

## Oxido nítrico y remodelamiento de arterias mamarias de *bypass* coronario. Impacto de la hipertensión arterial

CLAUDIO JOO TURONI\*, RODRIGO MARAÑÓN\*, JUAN MUNTANER†, VICTOR PROTO†, MARIA PERAL DE BRUNO\*

La hipertensión arterial (HTA) produce cambios funcionales y estructurales de los vasos en los que estaría implicado el óxido nítrico (ON). En la cirugía de *bypass* coronario se usan arterias mamarias (AM) que prestarían mayor viabilidad que las venas safenas. En nuestro laboratorio encontramos que las AM, aun en presencia de disfunción endotelial, producían liberación de ON por activación de una ON sintetasa neuronal (nONS) extraendotelial. **Objetivo:** determinar en AM de pacientes con y sin HTA la presencia y tipo de remodelamiento y su relación con la HTA y el ON extraendotelial. **Material y método:** los pacientes con cirugía de *bypass* programada fueron divididos, según su historia clínica, en: GH (con HTA) y GN (normotensos). Anillos de AM de restos quirúrgicos se colocaron *in vitro* a una precarga de 2 g. El contenido de nitritos se midió por método colorimétrico (reacción de Griess) y la presencia de endotelio por la relajación a acetilcolina en AM precontracturadas con noradrenalina y por histología evaluando presencia de anti CD34. Para estudiar el remodelamiento se tiñeron secciones de AM con H&E y PAS y se usó el *software* Image J para el análisis *off-line* de los cortes. **Resultados:** se encontró ausencia de endotelio (E-) en el 92,3% de los pacientes. En AM E- del GH los valores de ON fueron menores que en GN ( $1.024 \pm 76$ ,  $n = 18$  vs  $1.476 \pm 121$ ,  $n = 14$  pmol/mg de tejido;  $p < 0,003$ ). Las AM E- del GH presentaron una menor relación luz/pared que las del GN ( $0,21 \pm 0,03$ ;  $n = 6$  vs  $0,75 \pm 0,17$ ;  $n = 10$ ;  $p < 0,05$ ) con una disminución de la luz arterial ( $p < 0,02$ ) sin alteración del espesor de la pared. La presencia de HTA disminuyó el número de células musculares lisas vasculares (CMLV). El número de núcleos en GN fue  $97,5 \pm 11,0$  vs  $48,5 \pm 2$  en GH ( $n = 12$ , en 1C/40X;  $p < 0,001$ ), lo cual se correlacionó positivamente con los niveles de ON ( $r = 0,34$ ;  $p < 0,04$ ). **Conclusiones:** la HTA indujo un remodelamiento concéntrico en AM; sin embargo el espesor de la pared se mantuvo a expensas de una disminución de las CMLV. La liberación de ON en AM E- concuerda con observaciones previas, apoyando en este trabajo la hipótesis de que el ON extraendotelial estaría también implicado en los cambios estructurales a través de la activación de ONS presentes en las CMLV.

Rev Fed Arg Cardiol 2008; 37; 34-40

**Palabras clave:** Oxido nítrico extraendotelial. Hipertensión arterial. *Bypass* coronario.

En la regulación del tono vascular intervienen factores derivados tanto del endotelio como del músculo liso vascular. Entre los factores producidos por las células endoteliales se encuentran sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (ON)<sup>1</sup> prostaciclina: PGI<sub>2</sub>, factor hiperpolarizante derivado del endotelio; sustancia que sería un metabolito del ácido araquí-

dónico<sup>2</sup>, y entre las sustancias vasoconstrictoras se encuentran las endotelinas, la enzima convertora de endotelina, los endoperóxidos cíclicos y la enzima convertora de angiotensina II.

En la actualidad se considera que la capa media vascular es también un órgano activo en el cual las fibras musculares lisas y la matriz intersticial interactúan permanentemente. Como resultado de esa interacción dinámica se pueden producir cambios funcionales y estructurales de la pared vascular, que surgen como respuesta adaptativa a diversas condiciones hemodinámicas.

Por otra parte el endotelio regula otras funciones, como la agregación y la adhesión plaquetaria, la coagulación, la fibrinólisis, los procesos inflamatorios, el crecimiento vascular (angiogénesis), el funcionamien-

\* Departamento Biomédico Orientación Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Tucumán. INSIBIO-CONICET.

† Centro Modelo de Cardiología. Tucumán.

