oxidación del DHE, se valoró su contribución al aumento de estrés oxidativo por el envejecimiento y el sexo. Los resultados fueron de gran interés, pues mostraron que la NAD(P)Hox se trata de la fuente más importante del O_2^- en nuestro modelo ya que su inhibición reduce los niveles de estrés oxidativo en los ratones viejos hasta los mismos niveles que encontramos a los 3 meses de edad, tanto en machos como en hembras. Este resultado demuestra que, en último término, la producción de estrés oxidativo en el envejecimiento se debe a la NAD(P)Hox tanto en machos como en hembras.

Diversos estudios han mostrado evidencias de que la NAD(P)Hox y el TNF α se encuentran relacionados. En células endoteliales, neutrófilos y fibroblastos se ha descrito que el TNF α inicia una cascada de señalización que lleva a la activación de la NAD(P)Hox y a la producción de ROS³³²⁻³³⁶ y se ha demostrado esta relación entre TNF α y NAD(P)Hox en células endoteliales de origen humano³³⁷. Para averiguar el papel del TNF α en el envejecimiento vascular, se ha determinado la expresión de ARNm de TNF α en aorta y la cantidad de proteína de TNF α en suero. Los resultados muestran un incremento no significativo de la transcripción de TNF α en la pared vascular, pero los niveles séricos de proteína incrementan de una forma significativa con el envejecimiento en ambos sexos. Estos resultados corroboran con estudios en humanos que asocian el envejecimiento con el aumento de los niveles de TNF α ^{338,339}. Al no encontrar diferencias en la producción de O₂⁻ en presencia de Losartan, repetimos los experimentos de oxidación del DHE, pero inhibiendo la acción del TNF α bloqueando de su receptor con el antagonista R-7050. Los resultados muestran que la producción de O₂⁻ vía TNF α disminuye solo en machos a los 7 meses de edad hasta los niveles encontrados a los 3 meses de edad, pero no se modifica en ningún otro grupo. Estos resultados parecen contradictorios con los previamente hallados en la expresión de TNF α y requieren más investigación para dilucidar su significado, pero pueden sugerir que el TNF α , tiene un efecto puntual en el tiempo en la producción de estrés oxidativo, y que este efecto es dependiente del sexo. Por otro lado, no se puede excluir el hecho que no se ha encontrado cambio en el estrés oxidativo tras la inhibición del TNF α en ningún otro grupo sea debido a las limitaciones del experimento y el tratamiento agudo, ya que no se ha podido tratar los animales con este antagonista debido a su toxicidad *in vivo*.

Un análisis histológico de las aortas en el inicio del envejecimiento (12 meses) no muestra, en ningún caso, una alteración en el aspecto de las capas de la aorta o en la estructura de la lámina elástica, de manera que se mantiene la integridad de las capas íntima, media y adventicia. Así, se puede descartar entidades claramente patológicas, como la ruptura de la elastina, que facilitarían la proliferación anómala de células musculares de la capa íntima. La hipertrofia observada puede ser resultado de un cambio en el fenotipo de las células musculares lisas, facilitado su proliferación, y sería interesante medir cuantas de ellas se encuentran en fenotipo proliferativo o sintetizador de material de la matriz extracelular. En este sentido, no tenemos una clara evidencia de que se trata de una hipertrofia debida al incremento de un solo componente de la pared vascular (por ejemplo el colágeno o las células musculares lisas) sino a un incremento del grosor de la capa media en su totalidad. Esto está reforzado por el hecho de que no se han observado anomalías en las características histológicas de la pared de la aorta, por tanto no hay rotura de fibras elásticas, desorden, ni un cambio aparente en las proporciones de aquellos elementos que conforman cada una de las capas.

Como se ha mencionado anteriormente, el cambio en las células musculares lisas de un fenotipo contráctil a un fenotipo proliferativo es un desencadenante importante del proceso de remodelado vascular. Con el fin de establecer las posibles vías moleculares implicadas en la remodelación vascular y el cambio de fenotipo de las células musculares lisas, se llevó a cabo un estudio exhaustivo de diversas vías de señalización que se ha descrito estar relacionadas con 1) la senescencia, 2) la proliferación celular, 3) la apoptosis, 4) la inflamación y la producción de estrés oxidativo.

De todos los genes estudiados, el gen del Hras, un factor muy importante en la proliferación celular, se encuentra incrementado con el envejecimiento y sigue el mismo patrón de cambio dependiente del sexo encontrado en la hipertrofia de la aorta durante el envejecimiento. Los miembros de la familia del gen RAS (entre ellos Hras) fueron los primeros oncogenes identificados como tal³⁴⁰ y es ampliamente conocido que la vía de la familia RAS tiene un rol central en la regulación de la proliferación y la apoptosis³⁴¹⁻³⁴³. La activación de Hras promueve la proliferación y la supervivencia celulares activando diversas rutas metabólicas, entre ellas la vía de las MAP quinasas y la vía AKT/mTOR^{344,345}. Recientemente se ha propuesto una relación entre Hras y AngII por la cual la AngII puede activar a Hras en compartimentos intracelulares (aparto de Golgi y retículo endoplasmático)³⁴² y se ha sugerido que la AngII estimula enzimas de la familia RAS mediante la producción del ácido 20-hidroxicosatotetraenoico (20-HETE) por parte de la vía de las COX³⁴⁶.

En nuestro modelo encontramos que la transcripción de Hras sigue el mismo patrón encontrado en la hipertrofia en la aorta durante el envejecimiento, es decir, partiendo de niveles similares en ambos sexos, en machos existe un incremento de la transcripción de Hras a los 7 meses que permanece igual hasta la finalización del experimento a los 12 meses de edad, mientras que en hembras los niveles de transcripción de Hras permanecen similares a 3 y 7 meses de edad, no siendo hasta los 12 meses que hay un incremento, por el cual alcanzan los niveles que vemos en machos ya a los 7 meses de edad. El tratamiento profiláctico con Losartan desde los 3 meses hasta los 12 meses previene este incremento en ambos sexos, de acuerdo con los resultados encontrados en la medición de la hipertrofia de la aorta y sugiriendo algún tipo de relación.

También se han encontrado cambios en la expresión de genes de la vía AKT-mTOR, implicada en la regulación de muchos factores que pueden contribuir con el remodelado vascular, a saber: regulación del ciclo celular, regulación de la senescencia celular, regulación del metabolismo energético de la célula, regulación de factores de transcripción y regulación de la autofagia, entre otros. Para determinar la contribución de esta vía se llevaron mediciones de diversas enzimas y sustratos que participan en ella, pero las diferencias más significantivas se encontraron en las isoformas de AKT (AKT1 y AKT2), PTEN, RAPTOR y AKT1S1. Los cambios en esta vía metabólica con el

envejecimiento coinciden con los resultados observados con el estudio previo en que utilizamos el modelo de senescencia acelerada (SAM) y dan soporte al modelo de envejecimiento cronológico en CD1 y al rol que proponemos para la vía de la AKT en el proceso de envejecimiento vascular.

La AKT es una enzima clave en el crecimiento celular, ya que promueve la actividad de mTOR, pero también se transloca al núcleo celular donde activa factores de transcripción como FOXO, regulando el ciclo celular²⁴². AKT se encuentra involucrado en la activación de NF-KB en respuesta a TNF α ^{257,258} e inactiva la maquinaria apoptótica de la célula, incluyendo enzimas claves en el desarrollo de la apoptosis como BAD y CASP9³⁴⁷. Por otro lado, su función es compleja si tenemos en cuenta que lleva a cabo diferentes acciones en células endoteliales y en células musculares lisas. En el endotelio promueve la producción de NO mediante la activación eNOS, que a su vez promueve la supervivencia de la célula endotelial nitrosilando residuos de cisteína en caspasas^{348,349}. En células musculares lisas participa en proliferación³⁵⁰ y en migración, incluyendo la activación de metaloproteasas para degradar matriz extracelular y remodelado de filamentos de actina^{351,352}. Las dos isoformas de AKT en las que hemos hallado cambios a lo largo del envejecimiento se ven incrementadas por igual en machos y hembras, por tanto no consideramos que esta enzima sea la responsable de las diferencias asociadas al sexo encontradas en ninguno de los casos reportados en esta tesis.

RAPTOR incrementa la señal ejercida por la estimulación por nutrientes. Actúa sobre el factor de transcripción S6K1, ayuda a mantener el tamaño de la célula y la expresión de mTOR, pero por otro lado su asociación con mTOR mantiene a esta última enzima inhibida. Las condiciones que inhiben la vía metabólica AKT/mTOR, como la falta de nutrientes, estabilizan la unión de RAPTOR y mTOR, manteniendo esta vía metabólica inhibida³⁵³. Como en el caso de AKT, en el caso de RAPTOR las diferencias que hemos hallado a lo largo del envejecimiento se dan por igual independientemente del sexo, por lo que esta enzima no parece ser la responsable de los cambios asociados al sexo.

