

# REDUCCIÓN DE LA VARIABILIDAD DE LA PRESIÓN ARTERIAL CON $\beta$ -BLOQUEANTES O AMLODIPINA Y SU IMPACTO SOBRE EL DAÑO DE ÓRGANO BLANCO

Autor: Julieta Sofía Del Mauro

Director: Prof. Dr. Christian Höcht

Director Adjunto: Dr. Facundo Martín Bertera

Año: 2018

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Cátedra de Farmacología, Departamento de Farmacología



**UBA**  
Universidad de Buenos Aires  
*Argentina virtus robur et studium*



REFORMA  
UNIVERSITARIA  
1918-2018



## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado bajo la dirección del Prof. Dr. Christian Höcht, a quien me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento, por hacer posible la realización de este estudio. Por su enorme paciencia, tiempo, generosidad y dedicación. Por recibirme en su laboratorio con los brazos abiertos y por ayudarme todos estos años para incursionarme y aprender cada vez más acerca del apasionante mundo de la farmacología. Gracias “Big Boss”.

A mi Director Adjunto, Dr. Facundo Bertera por su ayuda en esta tesis.

A mis papas, porque fueron el apoyo más grande durante toda mi educación universitaria, sin ellos no hubiese logrado esta meta. Por alentarme a siempre animarme a más y por no dudar de mi crecimiento. Gracias papi por transmitirme la pasión en mi profesión y por incitarme a buscar mi camino. ¡Todavía recuerdo cuando me acompañaron a Mar del Plata a mi primera exposición en un congreso!

A mis hermanas, Andre y Noe, los motores que me impulsan a ser mejor cada día para que se sientan orgullosas de mí. Gracias por acompañarme y saber que siempre están conmigo.

A mi querido “Echu” por su amor incondicional, por entenderme siempre y por acompañarme en todo momento en cada una de mis locuras.

A mis abuelos porque fueron parte de este sueño desde su inicio.

A los doctores Carlos Taira, Andrea Carranza, Susana Gorzalczany y Paula Prince. Gracias por su ayuda y dedicación para enseñarme diversas técnicas experimentales de la presente tesis. Este proyecto no hubiera sido posible sin ustedes.

A los doctores Celina Morales y Germán González del Instituto de Patología Cardiovascular de la Facultad de Medicina – UBA por ayudarme con las técnicas histológicas y por abrirme las puertas de su laboratorio para poder trabajar en el análisis de imágenes, su ayuda fue muy importante y me sentí muy cómoda, agradezco que se hayan cruzado en mi camino. Gracias Celina por las largas charlas compartidas, sos una gran persona y un ejemplo de mujer para mí.

A los doctores Martín Donato, Ricardo Gelpi, Diego Chiappetta, Marcela Morettón, Gabriela Berg con quienes se realizaron en colaboración distintos estudios de la presente tesis.

A la cátedra de farmacología que tanto quiero y tan feliz me hizo todos estos años. A Lucho, Nico, Nati, Yani, Angie B, Angie Y, Boli, Ceci, Migue y Poli por tantos momentos compartidos, mates, picadas y largas tardes de de experimentos interminables.

A mis amigos, por ser parte de mi vida, de mis momentos tristes y alegres. Por bancarme, acompañarme y regalarme incontables momentos de alegría y diversión. A mi amigo de toda la vida “sancho” por ayudarme en la edición de la tesis.

A mis camaradas de la División Análisis Instrumental.

A la Universidad de Buenos Aires por el otorgamiento de la beca de doctorado que posibilitó la realización de esta tesis.

A mis maestros, quienes compartieron conmigo su conocimiento, tiempo y dedicación. Por su pasión en la actividad docente.

## ABREVIATURAS

ACV	Accidente cerebrovascular
ARA-II	Antagonista de los receptores de la angiotensina II
ARV	<i>Average rate variability</i>
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
CV	Cardiovascular
CV%	Coefficiente de variación porcentual
DE	Desvío estándar
DFDVI	Diámetro de fin de diástole del VI
DFSVI	Diámetro de fin de sístole del VI
E/A	Relación entre la velocidad E y A de llenado ventricular
EEM	Error estándar medio
EPPVId	Espesor de la pared posterior del VI en diástole
EPPVIs	Espesor de la pared posterior del VI en sístole
FA	Fracción de acortamiento
FC	Frecuencia cardíaca
FCI	Fracción de colágeno intersticial
Fey	Fracción de eyección
H-E	Hematoxilina-eosina
HF	High frequency



HTA	Hipertensión arterial
IL-6	Interleuquina 6
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IMVI	Índice de masa ventricular izquierda
IVRT	Tiempo de relajación isovolúmica
L-NAME	Éster metílico de N-Nitro-L-arginina
LF	Low frequency
LF/HF	Low frequency/high frequency
LPS	Lipopolisacárido
MAPA	Monitoreo ambulatorio de la presión arterial
MEC	Matriz extracelular
MMP-2	Metaloproteasa de matriz isoforma 2
MMP-9	Metaloproteasa de matriz isoforma 9
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAM	Presión arterial media
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Phosphate Buffered Saline

PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SAD	Desnervación sinoaórtica
SDS	Dodecil sulfato sódico
SRA	Sistema renina angiotensina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TPGD	D- $\alpha$ -tocoferilpolietilenglicol
VI	Ventrículo izquierdo
VLF	Very low frequency
VLF/HF	Very low frequency/high frequency
VPA	Variabilidad de la presión arterial
WKY	Wistar Kyoto

## RESUMEN

Tradicionalmente se ha considerado que el riesgo cardiovascular asociado a la hipertensión es producto de la elevación sostenida de la presión arterial y, debido a ello, la terapia se ha enfocado mayoritariamente en su reducción. En los últimos años, se ha establecido que algunos agentes antihipertensivos son menos efectivos en la prevención de eventos cardiovasculares en pacientes hipertensos. Los hallazgos obtenidos en estudios clínicos y meta-análisis demostraron que los  $\beta$ -bloqueantes resultan inferiores a otros agentes antihipertensivos en la reducción de accidentes cerebrovasculares y la mortalidad cardiovascular total, a pesar de las diferencias relativamente pequeñas en términos de reducción de la PA. Por tal motivo han dejado de ser recomendados como medicación de primera línea en pacientes con hipertensión no complicada por las principales guías farmacoterapéuticas internacionales. Considerando las escasas diferencias en términos de reducción de la PA periférica, se ha postulado que la inferioridad de los  $\beta$ -bloqueantes respecto de otros agentes antihipertensivos está relacionada con la falta de eficacia en el control de la presión arterial central y la variabilidad de la presión arterial. Sin embargo, cabe destacar que el atenolol ha sido el  $\beta$ -bloqueante que se evaluó en la gran mayoría de dichos ensayos clínicos, representando más del 75% del congénere estudiado. La representación desproporcionada de  $\beta$ -bloqueantes en estos análisis ha estimulado el debate acerca de si la falta de beneficio con los  $\beta$ -bloqueantes es un efecto de clase o se limita al atenolol. El atenolol es un  $\beta$ -bloqueante cardioselectivo de segunda generación sin acción vasodilatadora ni efectos pleiotrópicos. El carvedilol es un fármaco de tercera generación que además de bloquear los receptores  $\beta$ -adrenérgicos presenta acción vasodilatadora periférica por antagonizar a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y efecto antioxidante. El nebivolol es otro  $\beta$ -bloqueante de tercera generación y elevada cardioselectividad que estimula a la enzima óxido nítrico sintasa por su agonismo sobre los receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos y manifiesta diversas acciones pleiotrópicas. Teniendo en cuenta que los  $\beta$ -bloqueantes constituyen un grupo farmacológico heterogéneo, cuyos integrantes exhiben diferentes propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, el objetivo de la presente tesis doctoral fue determinar los efectos de la administración crónica y oral de atenolol, nebivolol, carvedilol o amlodipina sobre la presión arterial, su variabilidad de corto plazo y el

daño de órgano blanco en el ventrículo izquierdo y la aorta torácica. Se incluyeron ratas espontáneamente hipertensas e hipertensas por la administración de L-NAME que fueron tratadas durante 8 semanas con una única administración diaria de atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Durante las últimas 2 semanas de tratamiento, se evaluó la presión arterial sistólica periférica determinada de manera indirecta y su fluctuación intradía y entredía. La variabilidad intradía se estimó a partir del cálculo del desvío estándar de las mediciones consecutivas de la presión para cada animal dentro de un mismo día, mientras que la variabilidad entredía se calculó como el desvío estándar del valor promedio de presión arterial sistólica diaria obtenido cada uno de los días en los que se realizó la determinación. Posteriormente se realizaron de estudios ecocardiográficos. Cumplidos los 2 meses de tratamiento, todos los animales fueron canulados en su arteria carótida con el objetivo de determinar la presión arterial central y su variabilidad de corto plazo. A partir de la aplicación de la transformada de Fourier se estudió la variabilidad latido-a-latido cardíaco para evaluar el efecto de los fármacos sobre el tono vascular miogénico y la actividad simpática vascular. Finalizada la determinación de los parámetros hemodinámicos, se extrajo el ventrículo izquierdo y la aorta torácica para determinar la expresión del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina 6 (IL-6) y la actividad de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9. También se realizaron estudios histológicos para evaluar el contenido de colágeno en los dos órganos estudiados, el área transversal de cardiomiocitos y el espesor de la media aórtica.