Dirección postal: Claudio Joo Turoni. Balcarce 32. 4000 Tucumán. Argentina.

e-mail: claudiojoo@hotmail.com

La versión digitalizada de este trabajo está disponible en [www.fac.org.ar](http://www.fac.org.ar)

to y movimiento de las células inmunes<sup>3,4</sup>, y la expresión de los receptores activados por proteasas (PARs)<sup>5</sup>. Dado el papel que ejerce el endotelio sobre la función vascular, a través de la regulación de una adecuada homeostasis de las sustancias vasoactivas, se acepta actualmente que su disfunción sería un evento importante y precoz en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares, como por ejemplo, la hipertensión arterial (HTA), la insuficiencia cardíaca, la enfermedad arterial periférica y la enfermedad coronaria<sup>6</sup>. Fisiopatológicamente, la biodisponibilidad del ON, determinada por el balance entre su síntesis y su degradación, jugaría un papel protagónico en estos estados patológicos. Se ha demostrado que en la producción de ON intervienen tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS): la endotelial (eONS o Tipo III) que se encuentra en las células endoteliales, la neuronal (nONS o Tipo I) que se expresa principalmente en células neuronales y en menor medida en células musculares esqueléticas, renales y glándulas endocrinas, y la inducible (iONS o Tipo II) que aparece en macrófagos y otras células inflamatorias<sup>7</sup>. Sin embargo, se ha descrito la presencia de nONS en tejido vascular<sup>8</sup>.

Por otra parte es sabido que la HTA produce cambios funcionales en los diferentes lechos vasculares. Estos cambios modificarían estructuralmente los vasos produciendo un remodelamiento con alteraciones de la relación luz/pared<sup>9</sup>. En la fisiopatología del remodelamiento vascular también estaría implicado un desbalance entre la producción y la degradación de ON<sup>10</sup>. Una disminución de la producción de ON se relacionaría con una menor expresión de eONS, coincidente con ausencia o disfunción del endotelio. Un exceso en la producción en las especies reactivas de oxígeno (ROS), a partir de la activación de la NADPH oxidasa presente en el músculo liso, sería la principal causa de inactivación del ON. Esta acción de la NADPH ha sido descrita también por nuestro grupo de investigación, en arterias de modelos experimentales de HTA<sup>11</sup>.

Uno de los lechos vasculares afectados por la HTA sería el coronario. En la cirugía de *bypass* coronario se usan frecuentemente puentes de arterias mamarias (AM), los cuales presentan una buena viabilidad a largo plazo. Se ha demostrado que el ON endotelial juega un importante papel en la performance del injerto coronario a mediano y largo plazo<sup>12</sup>. Si bien en algunos trabajos se propuso que las AM no presentaban disfunción endotelial<sup>13</sup>, otros autores han observado disfunción endotelial en este vaso<sup>14,15</sup>. Además, esta disfunción endotelial se correlacionaría con el número de factores de riesgo cardiovascular que presenta el paciente. Pompilio y colaboradores encontraron también una inapropiada relajación endotelio-dependiente de AM de pacientes con HTA en relación con AM de pacientes normotensos sin factores de riesgo asocia-

dos<sup>15</sup>, lo cual concuerda con lo propuesto por Huraux y colaboradores<sup>16</sup>.

En nuestro laboratorio encontramos producción de ON en las AM incluso en presencia de disfunción endotelial<sup>17</sup>. Basándonos en hallazgos previos de la literatura que describieron presencia de nONS en células musculares lisas vasculares (CMLV) de arterias de cordón umbilical en humanos<sup>18</sup>, en ese trabajo postulamos que este ON provendría de la activación de una nONS que estaría presente en las CMLV de AM.

Tomando en consideración los datos anteriores, los objetivos del presente trabajo con pacientes de cirugía de *bypass* programada fueron:

1. Determinar la presencia y tipo de remodelamiento en AM con disfunción endotelial, evaluando el posible impacto de la HTA.
2. Determinar la relación entre el remodelamiento y la producción de ON extraendotelial en pacientes con y sin HTA.

## MATERIAL Y METODO

### Grupo de estudio

Pacientes del Centro Modelo de Cardiología a los que se realizó cirugía programada de *bypass* coronario.

Según el antecedente de presencia o ausencia de HTA en la historia clínica al momento de la internación, los pacientes fueron divididos en dos grupos: Grupo Hipertenso (GH) (n = 12) y Grupo Normotenso (GN) (n = 18) Cabe destacar que, previo a la internación, las cifras tensionales estaban controladas en todos los casos (GN: 125 ± 7 mmHg / 75 ± 6 mmHg vs GH: 137 ± 4 mmHg / 77 ± 4 mmHg; p: NS). Se excluyó a los pacientes con diabetes, *stent* o cirugía previa de *bypass*.