AKT1S1 es el sustrato de AKT, el cual lo fosforila³⁵⁴. AKT1S1 interactúa con el complejo creado por mTOR y RAPTOR, inhibiendo la proliferación y crecimiento celular, así como inhibiendo la activación del factor de transcripción S6K1³⁵⁵. Como en el caso de RAPTOR y AKT, las diferencias encontradas en AKT1S1 durante el envejecimiento se han dado por igual independientemente del sexo, sugiriendo que esta enzima no se encuentra relacionada con las diferencias asociadas al sexo.

PTEN es conocido como supresor de tumores, ya que inhibe la proliferación, la migración y la supervivencia celulares. PTEN inhibe la vía AKT/mTOR mediante su actividad de fosfatasa lipídica, ya que desfosforila mensajeros secundarios de la vía AKT. Por otro lado, PTEN es sensible al estrés oxidativo, ya que se ve inhibido por la oxidación, creándose un puente disulfuro entre sus residuos de cisteína en las posiciones 71 y 124, afectando a su área catalítica. Se trata de una inhibición reversible.

PTEN puede verse incrementado por acción de p53, lo cual promueve la apoptosis. En el caso de PTEN hemos hallado diferencias asociadas al sexo durante el envejecimiento.

La transcripción de PTEN es invariable a todas las edades en machos, pero en hembras se da un incremento significativo a los 7 meses y se mantiene a los 12 meses. A los 12 meses no se da una diferencia significativa en el incremento de PTEN en hembras, pero creemos que este resultado es debido a dificultades metodológicas (principalmente la disponibilidad de suficientes animales de tan avanzada edad como para poder llevar a cabo más repeticiones de este experimento). La diferencia asociada al sexo en los niveles de transcripción de PTEN sugiere que esta enzima ejerce una función diferente en función del sexo. En vista de este resultado proponemos que PTEN es capaz de actuar protegiendo a las hembras de los efectos deletéreos del envejecimiento, dadas las funciones que lleva a cabo. Así actuaría retrasando la aparición de los efectos del envejecimiento en la vasculatura, tal como se ha visto en la progresión de la hipertrófia o la fibrosis a lo largo de esta tesis²⁴².

Por otro lado, al evaluar si el SRA actúa sobre la transcripción de estas enzimas, se ha observado que el PTEN no ve alterada su transcripción a causa del tratamiento con Losartan. Esto sugiere que se trata de una enzima que promueve una protección cardiovascular en hembras independientemente de la AngII. Las enzimas AKT1 y AKT2 tampoco vieron alterada su transcripción debido al tratamiento con Losartan en machos, pero si en hembras. Por otro lado, tanto RAPTOR como AKT1S1 se ven incrementados en machos debido al tratamiento con Losartan, pero en hembras disminuye su transcripción.

Por lo tanto, el Losartan ejerce un efecto protector en la vasculatura diferente en función del sexo. Este resultado sugiere que el Losartan actúa protegiendo a las hembras de los efectos pro-proliferativos, de supervivencia y de migración propios de la vía de AKT/mTOR mediante la disminución de AKT. Por otro lado en machos ejerce su protección incrementando aquellas enzimas que inhiben la vía de AKT/mTOR impidiendo la actividad de mTOR, es decir, RAPTOR y AKT1S1.

CONCLUSIONES

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less..”

Marie Curie

CONCLUSIONES

Con los resultados de esta tesis se puede concluir que:

Subproyecto 1. Proliferación de células musculares lisas durante el envejecimiento: el papel del miR-21 y la vía AKT/mTOR

1. El inicio del envejecimiento vascular se asocia con la hipertrofia externa de las arterias elásticas y musculares debido a la hiperplasia de las células del músculo liso vascular.
2. La hiperplasia de las células del músculo liso vascular se da por cambios en la vía de señalización de AKT/mTOR durante el envejecimiento que pueden cambiar el fenotipo de esas células a un perfil más proliferativo.
3. El cambio en la expresión de miR-21 en la pared vascular de las arterias senescentes puede ser, en parte, responsable de los cambios en la vía AKT/mTOR y de la hiperplasia en la pared arterial.

Subproyecto 2. La disfunción endotelial mediada por ciclooxigenasas durante el envejecimiento está regulada por angiotensina II de forma diferente en función del sexo.

1. El envejecimiento se asocia con un incremento de la respuesta a angiotensina II en aorta.
2. Los machos envejecidos muestran una disfunción endotelial causada por ciclooxigenasas y mediada por angiotensina II.
3. En hembras envejecidas la función endotelial se preserva gracias a la eNOS y a la prostaglandina PGI₂, a pesar de sufrir el mismo incremento de la respuesta a angiotensina II que los machos.

Subproyecto 3. Diferencias asociadas al sexo en el remodelado durante el envejecimiento vascular: rol del sistema renina-angiotensina.

1. El envejecimiento incrementa el estrés oxidativo e induce una hiperplasia en la aorta siguiendo un patrón diferente en hembras y machos.
2. La angiotensina II es la responsable de la hiperplasia, pero no del estrés oxidativo que se da con el envejecimiento.
3. Existen diferencias asociadas al sexo en la regulación de las vías de señalización de AKT/mTOR y en Hras, así como en su regulación por parte de la angiotensina II.

BIBLIOGRAFÍA

“They say a little knowledge is a dangerous thing, but it's not one half so bad as a lot of ignorance.”

Terry Pratchett

1. Osler, W. *The Principle and practice of medicine* 1987
2. Cooper LT, Cooke JP, Dzau VJ. The vasculopathy of aging. *J Gerontol.* 1994 Sep;49(5):B191-6.
3. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation.* 2003 Jan 7;107(1):139-46.
4. Cevenini E, Bellavista E, Tieri P, Castellani G, Lescai F, Francesconi M, Mishto M, Santoro A, Valensin S, Salvioli S, Capri M, Zaikin A, Monti D, de Magalhães JP, Franceschi C. Systems biology and longevity: an emerging approach to identify innovative anti-aging targets and strategies. *Curr Pharm Des.* 2010;16(7):802-13.
5. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013 Jun 6;153(6):1194-217.
6. Anton B, Vitetta L, Cortizo F, Sali A. Can we delay aging? The biology and science of aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1057:525-35.
7. Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation.* 2003 Jan 28;107(3):490-7.
8. Wang M, Monticone RE, Lakatta EG. Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010 Mar;19(2):201-7.
9. Redheuil A, Yu WC, Wu CO, Mousseaux E, de Cesare A, Yan R, Kachenoura N, Bluemke D, Lima JA. Reduced ascending aortic strain and distensibility: earliest manifestations of vascular aging in humans. *Hypertension.* 2010 Feb;55(2):319-26.
10. Lakatta EG. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Jun;83:1-13.
11. Cohen BE, Edmondson D, Kronish IM. State of the Art Review: Depression, Stress, Anxiety, and Cardiovascular Disease. *Am J Hypertens.* 2015 Nov;28(11):1295-302.
12. Niranjana A, Corujo A, Ziegelstein RC, Nwulia E. Depression and heart disease in US adults. *Gen Hosp Psychiatry.* 2012 May-Jun;34(3):254-61
13. Whooley MA, Wong JM. Depression and cardiovascular disorders. *Annu Rev Clin Psychol.* 2013;9:327-54.
14. Ayerbe L, Ayis S, Wolfe CD, Rudd AG. Natural history, predictors and outcomes of depression after stroke: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry.* 2013 Jan;202(1):14-21.
15. Shen BJ, Avivi YE, Todaro JF, Spiro A 3rd, Laurenceau JP, Ward KD, Niaura R. Anxiety characteristics independently and prospectively predict myocardial infarction in men the unique contribution of anxiety among psychologic factors. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Jan 15;51(2):113-9.
16. Huffman JC, Smith FA, Blais MA, Januzzi JL, Fricchione GL. Anxiety, independent of depressive symptoms, is associated with in-hospital cardiac complications after acute myocardial infarction. *J Psychosom Res.* 2008 Dec;65(6):557-63.
17. Mathers C, Leonardi M. Global Burden of Dementia in the Year 2000: Summary of Methods and Data Sources. *GBD 2000 Working Paper.* Geneva: World Health Organization; 2000.
18. Ritchie K, Lovestone S. The dementias. *Lancet.* 2002 Nov 30;360(9347):1759-66.
19. Justin BN, Turek M, Hakim AM. Heart disease as a risk factor for dementia. *Clin Epidemiol.* 2013 Apr 26;5:135-45
20. Reitz C. Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2013 Mar;15(3):307
21. Newman A, Fitzpatrick A, Lopez O, et al. Dementia and Alzheimer's disease incidence in relationship to cardiovascular disease in the Cardiovascular Health Study cohort. *J Am Geriatr Soc.* 2005;53(7):1101-1107.