En ambos grupos experimentales, aunque el tratamiento crónico con los cuatro fármacos estudiados redujo la presión arterial central y periférica, solo los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina disminuyeron en mayor medida que el atenolol la variabilidad de corto plazo estimada tanto de manera indirecta como directa. Además, el estudio de la variabilidad latido-a-latido cardíaco estableció que a nivel vascular el nebivolol, el carvedilol y la amlodipina reducen tanto la actividad simpática como el tono miogénico mientras que el atenolol no evidenció respuesta. El análisis del daño de órgano estableció que los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación reducen la fibrosis intersticial, el área transversal de cardiomiocitos y el espesor parietal del ventrículo izquierdo. Al mismo tiempo, en la aorta produjeron la

disminución del espesor de la media y del contenido de colágeno. La evaluación de mediadores químicos profibróticos y proinflamatorios determinó que los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico indujeron una mayor reducción de la sobreexpresión del TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en ambos órganos a comparación de los animales hipertensos tratados con vehículo o atenolol. De manera similar, se observó que el carvedilol, el nebivolol y la amlodipina normalizan el incremento de la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9 evidenciado en ambos modelos de hipertensión a nivel aórtico. Estos hallazgos obtenidos en dos modelos animales de hipertensión sugieren que la mayor reducción de la labilidad de la presión arterial inducida por los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores de tercera generación contribuiría en la superior protección del daño de órgano evidenciada por el nebivolol y el carvedilol respecto de atenolol. Estos resultados demuestran que, tanto carvedilol como nebivolol, producto de sus acciones pleiotrópicas, generan efectos beneficiosos adicionales motivo por el cual los hallazgos obtenidos para el atenolol en estudios clínicos y meta-análisis no deben extrapolarse a otros  $\beta$ -bloqueantes con propiedades farmacológicas superiores.

## INTRODUCCIÓN

### *Generalidades de la hipertensión arterial*

La hipertensión arterial (HTA) se define como la elevación sostenida de la presión arterial (PA) sistólica, diastólica o ambas. En la actualidad constituye una patología de alta prevalencia asociada a grandes problemas sanitarios debido a los elevados costos para los servicios de salud y su relación etiológica con complicaciones cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. Globalmente, 3,5 billones de adultos no controlan sus cifras de PA sistólica (PAS) y se estima que 1 de cada 4 adultos sufre de HTA (Oparil y cols., 2018). Teniendo en cuenta la prevalencia actual, se proyecta que para el año 2025 existirá 1,5 billones de pacientes hipertensos (Kearney PM y cols., 2005). A nivel mundial, entre los años 1990 y 2015, el número de años de vida sana perdidos por valores de PA no óptimos se incrementó 43%, impulsado por el aumento de la población, su envejecimiento y la elevación del 10% en la prevalencia de hipertensión estandarizada por la edad (Oparil y cols., 2018). Hoy en día, el aumento de la PA continúa siendo el principal factor de riesgo individual que contribuye en la mortalidad global por cualquier causa, ocasionando 9,4 billones de muertes por año y de acuerdo con un análisis mundial es responsable de 7,6 millones de muertes prematuras, 54% de los infartos de miocardio y 47% de eventos de isquemia cardíaca. Esto ocurre debido a que existe una relación directa y continua entre los valores de PA y el riesgo cardiovascular (Oparil y cols., 2018; Turnbull y cols., 2008). La relevancia clínica de la HTA radica en que cuanto mayor sean sus cifras, más elevado es el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y renales y, por lo tanto, mayores son los costos de salud y la mortalidad de la población. Contrariamente, su disminución se acompaña de una importante reducción de la morbi-mortalidad cardiovascular, ya que constituye un factor de riesgo modificable (Mancia y cols., 2009; Zhang y cols., 2011). En nuestro país, los datos epidemiológicos son escasos y hasta la llegada del RENATA (REgistro NAcional de hiperTensión Arterial) en el año 2012 no se había llevado a cabo un estudio a nivel nacional para investigar la prevalencia de la HTA. Así la información provenía de varios estudios metodológicamente diferentes. El estudio RENATA fue el primer registro para el conocimiento, tratamiento y control de la HTA en la Argentina llevado a cabo durante

el período 2008-2009 que se realizó sobre una muestra de siete ciudades y sobre un total de 4.006 individuos encuestados con una edad promedio de 43,7 años. La prevalencia de HTA fue del 33,5% y resultó mayor en hombres que en mujeres. Un dato alarmante fue el hecho de que no solo el 37,2% desconocía su enfermedad, sino que, aunque más de la mitad de los individuos hipertensos estaban tratados (56,2%) sólo el 26,5% de ellos se encontraban bien controlados (Marín y cols., 2012). Así, la publicación en el año 2017 del RENATA-2 que se realizó sobre una muestra de 25 ciudades argentinas y con un total de 5.931 individuos encuestados con una edad promedio de 43,5 años durante el período 2015-2016, arrojó que la prevalencia actual es del 36,3% la cual resulta coincidente con los reportes de la OMS para la región y ha aumentado sutilmente respecto al estudio RENATA publicado en el año 2012. El grado de participantes que desconocía su enfermedad se mantuvo respecto al primer registro (38%) así como los hipertensos que recibían tratamiento farmacológico (55,5%) mientras que la cantidad de individuos controlados descendió levemente (24,2%) (Delucchi y cols., 2017). Estos datos resaltan la importancia y la necesidad de diseñar estrategias específicas que contribuyan a mejorar el control de esta patología en nuestro país. Teniendo en cuenta estos antecedentes cabe destacar que, pese a los notables avances en el conocimiento de la fisiopatología de la HTA, su control continúa siendo globalmente escaso.

En el 90-95% de los pacientes con hipertensión no existe una causa orgánica y su etiología es desconocida (hipertensión primaria, esencial, idiopática o criptogénica). Este tipo de HTA constituye una entidad altamente heterogénea y de origen multifactorial que ocurre como consecuencia de la exposición a ciertos factores ambientales, aunque también obedece a causas genéticas (Oparil y cols., 2018). Los principales mecanismos implicados en la fisiopatología de la HTA esencial incluyen el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático, las alteraciones del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), el exceso de factores que inducen hipernatremia, el desbalance entre vasodilatadores y vasoconstrictores, las anormalidades en los vasos de resistencia y en la microvasculatura renal, entre otros (Samson y cols., 2017). El 5-10% de los casos restantes corresponden a causas secundarias debido a otra patología (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Etiología de la hipertensión arterial

Hipertensión arterial primaria	Origen multifactorial, genético y ambiental
Hipertensión arterial secundaria	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Renal <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedad vaso-renal: estenosis ateromatosa, displasia fibromuscular, vasculitis.</li> <li>• Enfermedad parenquimatosa renal: glomerulonefritis aguda y crónica, enfermedad poliquística, pielonefritis crónica, nefropatía obstructiva, tumores renales, insuficiencia renal aguda y crónica, síndrome nefrótico, nefritis por radiaciones</li> </ul> </li> <li>2. Endócrina <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperaldosterismo primario y secundario</li> <li>• Feocromocitoma</li> <li>• Síndrome de Cushing</li> <li>• Hipertiroidismo o hipotiroidismo</li> <li>• Diabetes</li> <li>• Hiperfunción corticosuprarrenal</li> <li>• Carcinoma suprarrenal</li> <li>• Tumores ectópicos productores de ACTH</li> <li>• Acromegalia</li> </ul> </li> <li>3. Inducida por fármacos <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucocorticoides</li> <li>• Mineralocorticoides</li> <li>• Inhibidores de la enzima monoaminoxidasa</li> </ul> </li> <li>4. Neurogénica <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumores encefálicos</li> <li>• Accidente cerebro-vascular</li> <li>• Encefalitis</li> <li>• Poliomiелitis</li> </ul> </li> <li>5. Tumores productores de renina</li> <li>6. Síndrome de apnea obstructiva del sueño</li> <li>7. Coartación aórtica</li> <li>8. Embarazo</li> </ol>

Adaptado de *Mancia y cols., 2013; Oparil y cols., 2018.*

La importancia del control adecuado de la PA en la población hipertensa queda demostrada por la relación continua entre el nivel tensional y el riesgo de enfermedad cardiovascular. Datos de estudios observacionales han establecido que el riesgo de muerte asociada a enfermedad cardíaca isquémica o ACV aumenta de manera progresiva a partir de un valor de PAS y diastólica (PAD) de 115/75 mmHg, respectivamente. Inclusive, por cada 20 y 10 mmHg de incremento de la PAS y PAD se duplica el riesgo de muerte de origen cardiovascular (Lewington y cols., 2002).



Varias razones explican el bajo grado de control de la hipertensión arterial en pacientes tratados, entre ellas el incumplimiento terapéutico, el nivel socioeconómico y la falta de educación al paciente hipertenso (Consenso Argentino de Hipertensión Arterial 2018).

### *Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial*

A lo largo del tiempo, la terapéutica antihipertensiva ha evolucionando gracias al desarrollo de nuevas clases de fármacos y a la realización de estudios clínicos a gran escala que permitieron probar sus beneficios sobre la morbimortalidad cardiovascular. Actualmente existe un amplio arsenal farmacológico para el manejo de la HTA que incluye  $\beta$ -bloqueantes, diuréticos, bloqueantes de los canales del calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y bloqueantes de los receptores de angiotensina (ARA-II), entre otros. A pesar de que estos antihipertensivos reducen de un modo similar la magnitud de la PA periférica, los beneficios y el perfil de eventos adversos a largo plazo resulta distinto (Bravo y col., 2015; Oparil y cols., 2018). El principal objetivo del tratamiento antihipertensivo consiste en reducir la morbimortalidad cardiovascular y renal a partir del descenso de las cifras de PA. Durante mucho tiempo, las guías de práctica clínica de HTA se centraban en los valores de PA periférica como la única variable -o una de las más importantes- para determinar la necesidad y el tipo de tratamiento. Sin embargo, resulta imprescindible considerar que debe tratarse el riesgo global de cada paciente y, por lo tanto, en la elección de un antihipertensivo se debe tener en cuenta tanto su eficacia terapéutica, como sus efectos preventivos cardiovasculares y renales (Consenso Argentino sobre Hipertensión Arterial, 2013; Guías de la Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial para el diagnóstico, estudio, tratamiento y seguimiento de la hipertension arterial, 2007).