Antes de la cirugía se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente, de acuerdo con el Comité de Ética Institucional.

### Procesamiento de las muestras

Restos de AM extraídos de la cirugía se colocaron en solución de Ringer (mM: NaCl 118,3; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub> 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25; Glucosa 11,1; Na<sub>2</sub>EDTA 0,026) mantenida a 4°C y se transportaron al laboratorio para su procesamiento. Los vasos se disecaron liberándolos del tejido conectivo y se cortaron en anillos de aproximadamente 5 mm (1 a 4 por paciente, según el tamaño de la muestra). En todos los casos se cuidó de no destruir el endotelio. Con estos anillos se realizaron tres protocolos experimentales que se detallan a continuación.

**Medición de la reactividad vascular.** Se colocaron los anillos en cámaras de acrílico con Ringer a pH y temperatura controlados burbujeadas con carbógeno. Se tensaron a una precarga de 2 g, determinada previamente como óptima (efecto máximo a KCl). Se realizó un período de equilibración (90 min) con lavados y tensados cada 15 min.

Para evaluar la presencia de endotelio funcionando se determinó el efecto vasodilatador a una curva dosis respuesta acumulativa (CDRA) de acetilcolina (ACh  $10^{-9}$ - $10^{-5}$ M) y a una CDRA de bradikina (Bk:  $10^{-11}$ - $10^{-5}$ M) sobre vasos precontractados por noradrenalina (NA  $10^{-6}$ M). Se consideró con endotelio funcional a los vasos que presentaron una relajación de ACh  $\geq$  al 40% de la contracción previa a NA. Para evaluar la respuesta muscular máxima se usó una solución despolarizante de KCl 100 mM.

**Medición de la liberación de ON.** Para la medición de ON se usó la reacción de Griess, ya utilizada en nuestro laboratorio para anillos de aorta de conejo<sup>19</sup> y tejido humano<sup>17</sup>. Este método estima el ON producido por medición de los nitritos en que se degrada el ON. Esta reacción consiste en la transformación de la sulfanilamida en metabolitos diazocoloreados y se produce entre 5 y 10 minutos, dando una coloración rosada. Datos de nuestro laboratorio indicaron que las condiciones ideales para la medición de ON en tejido arterial es bajo una precarga o estiramiento (2 g)<sup>17,19</sup>, de manera que las AM fueron sometidas a esta precarga. Del baño de Ringer se extrajeron 500  $\mu$ l en AM con y sin administración del análogo competitivo de la ONS:  $N_G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), se colocaron 50  $\mu$ l de alfa-naftil etilen diamina 0,2% y 450  $\mu$ l de sulfanilamida 0,1% y se midió la absorbancia con un espectrofotómetro MetroLab 1000 a una longitud de onda de 540 nm. Los niveles de nitritos se calcularon usando un análisis de regresión ( $y = a + bx$ ). Previamente a cada serie de experimentos, se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones de  $NaON_2$  para tener los valores de la curva de regresión. Sólo se usaron las curvas con coeficiente de regresión  $> 0,85$  y  $p < 0,05$ . Al final del experimento, los anillos vasculares se pesaron y los resultados se expresaron como pmoles de ON/mg de tejido.

**Estudios histológicos.** Los anillos de AM usados en los protocolos anteriores se llevaron a formol 10% *bufferado* y luego se procesaron con técnicas histológicas convencionales en cortes de 3  $\mu$  para observarlos en microscopio óptico. Se evaluó la presencia de endotelio, el número de CMLV y la presencia de remodelamiento vascular.

Para la visualización de las células endoteliales se usaron anticuerpos CD34 que tiñen específicamente el citoplasma de las células endoteliales<sup>20</sup>. La peroxidasa endógena se inhibió con  $H_2O_2$  3% en metanol. Los cortes fueron lavados con agua destilada y colocados en un *buffer* citrato 10mM pH 6 durante 15 minutos. Se incubaron primero con suero de cabra durante 5 minutos y luego con anticuerpos CD34 (dilución 1/160). Luego se incubaron en un sistema de detección Link L Label IHC (Bio Genex, USA). El *binding* del anticuerpo se reveló usando JHC expresado por  $H_2O_2$  como sustrato y diaminobenzidina como cromógeno (Liquid DaB, Bio Genex, USA).

Para cuantificar el número de núcleos de las CMLV de la capa media se realizó una tinción de hematoxilina-eosina de los cortes de AM y se observó en microscopio a 40x.