22. Roberts RO, Knopman DS, Geda YE, Cha RH, Roger VL, Petersen RC. Coronary heart disease is associated with non-amnesic mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2010;31(11):1894–1902.
23. Freiheit EA, Hogan DB, Eliasziw M, et al. A dynamic view of depressive symptoms and neurocognitive change among patients with coronary artery disease. *Arch Gen Psychiatry*. 2012;69(3):244–255.
24. Stellos K, Katsiki N, Tatsidou P, Bigalke B, Laske C. Association of platelet activation with vascular cognitive impairment: implications in dementia development? *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;Jan 20; Epub.
25. Soneira CF, Scott TM. Severe cardiovascular disease and Alzheimer's disease: senile plaque formation in cortical areas. *Clin Anat*. 1996;9:118–127.
26. Rosano C, Naydeck B, Kuller LH, et al. Coronary artery calcium: associations with brain magnetic resonance imaging abnormalities and cognitive status. *J Am Geriatr Soc*. 2005;53:609–615.
27. Kovacic JC, Castellano JM, Fuster V. The links between complex coronary disease, cerebrovascular disease, and degenerative brain disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1254:99–105.
28. Kovacic JC, Moreno P, Nabel EG, et al. Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 2 of a 2-part review: clinical vascular disease in the elderly. *Circulation*. 2011;123:1900–1910.
29. Afsar B, Turkmen K, Covic A, Kanbay M. an update on coronary artery disease and chronic kidney disease. *Int J Nephrol*. 2014;2014:767424.
30. Costa SP, Jayne JE, Friedman SE, Lentine KL. Cardiac catheterization in the dialysis population in 2012: we know more, but much remains unknown. *Semin Dial*. 2012 May;25(3):257–62.
31. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray D, Barre PE. Outcome and risk factors of ischemic heart disease in chronic uremia. *Kidney Int*. 1996 May. 49(5):1428–34.
32. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney International* 2000.58(1):353–362
33. Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR, Coresh J. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005.16(29):529–538.
34. Himmelfarb J, McMenamin E, McMonagle E. Plasma aminothiols oxidation in chronic hemodialysis patients. *Kidney International* 2002. 61(2):705–716.
35. Lekawanvijit S, Kompa AR, Manabe M, Wang BH, Langham RG, Nishijima F, Kelly DJ, Krum H. Chronic kidney disease-induced cardiac fibrosis is ameliorated by reducing circulating levels of a non-dialysable uremic toxin, indoxyl sulfate. *PLoS One*. 2012;7(7):e41281.
36. Neiryneck N1, Glorieux G, Boelaert J, Schepers E, Liabeuf S, Dhondt A, Massy Z, Vanholder R. Uremia-related oxidative stress in leukocytes is not triggered by β 2-microglobulin. *J Ren Nutr*. 2013 Nov;23(6):456–63.
37. Jafar TH, Stark PC, Schmid CH, Landa M, Maschio G, de Jong PE, de Zeeuw D, Shahinfar S, Toto R, Levey AS; AIPRD Study Group. Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2003 Aug 19;139(4):244–52.
38. Flather MD, Yusuf S, Køber L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moyé L, Braunwald E. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet*. 2000 May 6;355(9215):1575–81.
39. Shaw LJ, Bairey Merz CN, Pepine CJ, Reis SE, Bittner V, Kelsey SF, Olson M, Johnson BD, Mankad S, Sharaf BL, Rogers WJ, Wessel TR, Arant CB, Pohost GM, Lerman A, Quyyumi AA, Sopko G; WISE Investigators. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia

- Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part I: gender differences in traditional and novel risk factors, symptom evaluation, and gender-optimized diagnostic strategies. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Feb 7;47(3 Suppl):S4-S20.
40. Pereira TM, Nogueira BV, Lima LC, Porto ML, Arruda JA, Vasquez EC, Meyrelles SS. Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. *Lipids Health Dis*. 2010 Aug 19;9:87.
 41. Takenouchi Y, Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. *Atherosclerosis*. 2009 Oct;206(2):397-404.
 42. Bairey Merz CN, Shaw LJ, Reis SE, Bittner V, Kelsey SF, Olson M, Johnson BD, Pepine CJ, Mankad S, Sharaf BL, Rogers WJ, Pohost GM, Lerman A, Quyyumi AA, Sopko G; WISE Investigators. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part II: gender differences in presentation, diagnosis, and outcome with regard to gender-based pathophysiology of atherosclerosis and macrovascular and microvascular coronary disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Feb 7;47(3 Suppl):S21-9.
 43. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Mattei P, Sudano I, Bernini G, Pinto S, Salvetti A. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women. *Hypertension* 1996. 28:576-582.
 44. Bucciarelli P, Mannucci PM. The hemostatic system through aging and menopause. *Climacteric* 2009. 12(1):47-51.
 45. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017 Mar 7;135(10):e146-e603.
 46. Messerli FH, Garavaglia GE, Schmieder RE, Sundgaard-Riise K, Nunez BD, Amodeo C. Disparate cardiovascular findings in men and women with essential hypertension. *Ann Intern Med*. 1987 Aug;107(2):158-61.
 47. Buja & Butany. *Cardiovascular Pathology*, 4th ed 2016
 48. Ohanian J, Liao A, Forman SP, Ohanian V. Age-related remodeling of small arteries is accompanied by increased sphingomyelinase activity and accumulation of long-chain ceramides. *Physiol Rep*. 2014 May 28;2(5). pii: e12015
 49. Collins JA, Munoz JV, Patel TR, Loukas M, Tubbs RS. The anatomy of the aging aorta. *Clin Anat*. 2014 Apr;27(3):463-6.
 50. Donato AJ, Gano LB, Eskurza I, Silver AE, Gates PE, Jablonski K, Seals DR. Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Jul;297(1):H425-32.
 51. Gerstenblith G, Frederiksen J, Yin FC, Fortuin NJ, Lakatta EG, Weisfeldt ML. Echocardiographic assessment of a normal adult aging population. *Circulation*. 1977 Aug;56(2):273-8.
 52. Virmani R, Avolio AP, Mergner WJ, Robinowitz M, Herderick EE, Cornhill JF, Guo SY, Liu TH, Ou DY, O'Rourke M. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *Am J Pathol*. 1991 Nov;139(5):1119-29.
 53. Sugawara J, Hayashi K, Yokoi T, Tanaka H. Age-associated elongation of the ascending aorta in adults. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2008 Nov;1(6):739-48.

54. Wang M, Zhang J, Spinetti G, Jiang LQ, Monticone R, Zhao D, Cheng L, Krawczyk M, Talan M, Pintus G, Lakatta EG. Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *Am J Pathol* 167: 1429–1442, 2005.
55. Jiang L1, Wang M, Zhang J, Monticone RE, Telljohann R, Spinetti G, Pintus G, Lakatta EG. Increased aortic calpain-1 activity mediates age-associated angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *PLoS One*. 2008 May 21;3(5):e2231.
56. Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, Vatner SF, Lakatta EG. Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension*. 2003 Jun;41(6):1308-16. Epub 2003 May 12.
57. Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, Vatner SF, Lakatta EG. Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension* 2003. 41: 1308–1316
58. Wang M, Zhao D, Spinetti G, Zhang J, Jiang LQ, Pintus G, Monticone R, Lakatta EG. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jul;26(7):1503-9. Epub 2006 May 11.
59. Wang M, Zhang J, Jiang LQ, Spinetti G, Pintus G, Monticone R, Kolodgie FD, Virmani R, Lakatta EG. Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertension* 50: 219–227, 2007.
60. Spinetti G, Wang M, Monticone R, Zhang J, Zhao D, Lakatta EG. Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Aug;24(8):1397-402. Epub 2004 Jun 3.
61. Asai K, Kudej RK, Shen YT, Yang GP, Takagi G, Kudej AB, Geng YJ, Sato N, Nazareno JB, Vatner DE, Natividad F, Bishop SP, Vatner SF. Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Jun;20(6):1493-9.
62. Lakatta EG, Mitchell JH, Pomerance A, Rowe GG. Human aging: changes in structure and function. *J Am Coll Cardiol*. 1987 Aug;10(2 Suppl A):42A-47A.
63. Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension* 2005. 45:1050–1055.
64. Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005. 25:932–943.
65. Laurent S, Boutouyrie P. Recent advances in arterial stiffness and wave reflection in human hypertension. *Hypertension highlights*. *Hypertension* 2007. 49:1202–1206.
66. Sutton-Tyrrell K, Najjar SS, Boudreau RM, Venkitachalam L, Kupelian V, Simonsick EM, Health ABC Study. Elevated aortic pulse wave velocity, a marker of arterial stiffness, predicts cardiovascular events in well functioning older adults. *Circulation* 2005. 111:3384–3390.
67. Stehouwer CD, Henry RM, Ferreira I. Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease. *Diabetologia* 2008. 51:527–539.
68. Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging* 2012. 4:166–175.
69. Alonso-Fernández P, De la Fuente M. Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci* 2011. 4:78–100.
70. Scuteri A, Orru M, Morrell C, Piras MG, Taub D, Schlessinger D, et al. Independent and additive effects of cytokine patterns and the metabolic syndrome on arterial aging in the SardiNIA Study. *Atherosclerosis* 2011. 215:459–464.
71. Salvioli S, Monti D, Lanzarini C, Conte M, Pirazzini C, Bacalini MG. Immune system, cell senescence, aging and longevity: Inflammaging reappraised. *Curr Pharm Des* 2013. 19:1675–1679.