Es importante destacar que el enfoque tradicional del tratamiento de la HTA considera que los beneficios de la terapia sobre la morbimortalidad cardiovascular dependen del descenso de la PA independientemente de la clase de fármaco empleado. Como consecuencia de esto, cualquiera de los principales grupos de antihipertensivos podría utilizarse como fármaco de primera elección para el

tratamiento de la HTA esencial no complicada. Sin embargo, hoy en día, la evidencia disponible sugiere priorizar la elección inicial de un antagonista del SRA, un diurético o un bloqueante cálcico como fármacos de primera elección en monoterapia por sobre la indicación de  $\beta$ -bloqueantes debido a las controversias existentes sobre el uso de estos últimos. No obstante, la decisión debe estar basada en la eficacia individual, tolerabilidad de los fármacos y las características del paciente (Consenso Argentino sobre Hipertensión Arterial, 2018; Oparil y cols., 2018). En este sentido, existen distintos factores que afectan la eficacia de los diversos agentes antihipertensivos, por ejemplo, la etnia. Tal es así que en individuos de etnia negra se prefiere el empleo de bloqueantes cálcicos y diuréticos como drogas de primera línea. Otro ejemplo es el caso del embarazo en las mujeres en donde los fármacos de primera elección, como los IECA o los ARA-II, están contraindicados debido al riesgo de teratogénesis y se utiliza  $\alpha$ -metildopa o labetalol.

El enfoque tradicional del tratamiento de la HTA ha sido cuestionado en los últimos años debido al descubrimiento de nuevos factores de riesgo adicionales que contribuyen al desarrollo de daño de órgano blanco. En este contexto, el estudio de la PA central y la variabilidad de la presión arterial (VPA), junto con el efecto de los fármacos antihipertensivos sobre estos parámetros cardiovasculares, ha cobrado especial relevancia. Distintas investigaciones preclínicas y clínicas postulan que las diversas clases de antihipertensivos presentan efectos diferenciales sobre la PA periférica en comparación con la PA central (Mancia y cols., 2013; Williams y cols., 2018).

Pese a su extenso uso en la práctica clínica, numerosos antihipertensivos no presentan un mecanismo de acción totalmente conocido. Así, los  $\beta$ -bloqueantes constituyen un grupo farmacológico que, si bien se emplea hace varias décadas, su mecanismo de acción aún se encuentra en estudio, especialmente el de aquellos agentes correspondientes a la tercera generación (Fares y cols., 2012). En este contexto, resulta relevante el conocimiento de nuevos mecanismos fisiopatológicos de la HTA que permitan explicar el accionar de ciertos agentes antihipertensivos, así como la posibilidad de desarrollar novedosas estrategias terapéuticas que contribuyan, no sólo a controlar la PA dentro de valores normales, sino consecuentemente a disminuir

el daño de órgano blanco que constituye el principal responsable del deterioro en la calidad de vida y desencadenamiento de eventos cardiovasculares.

### *Presión arterial central*

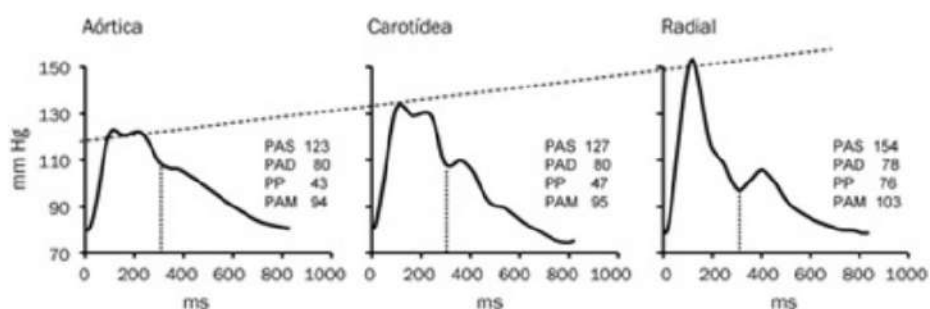
La PA central, conceptualmente definida como la PA en el punto de salida del ventrículo izquierdo (VI) hacia la aorta, representa la presión directa ejercida sobre el cerebro, el corazón y los riñones. Desde un punto de vista fisiopatológico, es una medida más fiel de la carga a la que están sometidos los órganos blancos de la hipertensión. Así, por ejemplo, sus variaciones impactan directamente en el consumo miocárdico de oxígeno y en la presión de perfusión coronaria e influye sustancialmente en las arterias de distribución cerebral (Trudeau y cols., 2014).

La PA medida convencionalmente en las grandes arterias periféricas, como la braquial, refleja aceptablemente la presión diastólica central pero no la sistólica. En el árbol vascular, al alejarnos de la aorta, la PAD no presenta grandes cambios; sin embargo, la PAS sufre un incremento progresivo hacia la periferia. Este fenómeno se debe a la amplificación que sufre la onda de presión de pulso en su travesía desde las arterias centrales hacia las periféricas (Kostapanos y cols., 2016). Así, mientras menor sea la amplificación de la onda de pulso, la presión aórtica central será más cercana a la periférica (DiNicolantonio y cols., 2012). En un sujeto joven y en condiciones normales la amplitud de la onda de pulso generada por el latido cardíaco aumenta desde las arterias centrales a las periféricas. Esta amplificación, que puede parecer paradójica, se debe a los cambios que sufre la onda de pulso al propagarse a través de un tubo viscoelástico que presenta múltiples ramificaciones y cambios cualitativos en la composición de su pared (predominio elástico en los vasos centrales y predominio muscular en la periferia) (Trudeau y cols., 2014).

Es esencial tener presente que la relación entre presión sistólica central y periférica varía entre los individuos dependiendo de la rigidez arterial y de la morfología de la onda de pulso. Incluso, en un mismo individuo las características de la pared arterial se modifican por el envejecimiento, ocasionando un aumento de la rigidez arterial, alteración de la morfología de la onda de pulso y, en consecuencia, de la relación entre la PA (fundamentalmente sistólica) central y periférica. Esto implica

que no puede predecirse la presión central simplemente a partir de la presión periférica sin considerar la rigidez arterial y los cambios en la onda de pulso. El análisis de la onda de pulso permite discriminar la onda anterógrada de la onda reflejada. Normalmente, esta última onda alcanza el corazón una vez que la válvula aórtica se ha cerrado, es decir durante la diástole (Trudeau y cols., 2014). Estos conceptos permiten dar un sustrato fisiopatológico para una de las formas más frecuentes de hipertensión: la HTA sistólica aislada del adulto mayor. Con el envejecimiento y el daño vascular generado por diversos factores, el árbol arterial se vuelve más rígido y la onda de pulso viaja a más velocidad tanto en sentido anterógrado como retrógrado. Así, la onda reflejada alcanza al corazón cuando aún está en sístole. Esto determina un aumento de la presión sistólica con el consecuente aumento de la presión de pulso (**Figura 1**).

**Figura 1.** Fenómeno de amplificación de la onda de pulso como consecuencia de la reflexión de las ondas de pulso que actúan reforzando el componente sistólico inicial de la onda primaria que viaja en sentido anterógrado.



Adaptado de *Boggia y cols., 2017*.

Actualmente se han logrado numerosos avances en el conocimiento de la PA central y se han desarrollado diversas técnicas y equipos para su determinación de manera no invasiva. La tonometría de aplanamiento se utiliza para analizar la onda de pulso y así, derivar la presión central y la aumentación sistólica. Esta técnica utiliza una función de transferencia para generar la onda de pulso central a partir de la onda de pulso periférica, calibrada con la medida de PA periférica. La evaluación de la presión central con este equipo se validó eficazmente, utilizando la medida intraarterial como patrón de oro. Posteriormente han sido desarrolladas nuevas tecnologías que se basan en técnicas similares pero que utilizan otras funciones de transferencia o se centran en

medidas con doppler para la estimación de la PA central. Aún sin un claro consenso sobre la técnica de referencia para la evaluación no invasiva de la presión central en reposo, la industria biomédica propone diversos equipos para su determinación en condiciones ambulatorias (Kostapanos y cols., 2016; Trudeau y cols., 2014).

La PA central ha demostrado mayor correlación con el daño de órgano blanco y la incidencia de eventos cardiovasculares en comparación con la PA braquial o periférica. El análisis *Conduit Artery Function Evaluation* (CAFE), un subestudio del *Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial* (ASCOT), fue el primer ensayo clínico extenso que determinó el efecto del tratamiento antihipertensivo sobre la PA central (Williams y cols., 2006). Aunque no se encontraron diferencias en los valores de PA braquial entre los individuos aleatorizados a recibir atenolol o amlodipina, la estimación de la presión central evidenció valores significativamente más bajos para el grupo tratado con el bloqueante cálcico. Más aún, la presión aórtica central se asoció directamente con el punto final compuesto de eventos cardiovasculares y el desarrollo de alteraciones renales. Debido a que durante el envejecimiento las arterias pierden sus propiedades elásticas, el atenolol y otros  $\beta$ -bloqueantes no vasodilatadores serían menos eficaces para disminuir la PA central en dosis que modifican la PA braquial. Por lo tanto, estos fármacos resultarían menos efectivos para proteger frente a eventos cardiovasculares en pacientes mayores (Williams y cols., 2006). Sin embargo, aunque se encuentra ampliamente establecido la importancia de la PA central y se han desarrollado técnicas no invasivas para su estimación así como distintos estudios clínicos han comparado el efecto de diversos antihipertensivos sobre este parámetro hemodinámico central, es importante recordar que aún no existen cifras de referencias consensuadas para la presión central ni estudios epidemiológicos a gran escala que nos permitan conocer el beneficio pronóstico a largo plazo de su reducción. Por tanto, aún no se cuenta con un soporte teórico lo suficientemente fuerte como para sustentar la intervención terapéutica basada en la determinación de la PA central.

### *Variabilidad de la presión arterial y daño de órgano blanco*

La diferente eficacia en términos de protección frente al daño de órgano blanco demostrada para los distintos antihipertensivos también puede explicarse

teniendo en cuenta su capacidad de controlar la variabilidad de la PA (VPA). La PA no es un parámetro constante, sino que sufre de oscilaciones espontáneas tanto a corto (de minutos a horas) como a largo plazo (meses) (Grassi y cols., 2012). El incremento de la VPA se ha establecido como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de lesión de órgano blanco, no sólo en pacientes hipertensos sino también en sujetos normotensos (Grassi y cols., 2012; Parati 2005). En este contexto, una amplia cantidad de estudios ha establecido que la labilidad de la PA se asocia directamente con la aparición de eventos cardiovasculares independientemente del valor de tensión arterial.