Para la evaluación del tipo de remodelamiento en cortes de AM a 10x, se realizaron fotos digitalizadas *off-line* y se midió el área de la luz y de la pared vascular usando el procesador de imágenes ImageJ 1.36B (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

En todos los casos se compararon los resultados obtenidos en el GH y el GC.

#### Análisis estadístico

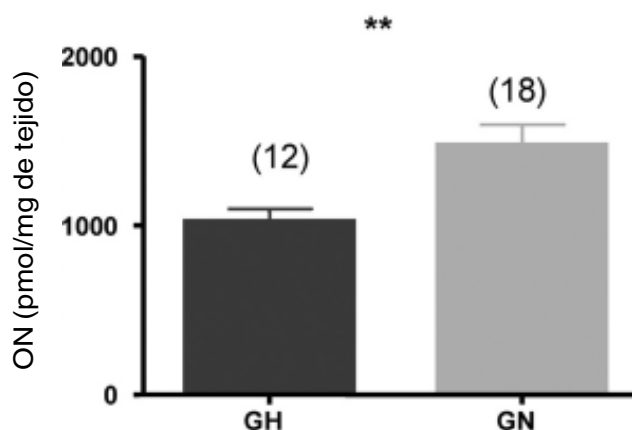
Se aplicó la prueba t de Student para datos pareados y agrupados; cuando se compararon más de tres observaciones se usó ANOVA con postest de Newman Keuls. Para los estudios de asociación se usó la prueba de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y regresión lineal. Los valores se expresaron como el promedio de un número N de observaciones  $\pm$  el error estándar (ES) siendo estadísticamente significativos cuando el valor de probabilidad (p) fue menor del 5%.

#### RESULTADOS

La Tabla 1 compara las características clínicas de los pacientes de ambos grupos (GH y GN). Cuando se realizó el análisis estadístico entre GH y GN sobre las posibles diferencias entre el número de pacientes con distintos factores de riesgo asociados, sólo se encontraron diferencias significativas en los antecedentes de dislipidemia y en el índice de masa corporal (Tabla 1).

Las AM de sólo 3 pacientes presentaron relajación a ACh, con valores de reactividad de  $-1297 \pm 160$  mg (correspondiente a  $52\% \pm 11\%$  de la precontractura por NA). En los otros 27 pacientes no se observó relajación a ACh; por el contrario, se observó un pequeño efecto contráctil ( $+23 \pm 12$  mg correspondiente a  $1,7\% \pm 0,9\%$  de la precontractura a NA). Similares resultados se obtuvieron con Bk. La tinción específica de endotelio con anti CD34 se correlacionó con la respuesta vasorrelajante endotelio-dependiente: los anillos que presentaban vasorrelajación presentaron tinción positiva con el anticuerpo. Por otra parte cuando se analizó el impacto de la HTA sobre la función endotelial se encontró que ningún paciente GH presentó vasorrelajación endotelio-dependiente ni tinción con anti CD34. El análisis estadístico de estos datos demostró una correlación significativa entre la presencia/ausencia de endotelio con la presencia/ausencia de HTA ( $\chi^2 = 5,2$ ;  $p < 0,05$ ).

Todos los anillos de AM presentaron una respuesta contráctil al KCl no encontrándose diferencias en los valores promedio entre aquellos con y sin endotelio, sin embargo en AM sin endotelio se encontró que la respuesta a KCl fue menor en GH que en GN ( $191 \pm 51$ ,  $n = 12$  vs  $1797 \pm 505$  mg,  $n = 9$  respectivamente;  $p < 0,02$ ).

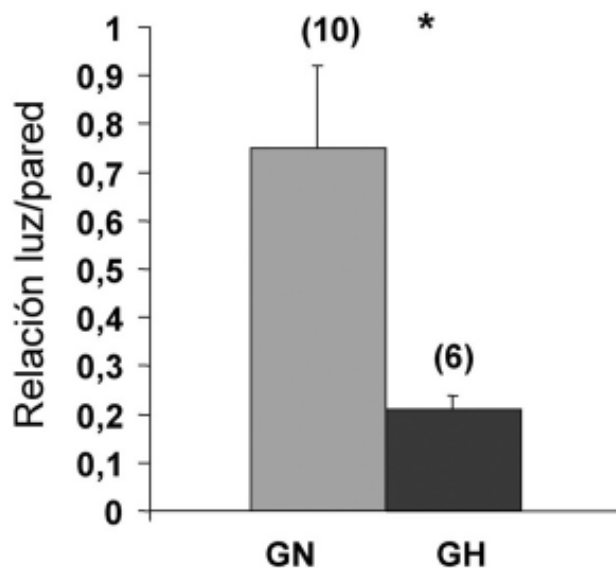


**Figura 1.** Liberación de ON en anillos de arteria mamaria sin endotelio funcional de pacientes del Grupo Hipertenso (GH) y del Grupo Normotenso (GN). \*\*:  $p < 0,003$  (prueba de Student para datos agrupados). Los datos se expresan como promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos está escrito entre paréntesis.