BIBLIOGRAFÍA

72. Green, D.R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 2011. 333:1109–1112.
73. Barzilai, N., Huffman, D.M., Muzumdar, R.H., and Bartke, A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* 2012. 61:1315–1322.
74. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* 2010. 10:36–46.

75. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest.* 1994 Jan;93(1):50-5.
76. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002 Apr 2;105(13):1567-72
77. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74.
78. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003.23(2):168-75.
79. Yildiz O. Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2007.1100:353-60.
80. Ferrari AU1, Radaelli A, Centola M. Invited review: aging and the cardiovascular system. *J Appl Physiol.* 2003. 95(6):2591-7.
81. Matz RL, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction: potential implications for pharmacotherapy. *Drugs Aging* 2003, 20:527–550
82. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc. Res.* 2005. 66:286–294
83. Wallace SM, Yasmin, McEniery CM, Mäki-Petäjä KM, Booth AD, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Isolated systolic hypertension is characterized by increased aortic stiffness and endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2007 Jul;50(1):228-33
84. Burnett AL. The role of nitric oxide in erectile dysfunction: implications for medical therapy. *J Clin Hypertens.* 2006.8(12 Suppl 4):53-62.
85. Csiszar A, Toth J, Peti-Peterdi J, Ungvari Z. The aging kidney: role of endothelial oxidative stress and inflammation. *Acta Physiol Hung.* 2007 Mar;94(1-2):107-15.
86. Price JM, Hellermann A, Hellermann G, Sutton ET. Aging enhances vascular dysfunction induced by the Alzheimer's peptide beta-amyloid. *Neurol Res.* 2004.26(3):305-11.
87. Kunieda T, Minamino T, Miura K, Katsuno T, Tateno K, Miyauchi H, Kaneko S, Bradfield CA, FitzGerald GA, Komuro I. Reduced nitric oxide causes age-associated impairment of circadian rhythmicity. *Circ Res.* 2008 Mar 14;102(5):607-14.
88. Sanada M, Taguchi A, Higashi Y, Tsuda M, Kodama I, Yoshizumi M, Ohama K. Forearm endothelial function and bone mineral loss in postmenopausal women. *Atherosclerosis.* 2004. 176(2):387-92.
89. Coleman HR, Chan CC, Ferris FL 3rd, Chew EY. Age-related macular degeneration. *Lancet.* 2008 Nov 22;372(9652):1835-45
90. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012. 33(7):829-37
91. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 1996.79(5):984- 91.
92. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001. 280(2):F193-206.

93. Tanaka, Y.; Tang, G.; Takizawa, K.; Otsuka, K.; Eghbali, M.; Song, M.; Nishimaru, K.; Shigenobu, K.; Koike, K.; Stefani, E.; Toro, L. Kv Channels Contribute to Nitric Oxide- and Atrial Natriuretic Peptide-Induced Relaxation of a Rat Conduit Artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005. 317 (1): 341–354
94. Stamer WD, Lei Y, Boussommier-Calleja A, Overby DR, Ethier CR. eNOS, a pressure-dependent regulator of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Dec 9;52(13):9438-44
95. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002. 109 Suppl:S81-96.
96. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):214-20.
97. Berkowitz DE, White R, Li D, Minhas KM, Cernetich A, Kim S, Burke S, Shoukas AA, Nyhan D, Champion HC, Hare JM. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation.* 2003.108(16):2000-6. Epub 2003 Sep 29.
98. White AR, Ryoo S, Li D, Champion HC, Stepan J, Wang D, Nyhan D, Shoukas AA, Hare JM, Berkowitz DE. Knockdown of arginase I restores NO signaling in the vasculature of old rats. *Hypertension.* 2006.(2):245-51. Epub 2005 Dec 27.
99. Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004.24(3):413-20. Epub 2003 Dec 4.
100. Cosentino F, Katusiá ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation.* 1995. 91(1):139-44.
101. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1997. 99: 41–46.
102. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2000. 86: E36–E41.
103. Cooke JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med.* 2005.10 Suppl 1:S11-7.
104. Gates PE, Boucher ML, Silver AE, Monahan KD, Seals DR. Impaired flow-mediated dilation with age is not explained by L-arginine bioavailability or endothelial asymmetric dimethylarginine protein expression. *J Appl Physiol* 2007.102(1):63-71. Epub 2006 Aug 31.
105. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martíásek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res.* 2003 Feb. (2):121-7.
106. Csiszar A, Smith K, Labinskyy N, Orosz Z, Rivera A, Ungvari Z. Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006. 291(4):H1694-9.
107. de Sotomayor MA, Pérez-Guerrero C, Herrerra MD, Jimenez L, Marín R, Marhuenda E, Andriantsitohaina R. Improvement of age-related endothelial dysfunction by simvastatin: effect on NO and COX pathways. *Br J Pharmacol.* 2005.146(8):1130-8.
108. Hamilton JR, Cocks TM. Heterogeneous mechanisms of endothelium-dependent relaxation for thrombin and peptide activators of protease-activated receptor-1 in porcine isolated coronary artery. *Br J Pharmacol.* 2000. 130(1):181-8.
109. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 2001.103(9):1282-8.
110. Adler A, Messina E, Sherman B, Wang Z, Huang H, Linke A, Hintze TH. NAD(P)H oxidase-generated superoxide anion accounts for reduced control of myocardial O2 consumption by NO in old Fischer 344 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003. 285(3):H1015-22.

111. Csiszar A, Pacher P, Kaley G, Ungvari Z. Role of oxidative and nitrosative stress, longevity genes and poly(ADP-ribose) polymerase in cardiovascular dysfunction associated with aging. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005;(3):285-91.
112. Francia P, delli Gatti C, Bachschmid M, Martin-Padura I, Savoia C, Migliaccio E, Pelicci PG, Schiavoni M, Lüscher TF, Volpe M, Cosentino F. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation*. 2004. 110(18):2889-95. Epub 2004 Oct 25.
113. Van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Lüscher TF. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000;192(12):1731-44.
114. Kaji T, Kaieda I, Hisatsune T, Kaminogawa S. 3-Morpholinopyridone hydrochloride induces p53-dependent apoptosis in murine primary neural cells: a critical role for p21(ras)-MAPK-p19(ARF) pathway. *Nitric Oxide*. 2002. 6(2):125-34.
115. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007. 87(1):315-424.
116. Macfadyen AJ, Reiter C, Zhuang Y, Beckman JS. A novel superoxide dismutase-based trap for peroxynitrite used to detect entry of peroxynitrite into erythrocyte ghosts. *Chem Res Toxicol* 1999;12:223–229.
117. Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3566–3571.
118. Beckman JS. Ischaemic injury mediator. *Nature* 1990;345:27–28.
119. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620–1624.
120. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1996;9:836–844.
121. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 2003;25:295–311.
122. Radi R. Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem Res Toxicol* 1998;11:720–721.
123. Lymar SV, Hurst JK. Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or cellular protectant? *Chem Res Toxicol* 1996;9:845–850.
124. Lymar SV, Hurst JK. Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants. *Chem Res Toxicol* 1995;8:833–840
125. Lymar SV, Jiang Q, Hurst JK. Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxynitrite. *Biochemistry* 1996;35:7855–7861.
126. Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CC, De Menezes SL. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 2002;32:841–859.
127. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298– 300.
128. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005;120:483–495.
129. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014.24(10):R453-62.
130. Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia. *Am J Pathol* 2001.159:1301-11.
131. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews* 1999. 20(5):649–688

132. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011. 1812(8):1007–1022, 2011.
133. Kwak BR, Mulhaupt F, Mach F. The role of PPAR γ ligands as regulators of the immune response. *Drug News and Perspectives*. 2002. 15(6):325–332
134. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 1995. 83(5): 803–812
135. Sarada S, Himadri P, Mishra C, Geetali P, Ram MS, Ilavazhagan G. Role of oxidative stress and NF κ B in hypoxia-induced pulmonary edema. *Exp Biol Med*. 2008. 233(9):1088-98.
136. Lee RT, Collins T. Nuclear factor- κ B and cell survival. *Circ Res* 2001. 88:262-64.
137. Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, Cheshire N, Paleolog E, Feldmann M. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004. 101 (15): 5634–9
138. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 2004. 11:1163-82.
139. Pierre J, Buckingham J, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002. 277: 44784-44790.
140. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 2002. 368: 545-553.
141. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Usumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999. 85: 357-363.
142. Gorlach A, Brandes R, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 2000. 87:26-32
143. Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 2004. 90:491-493.
144. Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 2004. 109:227-33.
145. Touyz RM, Chen X, Tabet F. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 2002. 90:1205-13.
146. Li WG, Stoll LL, Rice JB, Xu SP, Miller FJ Jr, Chatterjee P, et al. Activation of NAD(P)H oxidase by lipid hydroperoxides: mechanism of oxidant-mediated smooth muscle cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2003. 34:937-46.
147. Masferrer JL, Zweifel BS, Seibert S. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexametasone and endotoxin in mice. *J Clin Invest*. 1996. 86:1375-9
148. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, Smith WL. Differential intracellular locations for prostaglandin endoperoxidase H synthetase-1 and -2. *J Biol Chem*. 1995. 270:10902-908
149. Balsinde J, Balboa MA, Denis EA. Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. 95:7951-56
150. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011.(5):986-1000

151. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther.* 2004 Aug;103(2):147-66.
152. Liu X, Bee D, Barer GR. Role of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in pulmonary vascular control in isolated perfused lungs of ferrets, rats and rabbits. *Exp Physiol.* 1999 . 84(5):907-16.
153. Datta PK, Dhupar S, Lianos EA. Regulatory effects of inducible nitric oxide synthase on cyclooxygenase-2 and heme oxygenase-1 expression in experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006.21(1):51-7. Epub 2005 Oct 4.
154. Díaz-Cazorla M, Pérez-Sala D, Lamas S. Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999 May;10(5):943-52.
155. Young W, Mahboubi K, Haider A, Li I, Ferreri NR. Cyclooxygenase-2 is required for tumor necrosis factor-alpha- and angiotensin II-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res .* 2000. 86: 906–914.
156. Macia-Heras 2012
157. Cardiovascular Pathology, Buja & Butany 4th ed 2016
158. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.* 2000. 52:639–672.
159. Cassis P, Conti S, Remuzzi G, Benigni A. Angiotensin receptors as determinants of life span. *Eur J Physiol* 2010. 459:325–332
160. Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006. 17:2985–2991
161. Shanmugam S, Sandberg K. Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biol Int* 1996. 20:169–176
162. Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation* 1999. 99, 392–399.
163. Eguchi S, Inagami T. Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept* 2000. 91, 13–20.
164. Touyz RM, Wu XH, He G, Park JB, Chen X, Vacher J, Rajapurohitam V, Schiffrin EL. Role of c-Src in the regulation of vascular contraction and Ca²⁺ signaling by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2001. 19, 441–449.
165. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox – role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2003). 23, 981–987.
166. Min LJ, Mogi M, Iwai M, Horiuchi M. Signaling mechanisms of angiotensin II in regulating vascular senescence. *Ageing Res. Rev.* 2009,b8, 113–121.
167. Benigni A, Corna D, Zoja C, Sonzogni A, Latini R, Salio M, Conti S, Rottoli D, Longaretti L, Cassis P, Morigi M, Coffman TM, Remuzzi G. Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *J Clin Invest.* 2009.119(3):524-30.
168. Modrick ML, Didion SP, Sigmund CD, Faraci FM. Role of oxidative stress and AT1 receptors in cerebral vascular dysfunction with aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009.296(6):H1914-9.
169. Ito N, Ohishi M, Yamamoto K, Tatara Y, Shiota A, Hayashi N, Komai N, Yanagitani Y, Rakugi H, Ogihara T. Renin-angiotensin inhibition reverses advanced cardiac remodeling in aging spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2007. 20(7):792-9.
170. Ferder LF, Inserra F, Basso N. Advances in our understanding of aging: role of the renin-angiotensin system. *Curr Opin Pharmacol.* 2002 Apr;2(2):189-94.

171. Lin X, Zhan JK, Wang YJ, Tan P, Chen YY, Deng HQ, Liu YS. Function, Role, and Clinical Application of MicroRNAs in Vascular Aging. *Biomed Res Int*. 2016. 2016:6021394
172. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004. 116(2):281-97.
173. Menghini R, Stöhr R, Federici M. MicroRNAs in vascular aging and atherosclerosis. *Ageing Res Rev*. 2014.17:68-78.
174. Lee S, Choi E, Cha MJ, Park AJ, Yoon C, Hwang KC. Impact of miRNAs on cardiovascular aging. *J Geriatr Cardiol*. 2015. 12(5):569-74.
175. Harries LW. MicroRNAs as mediators of the ageing process. *Genes (Basel)* 2014. 5: 656–670.
176. Chen LH, Chiou GY, Chen YW, et al. MicroRNA and aging: a novel modulator in regulating the aging network. *Ageing Res Rev* 2010. 9 (Suppl 1): S59–S66.
177. Grigoriev A, Bonini NM. Age-dependent patterns of microRNA RISC loading. *Aging (Albany NY)* 2014; 6: 705–706.
178. Weilner S, Grillari-Voglauer R, Redl H, et al. The role of microRNAs in cellular senescence and age-related conditions of cartilage and bone. *Acta Orthop* 2015. 86: 92–99.
179. Mimura S, Iwama H, Kato K, et al. Profile of microRNAs associated with aging in rat liver. *Int J Mol Med* 2014. 34: 1065–1072.
180. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol*. 2000. 19(7):597-614.
181. Jung HJ, Suh Y. MicroRNA in aging: from discovery to biology. *Curr Genomics* 2012; 13: 548–557. 182. Staszal 2011.
183. Pezzolesi MG, Platzer P, Waite KA, Eng C. Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in Cowden syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008. 82(5):1141-9.
184. Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010.393(4):643-8.
185. Zhou J, Wang KC, Wu W, Subramaniam S, Shyy JY, Chiu JJ, Li JY, Chien S. MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators-activated receptor- α in an autoregulatory loop to modulate flow-induced endothelial inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011.108(25):10355-60.
186. Stein JJ, Iwuchukwu C, Maier KG, Gahtan V. Thrombospondin-1-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation are functionally dependent on microRNA-21. *Surgery*. 2014.155(2):228-33.
187. Zhao J, Tang N, Wu K, Dai W, Ye C, Shi J, Zhang J, Ning B, Zeng X, Lin Y. MiR-21 simultaneously regulates ERK1 signaling in HSC activation and hepatocyte EMT in hepatic fibrosis. *PLoS One*. 2014. 9(10):e108005.
188. Li J, Zhao L, He X, Yang T, Yang K. MiR-21 inhibits c-Ski signaling to promote the proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*. 2014.26(4):724-9.
189. Wang M, Li W, Chang GQ, Ye CS, Ou JS, Li XX, Liu Y, Cheang TY, Huang XL, Wang SM. MicroRNA-21 regulates vascular smooth muscle cell function via targeting tropomyosin 1 in arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011. 31(9):2044-53.
190. Li J, Zhao L, He X, Yang T, Yang K. MiR-21 inhibits c-Ski signaling to promote the proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*. 2014. 26(4):724-9.
191. Jin, Zhao, Yu, Xu, Fu. MicroRNA-21 mediates the rapamycin-induced suppression of endothelial proliferation and migration. *FEBS Letters*, 2013. 587(4):378–385
192. Cao, Zhang, Zheng, Dong. MicroRNA-146^a and -21 cooperate to regulate vascular smooth muscle cell proliferation via modulation of the Notch signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 2015. 11(4):2889–2895