A lo largo de 24 horas, la tensión arterial sufre oscilaciones debido al ritmo circadiano de la PA. Sin embargo, también pueden ocurrir cambios rápidos, espontáneos y de corta duración, ya sea durante el día o, en menor medida, en la noche. Ha sido demostrado que, en pacientes hipertensos, la VPA de corto plazo aumenta con el nivel de tensión arterial cuando se determina a partir del cálculo del desvío estándar (DE) de la PA registrada por vía intraarterial (Mancia y cols., 1983). En función del tiempo, la fluctuación de la PA puede ser de tipo ultra corto, corto, mediano o largo plazo (**Tabla 2**). Tanto la VPA ultra corta (latido-a-latido cardíaco) como a corto plazo (en el rango de tiempo de minutos a horas y dentro de un período de 24 horas) se encuentran afectadas principalmente por la modulación autonómica del aparato cardiovascular, las propiedades elásticas de las arterias y el efecto de factores humorales (angiotensina II, óxido nítrico -NO-, endotelina-1, insulina, bradiquinina), reológicos (viscosidad sanguínea) y emocionales (estrés) de diversa naturaleza y duración (Parati y cols., 2013). También factores relacionados con el comportamiento y la rutina de los individuos, como horas de sueño, actividad física y cambios posturales pueden inducir variaciones en la determinación de la PA dentro de un período de 24 horas. La VPA a mediano (entre días) y largo plazo (visita-a-visita, estacional) se encuentran moduladas principalmente por la adecuada dosis y titulación del fármaco, además de la adherencia terapéutica (Parati y cols., 2013).



**Tabla 2.** Diferentes tipos de VPA, su determinación, mecanismos e implicancia.

	Ultra corto plazo	Corto plazo	Mediano plazo	Largo plazo
Rango de tiempo	Latido a latido cardíaco. Determinada en períodos desde 1 minuto hasta 24 horas	Minutos a horas	Día a día (entre días)	Visita a visita, estacional, entre años
Método de determinación	Registro continuo de la PA. También puede estimarse por métodos indirectos	Registro continuo de la PA. También puede estimarse por métodos indirectos como el MAPA	MAPA $\geq$ 48 horas Monitoreo domiciliario de la PA	Monitoreo domiciliario de la PA Determinación de la PA en el consultorio
Ventajas	Posibilidad de estimar índices autonómicos y neurohumorales de control de la PA	Brinda información acerca de la fluctuación de la PA a lo largo de 24 horas. Identificación de patrones circadianos de la VPA	Apropiada para el monitoreo de tratamientos a largo plazo	Apropiada para el monitoreo de tratamientos a largo plazo
Desventajas	No se puede asegurar la exactitud y precisión de las determinaciones indirectas (fuera del laboratorio)	A nivel clínico no puede evaluarse con elevada frecuencia	Entrenamiento del paciente MAPA $\geq$ 48 horas generalmente no es bien tolerado	Información limitada acerca del perfil de variación de la PA
Índices de VPA	Análisis espectral de la VPA en dominios de frecuencia (VLF, LF y HF)	DE y CV% de la PA diurna, nocturna y durante 24 horas. Variación de la PA día-noche ARV	DE y CV% de la PA	DE y CV% de la PA
Mecanismos de VPA propuestos	Función vascular miogénica, actividad simpática central, reflejos cardiopulmonares/arteriales, factores neurohumorales, reológicos, emocionales y de comportamiento	Función vascular miogénica, actividad simpática central, reflejos cardiopulmonares/arteriales, factores neurohumorales, reológicos, emocionales y de comportamiento, rigidez arterial, actividad/Sueño	Rigidez arterial Dosis y valoración de drogas antihipertensivas	Adherencia al tratamiento Errores en la medición de la presión arterial Distensibilidad arterial Cambios estacionales
Implicancia clínica	Estimación de los principales factores neurohumorales involucrados en la regulación de la PA	Incrementos en VPA día/noche y durante las 24 horas asociado a mayor riesgo de daño a órgano blanco.	Incremento de la VPA día-a-día asociado a daño de órgano blanco, microalbuminuria, eventos cardiovasculares y mortalidad cardiovascular	VPA a largo plazo independientemente asociada a incremento de incidencia de ACV

Abreviaturas: HF: high frequency LF: low frequency VLF: very low frequency

Adaptado de Parati y cols., 2013

Aunque la determinación de la VPA de corto plazo requiere del registro directo y continuo de la PA, a nivel clínico puede estimarse a partir del empleo del monitoreo ambulatorio de la presión arterial (MAPA) que permite determinar los niveles de PA de manera no invasiva e intermitente a lo largo de 24 horas. Sin embargo, debido a la naturaleza indirecta de este método, sus datos resultan menos exactos y precisos. La VPA puede estudiarse a partir de distintos parámetros de fluctuación de la PA tales como desvío estándar (DE) de la PA, coeficiente de variación porcentual (CV%) de la PA y el índice ARV (*Average Rate Variability*). A lo largo de los años, el uso del DE como un índice de fluctuación de la PA ha sido cuestionado debido a que únicamente refleja el grado de dispersión de los datos alrededor de la media y no brinda ningún tipo de información acerca del patrón de variación en el tiempo y es sensible a la frecuencia de determinación de la PA de métodos indirectos como el MAPA (Pierdomenico y cols., 2009). Con el objetivo de mejorar el valor pronóstico de la VPA el índice ARV diurno y nocturno de la PA ha comenzado a emplearse en las investigaciones clínicas, el cual refleja el promedio de las diferencias absolutas de mediciones de la PA consecutivas. Así, dicho parámetro estadístico considera la fluctuación de la PA a lo largo del tiempo y es menos sensible a la frecuencia de determinación de la PA (Pierdomenico y cols., 2009). Hoy, se sabe que el índice ARV predice en mayor medida el riesgo cardiovascular a comparación de la tradicional determinación del DE de la PA, aunque este último parámetro resulte ampliamente utilizado en la investigación preclínica y clínica.

Durante los últimos años, diversos mecanismos han sido propuestos para explicar el incremento de la VPA y numerosos estudios preclínicos y clínicos investigaron su relación con el daño de órgano blanco y la tasa de eventos cardiovasculares. A nivel experimental, la resección bilateral de los nervios carotídeos de animales normotensos aumenta la labilidad de la tensión arterial sin cambios altamente significativos en el valor promedio de la PA permitiendo obtener el modelo experimental de ratas sometidos a desnervación sinoaórtica (SAD por sus siglas en inglés). La elevada VPA de los animales SAD se asocia con aumento del daño de órgano blanco, incluyendo hipertrofia ventricular izquierda tardía, incremento de la fibrosis, engrosamiento de la pared del miocardio, hipertrofia aórtica con acumulación de colágeno, deterioro de la distensibilidad arterial, incremento de la matriz mesangial y



disfunción renal (Freitas y cols., 2016; Parati, 2005; Taira y cols., 1983). Sin embargo, una gran desventaja del empleo de animales SAD para el estudio de la VPA constituye la elevada mortalidad y neurogenicidad asociada; situación que motivó a los investigadores a estudiar la fluctuación de la PA en otros modelos (Li y cols., 2017). Así, se ha demostrado que los animales espontáneamente hipertensos (SHR por sus siglas en inglés) presentan un aumento de la labilidad de la tensión arterial que agrava el daño de órgano blanco. Dicho incremento de la VPA estaría relacionado a una sobreactivación del sistema nervioso simpático, del SRA y de mediadores inflamatorios (Kudo y cols., 2009; Li y cols., 2017). Por otro lado, investigaciones realizadas en humanos mediante medición intraarterial o no invasiva de la PA establecieron que el daño cardíaco, vascular y renal presenta mayor prevalencia y severidad en aquellos pacientes con aumento de la VPA determinada dentro de 24 horas (Parati y cols., 2013). Parati y colaboradores (1987) investigaron la incidencia y severidad del daño de órgano blanco en 108 pacientes hipertensos. Los individuos fueron divididos en 5 grupos según la media del valor de PA lo largo de 24 horas y a su vez subdivididos en 2 clases según el DE del registro tensional intraarterial. Dentro de un mismo grupo, pese a valores de presión similares, la incidencia y severidad de daño de órgano blanco resultó mayor en aquella clase en donde la VPA de corto plazo era más elevada. Más aún, un estudio longitudinal reveló que el grado de hipertrofia del VI determinado ecocardiográficamente en la etapa de seguimiento de pacientes hipertensos (entre 4 y 13 años luego de iniciado el tratamiento antihipertensivo) dependía de la VPA a lo largo de 24 horas y era independiente del promedio de PA de 24 horas, ambos parámetros registrados en el momento de la admisión de los individuos (Frattola y cols., 1993). De manera similar, el estudio PAMELA que incluyó 1.648 pacientes hipertensos sin tratamiento farmacológico a quienes se les determinó la PA y su variabilidad a lo largo de 24 horas de manera no invasiva reveló que el aumento del DE y del coeficiente de variación de la tensión arterial se asocia positivamente con el índice de masa ventricular izquierda (IMVI) (Sega y cols., 2002). El incremento de la VPA no solo se asocia a mayor daño de órgano blanco, sino también constituye un factor de riesgo de eventos cardiovasculares. Así, un subanálisis del *Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial* demostró que el riesgo de ACV en el grupo placebo se incrementaba 80% por cada aumento de 5 mmHg del DE de la PAS nocturna

(Pringle y cols., 2003). Eto y colaboradores (2005) investigaron la significancia clínica del incremento de la VPA en 106 ancianos hipertensos y observaron que la prevalencia de eventos cardiovasculares, incluyendo infarto cerebral y miocárdico, fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con marcada VPA.