Todos los anillos de AM presentaron liberación basal de ON, encontrándose mayores valores de ON en anillos con endotelio. La maniobra de estiramiento incrementó significativamente los valores de ON en los vasos con y sin endotelio. En AM sin endotelio la tensión de estiramiento a 2 g incrementó los valores de ON de  $173,7 \pm 18,5$  pmol/mg de tejido a  $1.210,5 \pm 159,6$ ;  $p < 0,02$  prueba de Student para datos agrupados) y la administración de L-NAME inhibió los valores de ON en un  $72\% \pm 2\%$  ( $p < 0,001$ ;  $n = 8$  prueba de Student para datos agrupados). Además en los anillos de AM sin endotelio la liberación de ON fue menor en GH que en GN ( $1.024 \pm 76$ ;  $n = 18$  vs  $1.476 \pm 121$  pmol/mg de tejido;  $n = 14$ ;  $p < 0,003$ ) (Figura 1).

El análisis de los cortes histológicos para evaluar la presencia de remodelamiento mostró diferencias entre GH y GN en las AM sin endotelio funcional. Los anillos de GH presentaron una disminución del área de la luz arterial con respecto a GN ( $13,8 \pm 1,8$  mm<sup>2</sup>,  $n = 6$  vs  $18,8 \pm 1,3$  mm<sup>2</sup>,  $n = 10$  respectivamente;  $p < 0,05$ ). Sin embargo no se encontraron diferencias en el espesor de la pared (GH:  $6,5 \pm 0,9$ ;  $n = 6$  vs GN:  $4,9 \pm 1,2$  mm<sup>2</sup>;  $n = 10$  respectivamente;  $p$ : NS). Las AM sin endotelio del GH presentaron una menor relación luz/pared que las del GN ( $0,21 \pm 0,03$ ;  $n = 6$  vs  $0,75 \pm 0,17$ ;  $n = 10$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 2). El análisis del número de CMLV mostró diferencias entre GH y GN en las AM sin endotelio funcional. La presencia de HTA disminuyó el número de CMLV. El número de núcleos de las CMLV en GH fue de  $48,5 \pm 2$  vs GN en  $97,5 \pm 11,0$  por campo de 40 X ( $n = 12$ ;  $p < 0,001$ ).

El análisis entre los niveles de ON y la presencia de núcleos de CMLV en las AM sin endotelio funcional mostró una correlación positiva. Se observaron mayores valores de ON en aquellos segmentos que presenta-

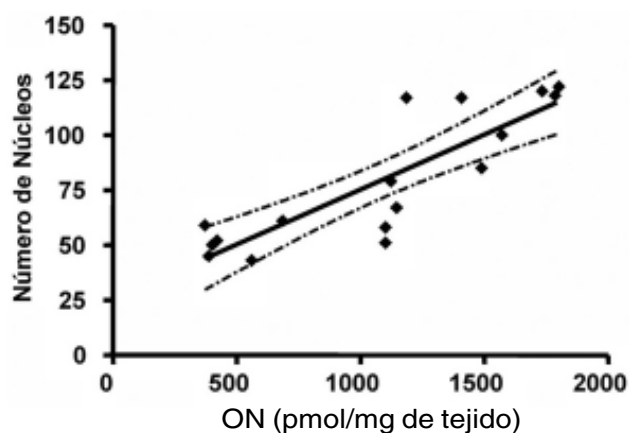


**Figura 2.** Relación luz/pared en cortes histológicos de anillos de arteria mamaria sin endotelio funcional de pacientes del Grupo Hipertenso (GH) y del Grupo Normotenso (GN). \*:  $p < 0,05$  (prueba de Student para datos agrupados). Los datos se expresan como promedio  $\pm$  error estándar. El número de experimentos está escrito entre paréntesis.

ban mayor número de núcleos de CMLV ( $r^2: 0,73$ ;  $p < 0,001$ ; regresión lineal) (Figura 3).