193. Li HW, Xie Y, Li F, Sun GC, Chen Z, Zeng HS. Effect of miR-19a and miR-21 on the JAK/STAT signaling pathway in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Exp Ther Med*. 2016 Jun;11(6):2531-2536. Epub 2016 Mar 24.
194. Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Curr Mol Med*. 2012 Jan;12(1):27-33.
195. Qin, Cao, Yang, Xiao, Lu. MicroRNA-221/222 regulate ox-LDL-induced endothelial apoptosis via Ets-1/p21 inhibition. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015. 405(1-2):115–124
196. Liu, Cheng, Yang, Xu, Zhang. Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: molecular mechanism and therapeutic application. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2012 52(1):245–255, 2012.
197. Mackenzie NC, Staines KA, Zhu D, Genever P, Macrae VE. miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular calcification. *Cell Biochem Funct*. 2014.32(2):209-16.
198. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009. 460(7256):705-10.
199. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*. 2009.460(7254):529-33.
200. Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham Study. *Am J Med*. 1984. 76:4–12.
201. Thelle D. Women and coronary heart disease: a review with special emphasis on some risk factors. *Lipid Rev*. 1990. 4:33–39.
202. Thom TJ, Epstein FH, Feldman JJ, Leaverton PE, Wolz M. Total Mortality and Mortality From Heart Disease, Cancer and Stroke From 1950 to 1987 in 27 Countries. Bethesda, Md: National Institutes of Health, 1992. NIH publication 92–3088.
203. Kuhn FE, Rackley CE. Coronary artery disease in women: risk factors, evaluation, treatment, and prevention. *Arch Intern Med*. 1993. 153:2626–2636.
204. WHO MONICA Project (prepared by Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas A-M, Pajak A). Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project: registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation*. 1994. 90:583–612.
205. Njolstad I, Arnesen E, Lund-Larsen PG. Smoking, serum lipids, blood pressure, and sex differences in myocardial infarction: a 12-year follow-up of the Finnmark Study. *Circulation*. 1996. 93:450–456.
206. Rich-Edwards JW, Manson JAE, Hennekens CH, Buring JE. The primary prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*. 1995. 332:1758–1766.
207. Jackson R, Chambless L, Higgins M, Kuulasmaa K, Wijnberg L, Williams D (WHO MONICA Project, and ARIC Study). Sex difference in ischaemic heart disease mortality and risk factors in 46 communities: an ecologic analysis. *Cardiovasc Risk Factors*. 1997. 7:43–54.
208. Pekka Jousilahti, MD; Erkki Vartiainen, MD; Jaakko Tuomilehto, MD; Pekka Puska, MD. A Prospective Follow-Up Study of 14 786 Middle-Aged Men and Women in Finland. *Circulation*. 1999. 99:1165-1172
209. Jackson 1997
210. Rodica E. Petrea, MD; Alexa S. Beiser, PhD; Sudha Seshadri, MD; Margaret Kelly-Hayes, RN, EdD; Carlos S. Kase, MD; Philip A. Wolf, MD Gender Differences in Stroke Incidence and Poststroke Disability in the Framingham Heart Study. *Stroke*, 2009. 40:1032-1037.

211. Bousser MG, Eschwege E, Haguenu M, Lefauconnier JM, Thibault N, Touboul D, Touboul PJ. "AICLA" controlled trial of aspirin and dipyridamole in the secondary prevention of atherothrombotic cerebral ischemia. *Stroke*. 1983. 14:5–14.
212. Novella 2010
213. Bish LT, Yarchoan M, Sleeper MM, Gazzara JA, Morine KJ, Acosta P, Barton ER, Sweeney HL Chronic losartan administration reduces mortality and preserves cardiac but not skeletal muscle function in dystrophic mice. *PLoS One* 2011. 6, e20856.
214. Spurney, C.F., Sali, A., Gueron, A.D., Iantorno, M., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., Rayavarapu, S., van der Meulen, J., Hoffman, E.P., Nagaraju, K. Losartan decreases cardiac muscle fibrosis and improves cardiac function in dystrophin-deficient mdx mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2011. 16, 87–95.
215. Dantas AP, Onetti Y, Oliveira MA, Carvalho MH, Heras M, Vila E, Jiménez-Altayó F. Western diet consumption promotes vascular remodeling in non-senescent mice consistent with accelerated senescence, but does not modify vascular morphology in senescent ones. *Exp Gerontol.* 2014 Jul;55:1-11.
216. Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry*. 1982;74(1):153-6.
217. Jimenez-Altayo F, Onetti Y, Heras, M, Dantas, AP, Vila E. Western-style diet modulates contractile responses to phenylephrine differently in mesenteric arteries from senescence-accelerated prone (SAMP8) and resistant (SAMR1) mice. *Age (Dordr.)* 2013, 35.
218. Novensa L, Novella S, Medina P, Segarra G, Castillo N, Heras M, Hermenegildo C, Dantas AP. Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER α /ER β balance in female mice. *PLoS One* 2011. 6, e25335.
219. Parasuraman S, Raveendran R. Measurement of invasive blood pressure in rats. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2012. 3:172–177.
220. Onetti Y, Jimenez-Altayo F, Heras M, Vila E, Dantas AP. Western-type diet induces senescence, modifies vascular function in non-senescent mice and triggers adaptive mechanisms in senescent ones. *Exp. Gerontol.* 2013. 48:1410–1419.
221. Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Zhang WX, Taubman MB, Reis ED. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Feb;20(2):335-42.
222. Roqué M, Reis ED, Cordon-Cardo C, Taubman MB, Fallon JT, Fuster V, Badimon JJ. Effect of p27 deficiency and rapamycin on intimal hyperplasia: in vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model. *Lab Invest.* 2001 Jun;81(6):895-903.
223. Novensa L, Novella S, Medina P, Segarra G, Castillo N, Heras M, Hermenegildo C, Dantas AP. Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER α /ER β balance in female mice. *PLoS One.* 2011;6(9):e25335
224. Dantas AP, Jiménez-Altayó F, Vila E. Vascular aging: facts and factors. *Front Physiol.* 2012 Aug 10;3:325.
225. Dantas AP, Onetti Y, Oliveira MA, Carvalho MH, Heras M, Vila E, Jiménez-Altayó F. Western diet consumption promotes vascular remodeling in non-senescent mice consistent with accelerated senescence, but does not modify vascular morphology in senescent ones. *Exp Gerontol.* 2014 Jul;55:1-11
226. Novella S, Dantas AP, Segarra G, Novensa L, Heras M, Hermenegildo C, Medina P. Aging enhances contraction to thromboxane A₂ in aorta from female senescence-accelerated mice. 2013. *Age* 35:117–128.
227. Novella S, Dantas AP, Segarra G, Vidal-Gómez X, Mompeón A, Garabito M, Hermenegildo C, Medina P. Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-

- accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression. *Exp Gerontol*. 2013. 48(11):1329-37
228. Vidal-Gomez X, Perez-Monzo I, Mompeon A, Segarra G, Dantas AP, Hermenegildo C, Medina P, Novella S. Timing of blood pressure and vascular changes induced by ageing in aorta and small mesenteric arteries from female senescence-accelerated mouse prone (Samp8). *J. Hypertens*. 2015 . 33 (Suppl 1), e26.
229. Ota H, Akishita M, Akiyoshi T, Kahyo T, Setou M, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Testosterone deficiency accelerates neuronal and vascular aging of SAMP8 mice: protective role of eNOS and SIRT1. *PLoS One*. 2012;7(1):e29598
230. Wang M, Monticone RE, Lakatta EG. Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010 Mar;19(2):201-7.
231. Harvey A, Montezano AC, Touyz RM. Vascular biology of ageing-Implications in hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Jun;83:112-21.
232. de Picciotto NE, Gano LB, Johnson LC, Martens CR, Sindler AL, Mills KF, Imai S, Seals DR. Nicotinamide mononucleotide supplementation reverses vascular dysfunction and oxidative stress with aging in mice. *Aging Cell*. 2016 Jun;15(3):522-30.
233. Zhu BH, Ueno M, Matsushita T, Fujisawa H, Seriu N, Nishikawa T, Nishimura Y, Hosokawa M. Effects of aging and blood pressure on the structure of the thoracic aorta in SAM mice: a model of age-associated degenerative vascular changes. *Exp Gerontol*. 2001 Jan;36(1):111-24.
234. Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension*. 2005 Sep;46(3):454-62. Epub 2005 Aug 15.
235. Michael JM, Hayakawa JM. Pooling academic resources for public health. *World Health Forum*. 1994;15(3):282-3.
236. Li Z, Froehlich J, Galis ZS, Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension*. 1999 Jan;33(1):116-23.
237. Reis ED, Roqué M, Cordon-Cardo C, Drobnjak M, Fuster V, Badimon JJ. Apoptosis, proliferation, and p27 expression during vessel wall healing: time course study in a mouse model of transluminal femoral artery injury. *J Vasc Surg*. 2000 Nov;32(5):1022-9.
238. Ciudad P, Moreno-Domínguez A, Novensá L, Roqué M, Barquín L, Heras M, Pérez-García MT, López-López JR. Characterization of ion channels involved in the proliferative response of femoral artery smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Jun;30(6):1203-11
239. Garrido-Martín EM, Blanco FJ, Roqué M, Novensà L, Tarocchi M, Lang UE, Suzuki T, Friedman SL, Botella LM, Bernabéu C. Vascular injury triggers Krüppel-like factor 6 mobilization and cooperation with specificity protein 1 to promote endothelial activation through upregulation of the activin receptor-like kinase 1 gene. *Circ Res*. 2013 Jan 4;112(1):113-27.
240. Hutter R, Sauter BV, Reis ED, Roque M, Vorchheimer D, Carrick FE, Fallon JT, Fuster V, Badimon JJ. Decreased reendothelialization and increased neointima formation with endostatin overexpression in a mouse model of arterial injury. *Circulation*. 2003 Apr 1;107(12):1658-63.
241. Roqué M, García-Madrid C, Reis ED. [Advances in the medical and minimally invasive treatment of chronic ischemia of lower limbs]. *Med Clin (Barc)*. 2003 Jan 18;120(1):24-30.
242. Berridge MJ. Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans*. 2012 Apr;40(2):297-309.
243. Rice KM, Kinnard RS, Harris R, Wright GL, Blough ER. Effects of aging on pressure-induced MAPK activation in the rat aorta. *Pflugers Arch*. 2005 Jun;450(3):192-9.
244. Rice KM, Kinnard RS, Wright GL, Blough ER. Aging alters vascular mechanotransduction: pressure-induced regulation of p70S6k in the rat aorta. *Mech Ageing Dev*. 2005 Nov;126(11):1213-22.