La mayoría de los estudios acerca de la relevancia pronóstica de la VPA se han centrado en los cambios de la PA de corto plazo. Sin embargo, la evidencia sugiere que el incremento de la VPA entre días también se asocia con una mayor prevalencia y gravedad del daño cardíaco, vascular y renal, así como mayor riesgo de eventos cardiovasculares. Un estudio transversal realizado en individuos con hipertensión no tratada mostró que el aumento de la VPA día-a-día, evaluada a partir del promedio del triplicado de la medida domiciliaria de la PA durante 14 días consecutivos, se asoció a mayor daño cardíaco (valorado a partir del IMVI), macrovascular (determinado a partir del espesor de la túnica media de la carótida) y microvascular (relación albúmina urinaria/creatinina), independientemente del valor medio de la PA. El estudio Ohasama brindó la primera evidencia de que una mayor variabilidad entre días de la PA sistólica, evaluada a partir del monitoreo ambulatorio de la PA, se asocia a mayor riesgo de mortalidad cardíaca y por ACV (Parati y cols., 2013).

Se ha demostrado que la determinación de la VPA a largo plazo en el rango de tiempo de meses a años también presenta valor pronóstico. Estas variaciones ocurren principalmente debido a fallas en la adherencia a la terapéutica antihipertensiva. En individuos bajo tratamiento, si bien el MAPA refleja el grado de control de la PA dentro de un lapso de 24 horas, la VPA determinada visita a visita permite conocer la carga que produce en el sistema cardiovascular a largo plazo. Numerosos estudios clínicos han demostrado que el aumento de la VPA visita a visita se asocia con desarrollo de insuficiencia cardíaca (disfunción diastólica), alteraciones macrovasculares (engrosamiento y mayor rigidez de la túnica media), complicaciones microvasculares (microalbuminuria y aterosclerosis renal) y daño cerebral (hiperintensidad de la sustancia blanca por falla en los pequeños vasos cerebrales e infarto). Además, estudios longitudinales y análisis a post-hoc de ensayos clínicos realizados en pacientes hipertensos evidenciaron que el incremento intraindividual de la VPA a largo plazo, determinada a partir de mediciones de PA en el consultorio o domiciliaria, presenta valor predictivo de eventos cerebrovasculares fatales y no fatales y de mortalidad por

cualquier causa, independientemente del valor de PA (Parati y cols., 2013). Diversos mecanismos patológicos han sido propuestos para explicar el incremento de la VPA visita a visita entre los cuales se destaca la rigidez arterial. Así, la presión de pulso y la edad avanzada, factores que se encuentran directamente asociados con la rigidez arterial, se relacionan independientemente con el incremento en la VPA a largo plazo (O'Brien, 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, actualmente se postula que la reducción de la VPA debe ser considerada como una posible nueva meta terapéutica del tratamiento de la HTA, razón por la cual los fármacos antihipertensivos no sólo deben ser capaces de disminuir la PA sino también controlar su variabilidad (Höcht C., 2013). En este contexto, un amplio número de estudios preclínicos y clínicos se han enfocado en el estudio de los efectos de distintos fármacos sobre la VPA evidenciando distintas capacidades de control sobre este nuevo factor de riesgo cardiovascular (Höcht y cols., 2014). Aunque los mecanismos implicados en los efectos beneficiosos son relativamente desconocidos, la atenuación de VPA inducida por el tratamiento farmacológico podría estar relacionada con su efecto atenuante de la PA, la mejora de la regulación autonómica del sistema nervioso, la reducción de la rigidez arterial y la disminución de la inflamación (O'Brien, 2012). Sin embargo, los beneficios de la terapia antihipertensiva en términos de atenuación de la VPA dependen del grupo farmacológico. Más aún, aproximadamente el 68% de las variaciones de la PA pueden ser atribuidas a efectos diferenciales entre antihipertensivos de distinta clase (Webb y cols., 2010). Así, a nivel clínico, ha sido demostrado que el antagonista de los receptores de angiotensina II, losartán, reduce significativamente la fluctuación nocturna de la PA de pacientes hipertensos bajo hemodiálisis en comparación al placebo que mostró efectos neutros sobre dicho parámetro hemodinámico. Más aún, el análisis de regresión múltiple evidenció la existencia de una estrecha correlación entre los cambios en el IMVI y la atenuación de la VPA de corto plazo durante la noche, sugiriendo la contribución positiva del losartán para evitar el remodelado cardíaco asociado a la HTA (Mitsuhashi y cols., 2009). Los efectos de la administración de carvedilol 25 mg dos veces al día o de lecardipina 10 mg una vez al día sobre la VPA de corto plazo han sido evaluados en 24 pacientes con hipertensión moderada a severa, a partir del análisis del DE y el CV de la PA diurna, nocturna y a lo largo de 24 horas.

Aunque los dos tratamientos indujeron una disminución similar de la PA sistólica y diastólica, el carvedilol además redujo la fluctuación de la PA sistólica y diastólica diurna y a lo largo de 24 horas. Los autores del trabajo concluyeron que el  $\beta$ -bloqueante de tercera generación podría resultar más efectivo que el bloqueante cálcico en términos de atenuación de la VPA de corto plazo indicando la importancia de la actividad simpática en la excesiva variación de la PA (Crippa y cols., 2002). Un estudio clínico prospectivo comparó los efectos de la terapia con valsartán o nebivolol sobre la VPA a lo largo de 24 horas en 80 pacientes hipertensos. Los individuos incluidos fueron sometidos al estudio de MAPA para determinar el DE diurno y nocturno de la PA. Luego de un año de tratamiento, tanto valsartán como nebivolol lograron una reducción significativa de la fluctuación diurna y nocturna de la PA sistólica y diastólica. No obstante, el valsartán mostró un efecto superior al nebivolol en la atenuación de la VPA sistólica durante la noche. Estos resultados indicarían que la terapia con antihipertensivos de larga duración como los antagonistas del receptor de angiotensina II o  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación altamente cardioselectivos podría ofrecer una mayor protección cardiovascular (Negrea y cols., 2010).

A diferencia de los resultados obtenidos para los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación, un análisis a post hoc de los datos obtenidos en el estudio ASCOT-BPLA demostró que el bloqueante cálcico amlodipina ejerce una mayor protección frente a eventos cardiovasculares en pacientes hipertensos al compararse con el bloqueante  $\beta$ -adrenérgico atenolol, como consecuencia de su mayor capacidad de reducir la VPA de corto y largo plazo (Rothwell y cols., 2010). Paradójicamente, se observó un incremento de la fluctuación de la PA luego del uso de atenolol, y si bien se desconoce el mecanismo responsable de este aumento, el fenómeno se ha evidenciado en numerosos ensayos clínicos realizados en los últimos 15 años (Elliott y cols., 2011).

### *Análisis espectral de la VPA latido a latido*

Con el objetivo de mantener una adecuada perfusión tisular, existe una amplia cantidad de mecanismos neurohumorales implicados en la regulación de la PA, tales como el SRA, el sistema nervioso simpático, los factores vasoactivos locales, el NO y la respuesta miogénica, entre otros. Las desviaciones de la PA activan estos

sistemas que buscan reestablecerla hacia sus valores normales. Sin embargo, la velocidad a la cual responden difiere entre sí. De esta manera, los mecanismos neuronales afectarán la PA más rápidamente e impactarán en la alta frecuencia de la VPA mientras que los sistemas humorales lo harán más lento y modificarán los dominios de baja frecuencia. Así, el estudio de los componentes de frecuencia de la VPA latido a latido cardíaco a través del análisis espectral permite realizar una evaluación indirecta acerca de posibles mecanismos implicados en el control de la PA (Tabla 3) (Stauss, 2007). La VPA en el dominio de la frecuencia puede estudiarse a partir del cálculo de los componentes de la densidad espectral. El método más común se centra en la aplicación de la transformada rápida de Fourier (FFT, por sus siglas en inglés, *Fast Fourier Transform*) o en la elaboración de modelos autorregresivos (Parati y cols., 2003). Este análisis implica la cuantificación de la amplitud (potencia) de las oscilaciones de la PA en determinadas frecuencias. Por medio del análisis espectral de la VPA se ha podido clasificar y observar el comportamiento de algunos de los mecanismos fisiológicos que controlan la PA. Por ejemplo, en arterias aisladas la vasoconstricción miogénica es considerablemente más lenta que la vasoconstricción mediada por el sistema nervioso simpático. El rango de frecuencia para la modulación miogénica en ratas es 0,02-0,2 Hz y es concordante con estudios que demuestran que la función miogénica contribuye a la autorregulación del flujo sanguíneo a frecuencias inferiores a 0,2 Hz en la circulación renal, a 0,13 Hz en el lecho mesentérico y por debajo de 0,1 Hz en la circulación cerebral (Kolb y cols., 2007). El sistema del NO endotelial contribuye en la regulación de la PA en el rango de frecuencias de 0,05 a 0,4 Hz, considerando que la inhibición de la enzima NO sintasa endotelial (eNOS) en animales aumenta la VPA en esta gama de frecuencias. La regulación de la PA por el SRA requiere una cantidad de pasos concatenados tales como la síntesis y liberación de renina y angiotensinógeno. Luego, el angiotensinógeno necesita ser convertido enzimáticamente en angiotensina II para actuar sobre receptores específicos y activar vías de señalización intracelular, motivo por el cual se espera que el SRA afecte la VPA en frecuencias más bajas que el sistema nervioso simpático que presenta una respuesta rápida debido a su naturaleza nerviosa. De hecho, se ha sugerido que el SRA modula la VPA en el dominio de VLF (Akselrod y cols., 1981). Así, la actividad simpática se ha relacionado con el dominio LF, mientras que la función del músculo vascular con

las frecuencias VLF y LF, y la actividad parasimpática y el NO derivado del endotelio se relacionan con las altas frecuencias (Tabla 3).