## DISCUSION

En este trabajo encontramos que las AM de *bypass* coronario presentaron en la mayoría de los casos una disfunción endotelial (92,3% de los pacientes). Este hallazgo coincide con el criterio de que la disfunción endotelial sería un evento importante y precoz en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares<sup>6</sup>. Las AM de *bypass* utilizadas en este trabajo provienen de



**Figura 3.** Relación entre el número de núcleos de células musculares lisas por corte histológico y los niveles de ON en anillos de arteria mamaria sin endotelio funcional.  $r^2: 0,73$ ;  $p < 0,001$ . Regresión lineal.

pacientes con enfermedad coronaria. Además, datos previos de la literatura concuerdan con nuestros hallazgos: He y colaboradores<sup>14</sup> encontraron que todos los segmentos de AM de pacientes de cirugía de *bypass* presentaron disfunción endotelial. Otros autores observaron relajación endotelio-dependiente sólo en el 40%<sup>21</sup> y en el 23%<sup>22</sup> de las AM estudiadas. Por otra parte la disfunción endotelial, o la alteración en la liberación de ON, estuvo presente también en otros injertos vasculares como arteria radial<sup>23,24</sup> y vena safena<sup>25</sup>. Más aún, otros autores correlacionaron la disfunción endotelial, en AM, con el número de factores de riesgo<sup>15</sup>. En nuestro trabajo, las AM estudiadas provenían de pacientes que presentaban factores de riesgo asociados (Tabla 1).

Un hallazgo interesante de este trabajo es que las AM con disfunción endotelial de pacientes con HTA presentaron un remodelamiento concéntrico con modificación de la luz vascular, sin cambios en el espesor de la pared. Pero el espesor de la pared se mantuvo constante a expensas de una disminución del número de las CMLV. Este hallazgo concuerda con el hecho de que se encontró en AM de pacientes con HTA una disminución significativa del número de núcleos de CMLV. Aunque algunos autores no encontraron aterosclerosis en AM<sup>26,27</sup>, otros autores hallaron alteraciones de la AM y la correlacionaron con la HTA y la mala viabilidad del puente a largo plazo<sup>15,6</sup>.

Otro hallazgo de este trabajo es que las AM con disfunción endotelial presentaron liberación de ON. Esta liberación de ON concuerda con observaciones previas de nuestro laboratorio, en las que encontramos tanto inmunomarcación de nONS extraendotelial como inhibición específica del ON con el análogo competitivo de la nONS, S-Methyl-tiocitrullina, en AM con disfunción endotelial<sup>17</sup> y con los resultados del presente trabajo donde el L-NAME inhibió significativamente los valores de ON en AM con disfunción endotelial. Más aún, datos de la literatura indican que, en ausencia de endotelio, el ON podría provenir principalmente de la producción de las CMLV<sup>18,28</sup>. Sin embargo, en este punto no podemos descartar que el ON extraendotelial podría también provenir de otras estructuras como la adventicia o los neovasos. La investigación de este tema constituye una importante proyección del presente trabajo.

Por otra parte, en este trabajo en AM con disfunción endotelial encontramos una disminución significativa de ON en los pacientes que presentaban HTA en relación con las AM del grupo normotenso (Figura 1). Este efecto de la HTA en la disminución del ON extraendotelial había sido observado previamente en nuestro laboratorio<sup>17</sup>. Otro punto interesante que encontramos es que existe una correlación significativa y positiva entre el número de CMLV y los valores de ON extraendotelial. Una explicación a este fenómeno sería que, en presencia de disfunción endotelial, el ON podría produ-

TABLA 1  
CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES EN ESTUDIO

	GN (n = 18)	GH (n = 12)
Edad (años)	62,4 ± 2,8	61,1 ± ,7
Sexo (masculino/femenino)	15/3	8/4
Factores de riesgo asociados		
Tabaquismo(n; %)	11; 61	7; 58
Dislipidemia (n; %)	3; 23	10; 83+
Antecedentes familiares (n; %)	8; 44	7; 58
Estrés (n; %)	13; 72	8; 67
Sedentarismo (n; %)	10; 55	8; 67
Score de Framingham (promedio)	13,4 ± 1,2	15,3 ± 0,5
Tratamiento farmacológico usado		
Inhibidores del SRA (n; %)	5; 28	7; 58
Diuréticos (n; %)	1; 6	3; 25
Betabloqueantes (n; %)	12; 67	9; 75
Antagonistas de calcio (n; %)	2; 11	3; 25
Hipolipemiantes	10; 55	8; 66
Indice de masa corporal	24,6 ± 1,0	28,6 ± 1,6*
Número de <i>grafts</i> por paciente	2,07±0,08	2,06±0,09

+: p<0,05 Diferencia entre porcentajes. \*: p<0,05 Test de Student.