245. Petrich BG, Wang Y. Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies. *Trends Cardiovasc Med*. 2004 Feb;14(2):50-5.
246. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):37-40.
247. Bogoyevitch MA, Clerk A, Sugden PH. Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by pertussis toxin-sensitive and -insensitive pathways in cultured ventricular cardiomyocytes. *Biochem J*. 1995 Jul 15;309 (Pt 2):437-43.
248. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1405-7. Epub 2004 Oct 21.
249. Hosokawa H, Aiuchi S, Kambe T, Hagiwara Y, Kubo T. Mechanical stretch-induced mitogen-activated protein kinase activation is mediated via angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells. *Biol Pharm Bull*. 2002 Dec;25(12):1588-92.
250. Kyosseva SV. Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int Rev Neurobiol*. 2004;59:201-20.
251. Lehoux S, Esposito B, Merval R, Loufrani L, Tedgui A. Pulsatile stretch-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in organ culture of rabbit aorta involves reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Nov;20(11):2366-72.
252. Gennaro G, Ménard C, Giasson E, Michaud SE, Palasis M, Meloche S, Rivard A. Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb 1;23(2):204-10.
254. Hixon M, Muro-Cacho C, Wagner MW, Obejero-Paz C, Millie E, Fujio Y, Kureishi Y, Hassold T, Walsh K, Gualberto A. Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *J Clin Invest*. 2000 Oct;106(8):1011-20.
255. Ackah E, Yu J, Zoellner S, Iwakiri Y, Skurk C, Shibata R, Ouchi N, Easton RM, Galasso G, Birnbaum MJ, Walsh K, Sessa WC. Akt1/protein kinase B is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest*. 2005 Aug;115(8):2119-27.
256. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci*. 2001 Aug;114(Pt 16):2903-10.
257. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999 Sep 2;401(6748):82-5.
258. Romanosha 1999
259. Qian Y, Corum L, Meng Q, Blenis J, Zheng JZ, Shi X, Flynn DC, Jiang BH. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Jan;286(1):C153-63.
260. Fernandez K, Serinagaoglu Y, Hammond S, Martin LT, Martin PT. Mice lacking dystrophin or alpha sarcoglycan spontaneously develop embryonal rhabdomyosarcoma with cancer-associated p53 mutations and alternatively spliced or mutant Mdm2 transcripts. *Am J Pathol*. 2010 Jan;176(1):416-34.
261. Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008;79(4):581-8
262. Fang YC, Yeh CH. Role of microRNAs in Vascular Remodeling. *Curr Mol Med*. 2015;15(8):684-96.
263. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 2007;100: 1579–1588.
264. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 2007. 100: 1579–1588.

265. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004. 84: 767–801
267. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype. *J Biol Chem* 2009. 284: 3728–3738
268. Jin C, Zhao Y, Yu L, Xu S, Fu G. MicroRNA-21 mediates the rapamycin-induced suppression of endothelial proliferation and migration. *FEBS Lett.* 2013 Feb 14;587(4):378-85
269. Wang D, Deuse T, Stubbendorff M, Chernogubova E, Erben RG, Eken SM, Jin H, Li Y, Busch A, Heeger CH, Behnisch B, Reichenspurner H, Robbins RC, Spin JM, Tsao PS, Schrepfer S, Maegdefessel L. Local MicroRNA Modulation Using a Novel Anti-miR-21-Eluting Stent Effectively Prevents Experimental In-Stent Restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Sep;35(9):1945-53
270. Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat. Rev. Genet.* 2007. 8:58–69.
271. Merz, Cheng. Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart* 2016;102:825–831.
272. Kretz M, Mundy AL, Widmer CC, Barton M. Early aging and anatomic heterogeneity determine cyclooxygenase-mediated vasoconstriction to angiotensin II in mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2006, 48:30–33.
273. Tschudi MR, Luscher TF. Age and hypertension differently affect coronary contractions to endothelin-1, serotonin, and angiotensins. *Circulation* 1995. 91:2415–2422.
274. Vamos Z, Cseplo P, Ivic I, Matics R, Hamar J, Koller A. Age determines the magnitudes of angiotensin II-induced contractions, mRNA, and protein expression of angiotensin type 1 receptors in rat carotid arteries. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2014. 69:519–526.
275. Hunyady L, Catt KJ, Clark AJ, Gaborik Z. Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regul. Pept.* 2000. 91: 29–44.
276. Silva-Antonialli MM, Fortes ZB, Carvalho MH, Scivoletto R, Nigro D. Sexual dimorphism in the response of thoracic aorta from SHR to losartan. *Gen. Pharmacol.* 2000. 34:329–335.
277. Cai G, Gurdal H, Seasholtz TM, Johnson MD. Age-related changes in angiotensin II-stimulated vascular contraction and inositol phosphate accumulation in Fischer 344 rats. *Mech. Ageing Dev.* 1994. 76:125–133.
278. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007. 292:C82–C97.
279. Hilliard LM, Sampson AK, Brown RD, Denton KM. The “his and hers” of the renin-angiotensin system. *Curr. Hypertens. Rep.* 2013. 15:71–79.
280. Beltran AE, Briones AM, Garcia-Redondo AB, Rodriguez C, Miguel M, Alvarez Y, Alonso MJ, Martinez-Gonzalez J, Salices M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2009. 27:142–154.
281. Okumura M, Iwai M, Nakaoka H, Sone H, Kanno H, Senba I, Ito M, Horiuchi M. Possible involvement of AT2 receptor dysfunction in age-related gender difference in vascular remodeling. *J. Am. Soc. Hypertens.* 2011. 5:76–84.
282. El Assar M, Angulo J, Vallejo S, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Rodríguez-Mañas L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol.* 2012 May 28;3:132.
283. Novella S, Dantas AP, Segarra G, Medina P, Hermenegildo C. Vascular Aging in Women: is Estrogen the Fountain of Youth? *Front Physiol.* 2012 Jun 6;3:165.

284. Green T, Gonzalez AA, Mitchell KD, Navar LG. The complex interplay between cyclooxygenase-2 and angiotensin II in regulating kidney function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2012. 21:7–14.
285. Sun D, Huang A, Yan EH, Wu Z, Yan C, Kaminski PM, Oury TD, Wolin MS, Kaley G. Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Jun;286(6):H2249-56.
286. Tang EH, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics.* 2008 Feb 19;32(3):409-18.
287. Rodríguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S, López-Dóriga P, Solís J, Petidier R, Montes M, Nevado J, Castro M, Gómez-Guerrero C, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell.* 2009 Jun;8(3):226-38.
288. Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J. Immunol.* 2001.167:2831–2838.
289. Schrage WG, Eisenach JH, Joyner MJ. Ageing reduces nitric-oxide- and prostaglandin-mediated vasodilatation in exercising humans. *J Physiol.* 2007 Feb 15;579(Pt 1):227-36.
290. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension.* 1997 Jan;29(1 Pt 2):274-9.
291. Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.* 2005 Feb;144(4):449-58.
292. Upmancis RK, Deeb RS, Hajjar DP. Oxidative alterations of cyclooxygenase during atherogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006 Jul;80(1-2):1-14.
293. Cipollone F, Cicolini G, Bucci M. Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: recent insights and future perspectives. *Pharmacol. Ther.* 2008.118:161–180.
294. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 2004. 56:387–437.
295. Virdis A, Colucci R, Fornai M, Duranti E, Giannarelli C, Bernardini N, Segnani C, Ippolito C, Antonioli L, Blandizzi C, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M. Cyclooxygenase-1 is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from angiotensin II-infused mice. *Hypertension* 2007. 49:679–686.
296. Alvarez Y, Perez-Giron JV, Hernanz R, Briones AM, Garcia-Redondo A, Beltran A, Alonso MJ, Salices M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007. 321:381–388.
297. Briones AM, Montoya N, Giraldo J, Vila E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton. Autocoid Pharmacol.* 2005. 25:155–162
298. Ruiz-Feria CA, Yang Y, Thomason DB, White J, Su G, Nishimura H. Pulse wave velocity and age- and gender-dependent aortic wall hardening in fowl. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2009 Dec;154(4):429-36.
299. Chan V, Fenning A, Levick SP, Loch D, Chunduri P, Iyer A, Teo YL, Hoey A, Wilson K, Burstow D, Brown L. Cardiovascular changes during maturation and ageing in male and female spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011 Apr;57(4):469-78.
300. Qiu H, Depre C, Ghosh K, Resuello RG, Natividad FF, Rossi F, Peppas A, Shen YT, Vatner DE, Vatner SF. Mechanism of gender-specific differences in aortic stiffness with aging in nonhuman primates. *Circulation.* 2007 Aug 7;116(6):669-76.