**Tabla 3.** Análisis espectral de la VPA latido a latido, dominios de frecuencia y mecanismos neurohumorales implicados

	Ratas	Humanos
VLF	0,02–0,20 Hz	0,02-0,07 Hz
LF	0,2–0,7 Hz	0,075-0,15 Hz
HF	0,7–4,0 Hz	0,15-0,40 Hz
Modulación simpática	LF	LF
Respuesta vascular miogénica	VLF	VLF y LF
Sistema de NO	VLF y LF	Probablemente HF
SRA	VLF	-
Actividad simpática vascular	LF/HF	LF/HF

Adaptado de *Stauss, 2007*.

Distintas investigaciones han estudiado el comportamiento de la VPA en sujetos normotensos e hipertensos las cuales han sido de gran importancia debido a las posibles implicancias diagnósticas, pronósticas y de tratamiento que brinda el análisis espectral de la PA. De esta manera, el análisis de la VPA en el dominio de frecuencia permite estimar los mecanismos neurohumorales que se encuentran implicados en el desarrollo del estado hipertensivo y así poder optimizar la selección de la terapéutica antihipertensiva (Stauss, 2007). A pesar de los avances en el estudio de la fluctuación de la PA en el dominio de frecuencia, aún existen ciertas áreas del conocimiento sin explorar. Estas falencias surgen debido a que los estudios que se llevan a cabo para determinar la VPA no son equiparables ya que utilizan diferentes métodos (invasivos y no invasivos) y herramientas de software para su estimación.

### *Papel de los $\beta$ -bloqueantes en las guías de tratamiento de la hipertensión arterial*

El empleo de  $\beta$ -bloqueantes en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares surgió hace más de 40 años. Inicialmente fueron utilizados para la terapia de patologías como la arritmia y el estrés, pero luego su posicionamiento se consolidó al demostrar clínicamente la reducción de la morbimortalidad en pacientes con enfermedad coronaria, hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca (Fergus y cols.,



2015). No obstante, el papel de los  $\beta$ -bloqueantes en la terapia antihipertensiva se ha ido modificando a lo largo del tiempo. Actualmente se dispone de varios grupos de antihipertensivos de eficacia demostrada en términos de control de la PA, entre los cuales se encuentran los  $\beta$ -bloqueantes representados por una amplia cantidad de compuestos activos de diversas generaciones. En los últimos años se ha establecido que algunos agentes antihipertensivos, a pesar de aportar una reducción comparable de la PA, son menos efectivos en la prevención de eventos cardiovasculares en pacientes hipertensos. Los hallazgos obtenidos en estudios clínicos y meta-análisis demostraron que los  $\beta$ -bloqueantes resultan inferiores a otros agentes antihipertensivos en la reducción de ACV y mortalidad cardiovascular total, a pesar de las diferencias relativamente pequeñas en términos de reducción de la PA. Además, el uso de  $\beta$ -bloqueantes está asociado al desarrollo de efectos adversos no deseados, como el aumento del riesgo de diabetes mellitus y los trastornos lipídicos (Mann, 2017). En el año 2012 se publicó un trabajo de revisión del grupo Cochrane incluyendo 13 estudios clínicos aleatorizados y un total de 97.507 pacientes, de los cuales 40.245 recibían  $\beta$ -bloqueantes y a su vez el 75% de ellos eran tratados con atenolol (Wiysonge y cols., 2012). Se determinó la eficacia y seguridad sobre las tasas de morbilidad y mortalidad en pacientes con HTA en comparación con placebo (4 estudios), diuréticos (5 estudios), antagonistas cálcicos (4 estudios) e inhibidores del SRA (3 estudios). El análisis concluyó que iniciar el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes produce una modesta reducción del riesgo de padecer otras enfermedades cardiovasculares sin efectos significativos sobre la mortalidad. Además, la comparación evidenció que los  $\beta$ -bloqueantes son sólo moderadamente superiores al placebo y significativamente inferiores a otros grupos de antihipertensivos (Tabla 4). Sin embargo, los autores de la revisión manifestaron que la calidad de la evidencia disponible es muy baja y que los resultados requieren ser comprobados en estudios adecuadamente diseñados, no pudiendo ser generalizados a todos los  $\beta$ -bloqueantes debido a que la mayoría de los pacientes estaba bajo tratamiento con atenolol (Wiysonge y cols., 2012). Otro meta-análisis más reciente que incluyó a 145.811 participantes provenientes de 21 ensayos clínicos de HTA comparó la eficacia de los  $\beta$ -bloqueantes diferenciados en “atenolol” versus “no atenolol” según diferentes grupos etarios (Kuyper y col., 2014). El análisis de los resultados evidenció que el uso de  $\beta$ -bloqueantes en HTA está asociado a una

reducción significativa de la morbimortalidad cardiovascular en pacientes más jóvenes, pero no así en pacientes mayores, indicando que la edad podría ser un factor importante a tener en cuenta en el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes. Aunque el atenolol aumentó el riesgo de ACV en pacientes ancianos un 17% comparado a otros agentes antihipertensivos, los autores sostienen que estos resultados no deben ser extrapolados al resto de los  $\beta$ -bloqueantes. Para los  $\beta$ -bloqueantes más nuevos no pudo determinarse el riesgo de ACV debido a la escasez de datos (Kuyper y col., 2014).

Dos estudios clínicos muy importantes que derivaron al relegamiento de los  $\beta$ -bloqueantes en el tratamiento de la HTA no complicada fueron el ensayo clínico LIFE y el ASCOT-BLPA (Dahlöf y cols., 2005; Dahlöf y cols., 2002). El estudio LIFE comparó la tasa de eventos cardiovasculares en pacientes con hipertensión esencial aleatorizados a recibir atenolol o losartán durante un período de seguimiento de 4 años. Aunque ambos tratamientos atenuaron de manera equiparable la PA, el atenolol se asoció a mayor número de eventos cardiovasculares, ACV y diabetes de nuevo inicio en comparación con el losartán (Dahlöf y cols., 2002). De manera similar, el estudio ASCOT-BLPA, que incluyó un total de 19.257 pacientes con hipertensión, determinó el efecto de la terapia con amlodipina o atenolol sobre la prevención de eventos cardiovasculares. El análisis de los resultados evidenció que el tratamiento con atenolol produjo mayor número de muertes, ACV (fatal y no fatal) y diabetes de nuevo inicio (Dahlöf y cols., 2005). Sin embargo, al igual que en el estudio LIFE, los investigadores postulan que los efectos deletéreos del atenolol resultan independientes de su acción antihipertensiva debido a que en los dos brazos evaluados la reducción de la PA resultó similar (Dahlöf y cols., 2005) (**Tabla 4**).



**Tabla 4.** Comparación de los efectos de  $\beta$ -bloqueantes con placebo u otros agentes antihipertensivos sobre la mortalidad total, mortalidad cardiovascular y ACV.

Estudio o Subgrupo	$\beta$ -bloqueantes (n/N)	Comparador (n/N)	Riesgo relativo (IC 95%)
Mortalidad por cualquier causa			
Meta-análisis	455/9109	751/14504	0,99 (0,88-1,11)
Estudio LIFE	431/4588	383/4605	1,13 (0,99-1,29)
Estudio ASCOT-BLPA	820/9618	820/9618	1,11 (1,01-1,22)
Mortalidad cardiovascular			
Meta-análisis	240/9109	425/14504	0,93 (0,80-1,09)
Estudio LIFE	234/4588	204/4605	1,15 (0,96-1,38)
Estudio ASCOT-BLPA	342/9618	263/9639	1,30 (1,11-1,53)
ACV			
Meta-análisis	166/9109	333/14504	0,80 (0,66-0,96)
Estudio LIFE	309/4588	232/4605	1,34 (1,13-1,58)
Estudio ASCOT-BLPA	422/9618	327/9639	1,29 (1,12-1,49)

Adaptado de *Wiysonge y cols., 2017*

Consecuentemente, las guías comenzaron a considerar a los  $\beta$ -bloqueantes como una opción inferior para el tratamiento inicial de la HTA y han dejado de ser recomendados como medicación de primera línea para el control de la PA en pacientes con hipertensión no complicada, entre ellas el *National Institute for Health and Care Excellence (NICE)*, el *Eighth Joint National Committee (JNC 8)* y más recientemente las Guías europeas ESC/ESC. En el año 2006, la Guía del Instituto Nacional de Salud Británico y Excelencia Clínica en conjunto con la Sociedad Británica de Hipertensión (NICE/BSH) manifestaron por primera vez que los  $\beta$ -bloqueantes no constituyen fármacos de primera línea para el manejo de la HTA y que su decisión estaba basada en los resultados del estudio clínico ASCOT-BPLA y otros 3 meta-análisis publicados durante el año 2005 que mostraban una menor reducción de eventos cardiovasculares (NICE Guideline 2006). Resulta importante aclarar que dichos análisis no incluyen a los nuevos  $\beta$ -bloqueantes con propiedades vasodilatadoras debido a la escasa evidencia

disponible con estos fármacos en pacientes con HTA no complicada. La Guía del Consenso Argentino de HTA del año 2018 toma un posicionamiento similar al de las guías británicas con la salvedad de que resalta que la menor reducción de eventos cardiovasculares asociados al consumo de  $\beta$ -bloqueantes deriva de estudios en donde se utilizó el atenolol y que esta inferioridad no es necesariamente extrapolable a los nuevos fármacos vasodilatadores del grupo. Sin embargo, la inexistencia de estudios con puntos finales duros en pacientes con HTA esencial con este tipo de fármacos los pone en un nivel de inferioridad en cuanto a la elección inicial para hipertensos no complicados. (Guía del Consenso Argentino de HTA 2018). En su guía del año 2007, la Sociedad Europea de HTA y la Sociedad Europea de cardiología (ESH/ESC), en contraposición a las guías NICE, sostienen que no existe suficiente evidencia clínica que justifique que, entre las tiazidas,  $\beta$ -bloqueantes, IECA, ARA-II y bloqueantes cálcicos existan agentes superiores por sobre otros en HTA no complicada (Mancia y cols., 2007). Sin embargo, en la tercera edición de la guía publicada en el año 2013 se hacen algunas aclaraciones sobre el empleo de  $\beta$ -bloqueantes en HTA acerca de que si bien los meta-análisis considerados de mayor importancia por los autores de la guía no muestran diferencias clínicas relevantes entre las distintas clases de fármacos, se reconoce cierta inferioridad en la reducción del riesgo de ACV vinculada a una menor disminución de la PA central, pero sin diferencias en términos de mortalidad (Mancia y cols., 2013). Sin embargo, aunque reconocen menor regresión de daño de órgano blanco subclínico y mayores efectos adversos metabólicos, mantiene a los  $\beta$ -bloqueantes como fármacos de primera línea. Recientemente se publicó la cuarta edición de la guía, en el año 2018, la cual ya no considera a los  $\beta$ -bloqueantes en el tratamiento inicial de la HTA no complicada, sino que los relega cuando el empleo de IECA, ARA-II, diuréticos o bloqueantes cálcicos solos o combinados en triple terapia no resulta suficiente para alcanzar las metas de tensión arterial (Williams y cols., 2018). Las recomendaciones del *Eight Joint National Committee* (JNC 8) ponen de manifiesto que los  $\beta$ -bloqueantes no deben ser empleados en pacientes con HTA no complicada basado en la falta de estudios que demuestren la superioridad o equivalencia con bloqueantes cálcicos, diuréticos o antagonistas del SRA en reducción de complicaciones cardiovasculares y renales (James y cols., 2014). El panel analizó también el riesgo de diabetes de nuevo inicio, afirmando que los  $\beta$ -bloqueantes