cirse por ONS extraendoteliales presentes en las CMLV y que en los pacientes con HTA la liberación de este ON estaría disminuida debido al reemplazo de las CMLV por tejido fibrótico. Esta observación es apoyada por el hecho de que las AM de pacientes con HTA no sólo presentan, como ya se dijo, un número menor de núcleos de CMLV, sino también que las mismas presentan una respuesta disminuida al KCl. A este respecto, diversos autores indicaron que los niveles de ON del vaso a implantar desempeñan un papel fundamental en la viabilidad a largo plazo del puente<sup>12,13</sup>. Cabe aclarar que en los mencionados trabajos sólo se hace referencia al ON liberado por actividad de la eONS, sin considerar el posible impacto de la HTA. Sin embargo datos recientes de la literatura indican que en pacientes con enfermedades cardiovasculares, como HTA e insuficiencia cardíaca, la actividad de la eONS puede ser inapropiada, ya que la misma puede actuar como una fuente de anión superóxido<sup>29</sup>. Más aún, a la disminución de la producción de ON extraendotelial observada en pacientes con HTA también podría sumarse una posible intervención del anión superóxido sobre la producción de ON<sup>30</sup>, lo cual concuerda con el hecho de que en pacientes con HTA la fuente de anión superóxido puede ser una producción extraendotelial<sup>31</sup>.

## CONCLUSIONES

La disminución de los niveles de ON en AM de pacientes con HTA se asociaría con una disminución del número de CMLV, que a su vez disminuiría su contractilidad. Además, basados en hallazgos anteriores y en el hecho de que se encontró una disfunción endotelial generalizada, se podría plantear la hipótesis de que los

niveles de ON extraendotelial estarían involucrados en los cambios estructurales presentes en la AM a través de un desbalance de su producción. Sin embargo, estos efectos compensadores del ON extraendotelial podrían verse disminuidos por la presencia de HTA.

## SUMMARY

### NITRIC OXIDE AND REMODELLING PATTERNS IN MAMMARY ARTERIES USED IN CORONARY BY-PASS. IMPACT OF ARTERIAL HYPERTENSION

*Arterial hypertension (HTA) produces functional and structural changes of the vessels in those that it would be implied the nitric oxide (NO). In coronary by-pass surgery mammary arteries (AM) are used. These vessels would lend bigger viability than the saphenous veins. In our laboratory we find that AM, even endothelial dysfunction, showed NO release for activation of a extraendothelial neuronal NO-synthase.*

**Objectives.** To determine, in AM of patients with and without HTA, the presence and type of remodelling and the relation between HTA and NO-release.

**Material and method.** Patients from programmed by-pass surgery have been divided according to clinical history in two groups: GH (with HTA) and GN (without HTA). AM rings of surgical remains were placed in vitro to 2 g preload. Nitrites contents were measured by colorimetric method (Griess Reaction) and endothelium presence was studied by relaxation to acetylcholine in noradrenaline-precontracted AM and by histology evaluation (presence anti-CD34). To study remodelling pattern, sections of AM were stained with H&E and PAS and to the off-line analysis of the sections, the software Image J was used.

**Results.** We find absence of endothelium (E-) in 92.3% of the patients. In AM E- of GH values of NO were smaller than in GN ( $1024 \pm 76$  n = 18 vs  $1476 \pm 121$ , n = 14 pmol/mg tissue;  $p < 0.003$ ). AM E- of GH showed smaller lumen/wall relation than AM of GN ( $0.21 \pm 0.03$ ; n = 6 vs  $0.75 \pm 0.17$ ; n=10;  $p < 0.05$ ) with a decrease of the arterial lumen but without alteration of wall thickness. Number of nuclei in GN was  $97.5 \pm 11.0$  vs  $48.5 \pm 2$  in GH (n = 12, en 1C/40X  $p < 0.001$ ). This finding was correlated with NO levels ( $r = 0.34$ ,  $p < 0.04$ ).

**Conclusions.** HTA induced a concentric remodelling pattern, in AM. However, wall thickness stayed constant to expense of diminution of number of CMLV. The NO release in AM E- is in agreement with previous observations, supporting in this work the hypothesis that the extraendothelial NO would be also implied in the structural changes through the activation of NOS present in the CMLV.