301. Breithaupt-Grögler K, Belz GG. Epidemiology of the arterial stiffness. *Pathol Biol (Paris)*. 1999 Jun;47(6):604-13.
302. Segers P, Rietzschel ER, De Buyzere ML, Vermeersch SJ, De Bacquer D, Van Bortel LM, De Backer G, Gillebert TC, Verdonck PR; Asklepios investigators. Noninvasive (input) impedance, pulse wave velocity, and wave reflection in healthy middle-aged men and women. *Hypertension*. 2007 Jun;49(6):1248-55.
303. Miyoshi T, Doi M, Hirohata S, Kamikawa S, Usui S, Ogawa H, Sakane K, Izumi R, Ninomiya Y, Kusachi S. Olmesartan reduces arterial stiffness and serum adipocyte fatty acid-binding protein in hypertensive patients. *Heart Vessels*. 2011 Jul;26(4):408-13298. Ruiz-Feria 2009
304. Wang M, Lakatta EG. Altered regulation of matrix metalloproteinase-2 in aortic remodeling during aging. *Hypertension* 2002;39:865–873.
305. Fornieri C, Quaglino D Jr, Mori G. Role of the extracellular matrix in age-related modifications of the rat aorta. Ultrastructural, morphometric, and enzymatic evaluations. *Arterioscler Thromb*. 1992 Sep;12(9):1008-16.
306. Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*. 1995 Feb;25(2):155-61.
307. Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*. 1997 Mar 14;275(5306):1649-52.
308. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med*. 1997 Aug 7;337(6):408-16.
309. Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation*. 1997 Nov 18;96(10):3264-5.
310. Finkel T1. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Apr;10(2):248-53.
311. Abe J, Berk BC. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 1998 Feb;8(2):59-64.
312. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994 Jun;74(6):1141-8.
313. Jaimes EA, Galceran JM, Raj L. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int*. 1998 Sep;54(3):775-84.
314. Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK. Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*. 1998 Aug;32(2):331-7.
315. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 1998 Jun 12;273(24):15022-9.
316. Boscoboinik D, Szewczyk A, Azzi A. Alpha-tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity. *Arch Biochem Biophys*. 1991 Apr;286(1):264-9.
317. Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*. 1992 Mar;70(3):593-9.
318. Puri PL, Avantiaggiati ML, Burgio VL, Chirillo P, Colleparado D, Natoli G, Balsano C, Levrero M. Reactive oxygen intermediates (ROIs) are involved in the intracellular transduction of angiotensin II signal in C2C12 cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Mar 27;752:394-405.

319. Tsai JC, Jain M, Hsieh CM, Lee WS, Yoshizumi M, Patterson C, Perrella MA, Cooke C, Wang H, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996 Feb 16;271(7):3667-70.
320. Fortuño A, Bidegain J, Robador PA, Hermida J, López-Sagaseta J, Beloqui O, Díez J, Zalba G. Losartan metabolite EXP3179 blocks NADPH oxidase-mediated superoxide production by inhibiting protein kinase C: potential clinical implications in hypertension. *Hypertension*. 2009 Oct;54(4):744-50.
321. Kayabasi H, Yilmaz Z, Sit D, Kadiroglu AK, Yilmaz E. The effects of Losartan on oxidative stress and inflammation in non-diabetic patients undergoing chronic hemodialysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013 Jan;17(2):235-42.
322. Pialoux V, Foster GE, Ahmed SB, Beaudin AE, Hanly PJ, Poulin MJ. Losartan abolishes oxidative stress induced by intermittent hypoxia in humans. *J Physiol*. 2011 Nov 15;589(Pt 22):5529-37.
323. V. Uday Kiran, N. Venkat Rajaiiah, D. Rama Krishna and Y. Narsimha Reddy, 2010. Effect of Losartan and Ramipril on Oxidative stress and Anti-oxidant Status in South Indian Hypertensive Patients. *International Journal of Pharmacology*, 2010. 6: 916-920.
324. Nishi EE, Bergamaschi CT, Oliveira-Sales EB, Simon KA, Campos RR. Losartan reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 2013 Jul;26(7):858-65.
325. Vavrinec P, van Dokkum RP, Goris M, Buikema H, Henning RH. Losartan protects mesenteric arteries from ROS-associated decrease in myogenic constriction following 5/6 nephrectomy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011 Sep;12(3):184-94.
326. Li F, Shi R, Liao M, Li J, Li S, Pan W, Yang T, Zhang G. Losartan attenuates vascular remodeling of the aorta in spontaneously hypertensive rats and the underlying mechanism. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2010 Aug;35(8):807-13.
327. de Cavanagh EM, Ferder LF, Ferder MD, Stella IY, Toblli JE, Inserra F. Vascular structure and oxidative stress in salt-loaded spontaneously hypertensive rats: effects of losartan and atenolol. *Am J Hypertens*. 2010 Dec;23(12):1318-25.
328. Bayorh MA, Ganafa AA, Socci RR, Eatman D, Silvestrov N, Abukhalaf IK. Effect of losartan on oxidative stress-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens*. 2003 May;16(5 Pt 1):387-92.
329. Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):2033-43.
330. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Sep;59(9):1428-59.
331. Dantas AP, Franco Mdo C, Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovasc Res*. 2004 Jan 1;61(1):22-9.
332. Li JM, Fan LM, Christie MR, Shah AM. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol Cell Biol*. 2005. 25(6):2320-30.
333. Li JM, Fan LM, Christie MR, Shah AM. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol Cell Biol*. 2005 Mar;25(6):2320-30.
334. Kim YS, Morgan MJ, Choksi S, Liu ZG. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol Cell*. 2007 Jun 8;26(5):675-87.

335. Vanden Berghe T, Declercq W, Vandenabeele P. NADPH Oxidases: New Players in TNF-Induced Necrotic Cell Death. *Molecular Cell* 2007. 26: 769-771
336. Boussetta T, Gougerot-Pocidalo MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, Bournier O, Kroviarski Y, Zhou XZ, Malter JS, Lu PK, Bartegi A, Dang PM, El-Benna J. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*. 2010.116(26):5795-802.
337. Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB. PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res*. 2002. 90(9):1012-9.
338. Bruunsgaard H, Skinhøj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2000.121(2):255-60.
339. Kirwan JP, Krishnan RK, Weaver JA, Del Aguila LF, Evans WJ. Human aging is associated with altered TNF-alpha production during hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001.281(6):E1137-43.
340. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2012. 72(10):2457-67.
341. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001.81(1):153-208.
342. Balla A, Erdélyi LS, Soltész-Katona E, Balla T, Várnai P, Hunyady L. Demonstration of angiotensin II-induced Ras activation in the trans-Golgi network and endoplasmic reticulum using bioluminescence resonance energy transfer-based biosensors. *J Biol Chem*. 2011.286(7):5319-27.
343. Schuhmacher, Guerra, Sauzeau, Cañamero, Bustelo, Barbacid. A mouse model for Costello syndrome reveals an Ang II-mediated hypertensive condition. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008. 118(6)
344. Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F. Dragging ras back in the ring. *Cancer aging spontaneously hypertensive rats*. *Am J Hypertens*. 2007. 20(7):792-9.
345. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 2011.11(11):761-74.
346. Muthalif MM, Karzoun NA, Gaber L, Khandekar Z, Benter IF, Saeed AE, Parmentier JH, Estes A, Malik KU. Angiotensin II-induced hypertension: contribution of Ras GTPase/Mitogen-activated protein kinase and cytochrome P450 metabolites. *Hypertension*. 2000.36(4):604-9.
347. Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenber
348. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999.399(6736):597-601.
349. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. Dimmeler S, Zeiher AM. *Cell Death Differ*. 1999. 6(10):964-8.
350. Rensing KL, de Jager SC, Stroes ES, Vos M, Twickler MT, Dallinga-Thie GM, de Vries CJ, Kuiper J, Bot I, von der Thüsen JH. Akt2/LDLr double knockout mice display impaired glucose tolerance and develop more complex atherosclerotic plaques than LDLr knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2014.101(2):277-87
351. Qian Y, Corum L, Meng Q, Blenis J, Zheng JZ, Shi X, Flynn DC, Jiang BH. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004. 286(1):C153-63. Epub 2003 Sep 10.
352. Fernández-Hernando C, József L, Jenkins D, Di Lorenzo A, Sessa WC. Absence of Akt1 reduces vascular smooth muscle cell migration and survival and induces features of plaque vulnerability and cardiac dysfunction during atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Dec;29(12):2033-40.

BIBLIOGRAFÍA

353. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002.110(2):163-75.
354. Kovacina KS, Park GY, Bae SS, Guzzetta AW, Schaefer E, Birnbaum MJ, Roth RA. Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem*. 2003 . 278(12):10189-94
355. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*. 2007 . 25(6):903-15.