aumentan los casos de diabetes en comparación con los ARA-II en función de los datos del estudio LIFE. La Guía de la Sociedad Japonesa de Hipertensión (JSH) mantiene una postura similar al JNC 8 mientras que la Guía Canadiense del Programa de Educación en Hipertensión (CHEAP) del año 2006 plantea firmemente el concepto de que en el individuo con HTA no complicada los beneficios dependen principalmente de la magnitud de descenso de la PA. Respecto a los  $\beta$ -bloqueantes destaca que el meta-análisis en el cual se observó una menor reducción del ACV respecto a otros antihipertensivos presenta heterogeneidad en sus resultados e influencia en donde la edad media de los pacientes era mayor de 60 años, no observándose inferioridad en pacientes menores de dicha edad (Khan y cols., 2006; Shimamoto y cols., 2014). En los años posteriores y hasta la reciente actualización de la guía en el año 2015, continúan recomendando a los  $\beta$ -bloqueantes como fármacos de primera línea en pacientes menores de 60 años (Koule y cols., 2015). La misma postura mantiene la guía canadiense de HTA del año 2018 (Nerenberg y cols., 2018). Por último, cabe destacar que existe absoluto consenso entre las guías acerca del empleo de  $\beta$ -bloqueantes en HTA ante la presencia de insuficiencia cardíaca con deterioro de la función sistólica y/o enfermedad coronaria. A pesar de toda la problemática actual, este grupo farmacológico continúa siendo ampliamente utilizado y prescripto en todo el mundo. En Argentina, la publicación en el año 2017 del registro RENATA-2 comunicó que únicamente el 20% de los individuos hipertensos tratados recibía  $\beta$ -bloqueantes mientras que 42% empleaba IECA y 35% ARA-II. Sin embargo, la terapia con  $\beta$ -bloqueantes fue superior a la proporción de pacientes que utilizaba antagonistas cálcicos (13%) y diuréticos (11%) (Delucchi y cols., 2017).

En los estudios clínicos, el nivel de PA alcanzado luego de la terapia con  $\beta$ -bloqueantes no difiere del resto de los antihipertensivos, sugiriendo que la inferioridad de la clase resulta independiente del control tensional. Una de las principales críticas a los ensayos aleatorizados es que la mayoría se ha limitado a la evaluación de los  $\beta$ -bloqueantes vasoconstrictores tradicionales, particularmente el atenolol (Mann, 2017). La corta duración de acción por parte del atenolol también ha sido postulada como un factor contribuyente a su menor protección cardiovascular. Por lo tanto, resulta incierto si estos resultados adversos se presentan únicamente en el atenolol o si pueden extrapolarse al resto de los fármacos de la clase (Mann, 2017).

Desafortunadamente, no existe evidencia similar derivada de ensayos clínicos en  $\beta$ -bloqueantes más recientes y con efecto vasodilatador, como el carvedilol o el nebivolol, los que además tienen menos riesgo de desarrollo de diabetes comparados con los clásicos betabloqueantes (Bravo y col., 2015).

### *Bloqueantes $\beta$ adrenérgicos: diferencias entre segunda y tercera generación*

Como grupo, los  $\beta$ -bloqueantes se caracterizan por bloquear de manera competitiva y reversible el sitio de unión de las catecolaminas de los receptores  $\beta$  adrenérgicos. La inhibición competitiva tiene impacto en la práctica clínica dado que el incremento en la actividad simpática o el uso de agonistas  $\beta$  adrenérgicos puede revertir o modificar el efecto. Es por ello por lo que también se considera que sus efectos son más pronunciados cuando el tono simpático es elevado. Los  $\beta$ -bloqueantes representan un amplio grupo farmacológico con características heterogéneas en términos de selectividad  $\beta_1$ -adrenérgica, actividad simpaticomimética intrínseca, liposolubilidad, absorción gastrointestinal, vida media, metabolismo hepático de primer paso, unión a proteínas plasmáticas, penetración en el sistema nervioso central, concentración en el tejido cardiaco, velocidad de biotransformación hepática, aclaramiento renal del fármaco y/o metabolitos, efectos sobre el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e insulinoresistencia y propiedades vasodilatadoras, entre otros (Elliott y col., 2011; Fergus y cols., 2015; Ripley y col., 2014). Tal heterogeneidad hace que estos agentes puedan clasificarse en 3 generaciones bien diferenciadas: los de primera generación (propranolol, sotalol, timolol) que ejercen un bloqueo  $\beta_1$  y  $\beta_2$  adrenérgico no selectivo, los de segunda generación (atenolol, metoprolol) que presentan una selectividad  $\beta_1$  mayor y los de tercera generación que presentan propiedades vasodilatadoras y que pueden ser altamente cardiosselectivos (nebivolol) o no cardiosselectivos (carvedilol, labetalol) (Wiysonge y cols., 2017). Aunque algunos autores postulan que estas diferencias farmacológicas no son relevantes en la práctica clínica, varios ensayos han demostrado la importancia de las diversas características de  $\beta$ -bloqueantes específicos (Elliott y col., 2011).

El atenolol es un  $\beta$ -bloqueante de segunda generación que presenta una afinidad por el receptor  $\beta_1$  alrededor de 10 veces mayor respecto al adrenoceptor  $\beta_2$ , motivo por el cual, aunque a dosis terapéuticas posee cierta cardioselectividad, la misma se pierde con la administración de altas dosis (Pires de Abreu y cols., 2002). El atenolol es un compuesto hidrofílico y si bien se absorbe de manera incompleta por vía oral (40%), sufre escaso metabolismo de primer paso, por lo que sus niveles plasmáticos presentan baja variabilidad interindividual. Se elimina por vía renal por lo que debe reducirse la dosis en pacientes con insuficiencia renal (Ripley y col., 2014). Aunque el atenolol disminuye significativamente la PA braquial, diversos estudios clínicos han evidenciado que presenta nula eficacia para reducir la PA central e incluso podría aumentarla (Ripley y col., 2014; DiNicolantonio y col., 2012). El atenolol carece de propiedades pleiotrópicas y efecto antioxidante o antiinflamatorio (DiNicolantonio y col., 2012). Además, es un fármaco que produce alteraciones en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, tanto por causas hemodinámicas como metabólicas, acciones que son atribuidos a la generación de vasoconstricción periférica. Dicho incremento de la resistencia vascular disminuye la llegada y la captación de glucosa por parte de las células del músculo esquelético, situación que estaría implicada en la alteración del metabolismo de hidratos de carbono, insulinoresistencia y diabetes de nuevo inicio (DiNicolantonio y col., 2012). Sumado a ello, los  $\beta$ -bloqueantes reducen la secreción pancreática de insulina, la utilización periférica de glucosa, favorecen el aumento de peso y estimulan la glucógenolisis. En el tejido adiposo, la activación de los receptores  $\beta_3$  adrenérgicos está implicada en la oxidación de ácidos grasos, la lipólisis y la termogénesis. Mientras que los fármacos tradicionales bloquean los receptores  $\beta_3$  adrenérgicos, se encuentra ampliamente establecido que el nebivolol actúa como agonista (Cannavo y col., 2017). Además, los  $\beta$ -bloqueantes clásicos disminuyen la actividad de la lipoproteinlipasa reduciendo el aclaramiento de triglicéridos.

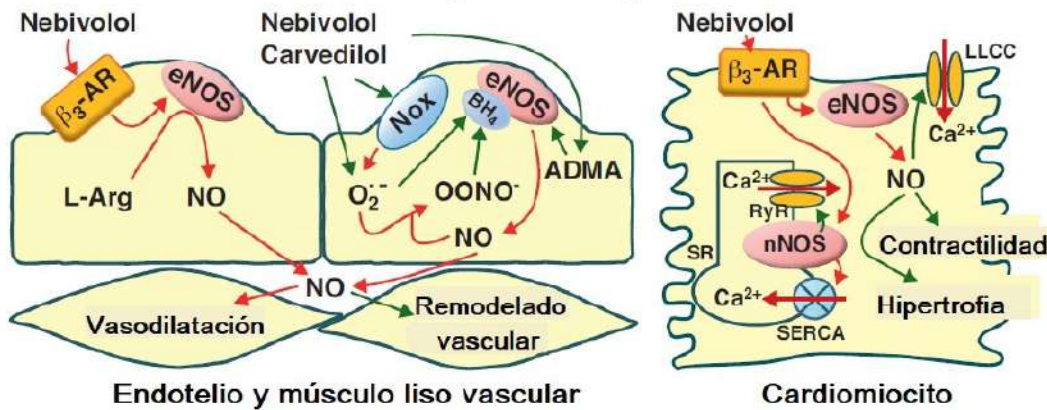
A diferencia del atenolol, los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores, como el carvedilol y el nebivolol, reducen la PA central, mantienen un perfil metabólico neutral y presentan numerosos efectos pleiotrópicos independientes de su bloqueo  $\beta$  adrenérgico (Ripley y col., 2014; Vanhoutte y col., 2013). El nebivolol es un  $\beta$ -bloqueante de tercera generación altamente cardioselectivo (nebivolol:  $pK_i$   $R\beta_1$ :

8,20 $\pm$ 0,12, atenolol pKi R $\beta_1$ : 5,94 $\pm$ 0,06) que ejerce un efecto vasodilatador por activación de la enzima NOS a través de su agonismo sobre los receptores  $\beta_3$  adrenérgicos (Fongemie y col., 2015; Lowe y cols., 2002; Maack y cols., 2001). Los efectos pleiotrópicos del nebivolol incluyen la facilitación de los procesos de reparación tisular y de la angiogénesis por su acción a nivel de la transcripción inversa en la respuesta inmunomediada por linfocitos T, el efecto antioxidante directo por unión y neutralización de especies reactivas de oxígeno, el aumento de la biodisponibilidad del NO por inhibición del compuesto endógeno dimetilarginina asimétrica (ADMA, por sus siglas en inglés), la modulación de la actividad enzimática de NADPH oxidasa y la disminución de la concentración de calcio intracelular de cardiomiocitos vía receptor  $\beta_3$  adrenérgico, entre otros (Vanhoutte y col., 2013).