**Key words:** Extraendothelial nitric oxide. Arterial hypertension. Coronary by-pass.

## Bibliografía

- Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
- You J, Golding EM, Bryan RM Jr: Arachidonic acid metabolites, hydrogen peroxide, and EDHF in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1077-H1083.
- Masaki T, Kimura S, Yanagisawa M y col: Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. *Circulation* 1991; 84: 1457-1468.
- Berhendt D, Ganz P: Endothelial function: From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002; 90: L40-L48.
- Wheeler-Jones CP: Regulation of endothelial prostacyclin synthesis by protease-activated receptors: mechanisms and significance. *Pharmacol Rep* 2008; 60: 109-118.
- Quyyumi AA: Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol* 2003; 91: 19H-24H.
- Wendy K, Alderton W, Cooper C y col: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
- Boulangier CM, Heymes C, Benessiano J y col: Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res* 1998; 83: 1271-1278.
- Mulvany M: Abnormalities of the resistance vasculature in hypertension: correction by vasodilator therapy. *Pharmacol Reports* 2005; 57: 144-155.
- Rudic R, Shesely E, Maeda N y col: Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 1998; 101: 731-736.
- Lodia F, Cogolludo A, Duarte J y col: Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 544: 97-103.
- Gaudino M, Toesca A, Maggiano N y col: Localization of nitric oxide synthase type III in the internal thoracic and radial arteries and the great saphenous vein: a comparative immunohistochemical study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 1510-1515.
- Shapira OM, Xu A, Aldea GS y col: Enhanced nitric oxide-mediated vascular relaxation in radial artery compared with internal mammary artery or saphenous vein. *Circulation* 1999; 100 (Suppl 19): II322-II327.
- He GW, Yang Q, Yang C-Q: Smooth muscle and endothelial function of arterial grafts for coronary artery bypass surgery. *Clin Expert Pharmacol Physiol* 2002; 29: 717-720.
- Pompilio G, Rossoni G, Alamanni F y col: Comparison of endothelium-dependent vasoactivity of internal mammary arteries from hypertensive, hypercholesterolemic, and diabetic patients. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 1290-1297.
- Huraux C, Makita T, Kurz S y col: Superoxide production, risk factors, and endothelium-dependent relaxations in human internal mammary arteries. *Circulation* 1999; 99: 53-59.
- Joo Turoni C, Peral de Bruno M, Coviello A y col: Internal mammary artery grafts reactivity in hypertensive patients: role of stretching in extraendothelial nitric oxide. *Clin and Exp Hyp* 2007; 29: 327-344.
- Schonfelder G, Fuhr N, Hadzidiakos D y col: Preeclampsia is associated with loss of neuronal nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells of the human umbilical cord. *Histopathology* 2004; 44: 116-128.
- Romano L, Coviello A, Jerez S, Peral de Bruno M: Role of nitric oxide on the vasorelaxant effect of atrial natriuretic peptide on rabbit aorta basal tone. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 1022-1029.
- Pusztaszeri M, Chaubert P, Seelentag W y col: Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 385-395.
- Chardigny C, Jebara VA, Acar C y col: Vasoreactivity of the radial artery: comparison with the internal mammary and gastroepiploic arteries with implications for coronary artery surgery. *Circulation* 1993; 88: 115-127.

## ARTICULOS ORIGINALES

22. Sogo N, Campanella C, Webb DJ y col: S-nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: therapeutic potential in bypass surgery. *Brit J Pharmacol* 2000; 131: 1236-1244.
23. Shliakhto EV, Moiseeva OV, Liasnikova EA y col: Disturbance of endothelium-dependent vasodilation and morphological changes of the radial artery in patients with coronary heart disease. *Ter Arkh* 2005; 77: 39-43.
24. He GW, Liu Z: Comparison of nitric oxide release and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization between human radial and internal mammary arteries. *Circulation* 2001; 104: 1336-1342.
25. Proto V, Joo Turoni C, Marañón R y col: Relajación dependiente e independiente de endotelio en venas safenas de *bypass* coronario. *Revista Argentina de Cirugía Cardiovascular* 2004, Vol II N° 2: 92-96.
26. Kay HR, Korn ME, Flema RJ y col: Atherosclerosis of the internal mammary artery. *Ann Thorac Surg* 1976; 21: 504-508.
27. Sisto T: Atherosclerosis in internal mammary and related arteries. *Scand J Torca Cardiovasc Surg* 1990; 24: 7-11.
28. Brophy CM, Knoepp L, Xin J y col: Functional expression of NOS 1 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H991-H997.
29. Dixon LJ, Morgan DR, Hughes SM: Functional consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling in congestive cardiac failure. *Circulation* 2003; 107: 1725-1728.
30. Pedro-Botet J, Covas MI, Martin S y col: Decreased endogenous antioxidant enzymatic status in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2000; 14: 343-345.
31. Guzik TJ, West NEJ, Pillai R y col: Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 2002; 39: 1088-1094.

En una obra de arte, el intelecto hace preguntas, no las contesta.

HEBBEL