Por su parte, el carvedilol es un bloqueante de los receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\alpha_1$  con regulación a la alta (*up-regulation*) de receptores muscarínicos M2 (Xu y cols., 2006). A nivel preclínico se encuentran ampliamente descritos diversos efectos pleiotrópicos, tales como la regulación citosólica y mitocondrial del calcio, la acción antiinflamatoria por sus efectos sobre numerosas citoquinas, la disminución del infiltrado inflamatorio, la reducción de la migración de células musculares lisas y el efecto antiapoptótico. Al igual que el nebivolol, presenta acción antioxidante directa por unión y neutralización de especies reactivas de oxígeno e indirecta por modulación de la actividad enzimática de la NADPH oxidasa. También aumenta la biodisponibilidad del NO por su efecto inhibitor sobre ADMA (Vanhoutte, 2013). Las acciones pleiotrópicas del carvedilol contribuyen consistentemente en la protección del daño de órgano blanco y estarían implicadas en la reducción del remodelado vascular y cardíaco evidenciados por los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores carvedilol y nebivolol (**Figura 2**) (Ripley y col., 2014; Vanhoutte y col., 2013). En un meta-análisis publicado recientemente, comparando distintos  $\beta$ -bloqueantes (carvedilol, atenolol, metoprolol, bisoprolol y nebivolol), el carvedilol demostró ser capaz de lograr una mayor reducción de la mortalidad de pacientes con insuficiencia cardíaca sistólica (DiNicolantonio y cols., 2013). Así, el carvedilol es el  $\beta$ -bloqueante que posee el más alto respaldo científico que abala su uso en pacientes con HTA asociada a insuficiencia cardíaca o disfunción ventricular izquierda.



**Figura 2.** Efectos pleitrópicos del carvedilol y nebivolol en el tejido cardíaco y vascular. Las flechas verdes indican inhibición y las flechas rojas estimulación.



Adaptado de Vanhoutte y col., 2013.

ADMA: dimetil arginina asimétrica;  $\beta_3$ -AR: receptor  $\beta_3$ -adrenérgico; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial L-Arg: L-arginina NO: óxido nítrico nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal; NOX: NADPH oxidasa

Los  $\beta$ -bloqueantes de acción vasodilatadora, como el carvedilol y el nebivolol, han demostrado una mejor tolerabilidad y menor incidencia de efectos adversos en comparación con los clásicos, principalmente a nivel metabólico (Tabla 5). Los efectos metabólicos de los  $\beta$ -bloqueantes están, en gran parte, relacionados a su selectividad y a la acción vasodilatadora o  $\alpha$  mediada. Así, los fármacos más selectivos y vasodilatadores, independientemente de su mecanismo, son los que menos efectos metabólicos deletéreos produzcan e incluso, en algunos casos, han mostrado acciones beneficiosas (Fergus y cols., 2015). A modo de ejemplo, un estudio clínico llevado a cabo por Giugliano y colaboradores (1997) demostró, sobre un total de 45 pacientes hipertensos y con diabetes tipo 2, que aquellos que habían sido tratados durante 24 semanas con carvedilol experimentaron una reducción de la glucemia e insulina plasmática a diferencia del atenolol que aumentó dichas determinaciones, pese a reducciones similares de PA. El grupo tratado con el  $\beta$ -bloqueante vasodilatador también mostró menores niveles de triglicéridos y peroxidación lipídica y mayor colesterol HDL. De manera similar, la administración de metoprolol 100 mg por día durante 12 semanas a pacientes con síndrome metabólico disminuye la sensibilidad a la insulina y eleva el estrés oxidativo mientras que el nebivolol carece de dichos efectos metabólicos deletéreos (Ayers y cols., 2012). Por otro lado, varios ensayos

clínicos han establecido que los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación reducen la PA central. En un análisis retrospectivo, que incluyó 328 pacientes con idéntico nivel de PA periférica, el grupo tratado con atenolol presentó mayor valor de PA central y menor amplificación de la onda de pulso a comparación de carvedilol y nebivolol (Williams y cols., 2009). En dosis necesarias para alcanzar una reducción similar de la PA periférica, el nebivolol ha demostrado lograr niveles significativamente menores de tensión arterial central a comparación del atenolol o metoprolol (Dhakam y cols., 2008; Kampus y cols., 2011). En la **Tabla 5** se comparan cualitativamente los efectos farmacológicos más relevantes de  $\beta$ -bloqueantes tradicionales, vasodilatadores y otros grupos de antihipertensivos.

**Tabla 5.** Comparación cualitativa de algunos efectos farmacológicos de  $\beta$ -bloqueantes tradicionales, vasodilatadores y otros grupos de antihipertensivos

	Droga Ideal	$\beta$ -bloqueantes tradicionales	$\beta$ -bloqueantes vasodilatadores	Antagonistas cálcicos DHP	IECA ó ARA-II	Diuréticos tiazídicos
PA Periférica	↓	↓	↓	↓	↓	↓
PA Central	↓	↑	↓	↓	↔ ó ↓	↔
Resistencia Vascular Periférica	↓	↑	↓	↓	↓	↓
Gasto cardíaco	↔	↓	↔	↔	↔	↔
Frecuencia cardíaca	↔ ó ↓	↓	↓	↑	↔	↔
Activación del SNS	↓	↓	↓	↑	↓	↑
Activación del SRA	↓	↓	↓	↑	↓	↑
Triglicéridos	↔ ó ↓	↑	↔	↔	↔ ó ↓	↑
Glucemia	↔ ó ↓	↑	↔	↔	↔	↑

↑: aumenta, ↓: disminuye ↔: no se modifica

DHP: Dihidropiridínicos SNS: sistema nervioso simpático SRA: sistema renina angiotensina. Adaptado de *Fares y cols., 2012; Kostapanos y cols., 2016.*

### *Modelos animales de hipertensión arterial*

El desarrollo de animales hipertensos ha sido esencial para comprender y estudiar la fisiopatología de la HTA. Teniendo en cuenta que la etiología de la hipertensión puede ser multifactorial, el uso de modelos experimentales proporciona amplia información sobre muchos aspectos de la enfermedad, incluyendo su



fisiopatología, complicaciones y tratamiento. Además, al existir numerosas sustancias endógenas implicadas en el control de la PA resulta indispensable la utilización de distintos modelos experimentales para determinar la importancia relativa de los diferentes sistemas neurohumorales en su desarrollo y mantenimiento. Así, existen múltiples modelos con hipertensión inducida mediante cirugía, dieta específica o administración de diversas sustancias químicas. También existen animales que generan una elevación espontánea de la PA sin la necesidad de ningún tipo de intervención, la cual puede ser dependiente del fenotipo, cuando las variaciones naturales surgen y se mantienen por endocría, o del genotipo cuando existe manipulación genética de la expresión de genes (Dornas y col., 2011).

Los distintos modelos experimentales comparten numerosas características con la HTA humana motivo por el cual permiten la evaluación de todos aquellos factores responsables del desarrollo, mantenimiento y respuesta farmacológica de la hipertensión esencial. El modelo genético de HTA más ampliamente utilizado es el de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Las SHR fueron selectivamente endocriadas para desarrollar altos valores de PA sin la necesidad de intervención alguna en el año 1963 en la ciudad de Kyoto, Japón (Okamoto y col., 1963). Sin embargo, los factores ambientales también afectan la elevación de la PA (Dornas y col., 2011). En las primeras etapas de la hipertensión, las ratas SHR presentan un aumento del gasto cardíaco con una resistencia periférica total normal y un incremento de la actividad simpática. A medida que el animal crece y se desarrolla, el estado hipertensivo progresa, el gasto cardíaco regresa a los valores normales y los vasos sanguíneos hipertrofiados producen un aumento en la resistencia periférica total (Dornas y col., 2011). En las ratas SHR, la PA sistólica comienza a elevarse a partir de las 4 a 6 semanas de edad y alcanza valores de aproximadamente 180-200 mmHg a las 12 semanas. La PA se eleva aproximadamente 33% en relación a las ratas Wistar Kyoto normotensas, cuyo valor de tensión arterial a los 3 meses de edad ronda los 115-130 mmHg (Zicha y col., 1999). El modelo de SHR presenta una hiperactividad del sistema nervioso simpático central y periférico que desempeña un rol esencial en el desarrollo y mantenimiento del estado hipertensivo en el humano (Iriuchijima, 1973). Fisiopatológicamente, también se caracteriza por la presencia de disfunción endotelial, aumento del estrés oxidativo, disminución de la biodisponibilidad del NO e incremento

de factores vasoconstrictores (Crabos y cols., 1997). Con el avance de la HTA, la elevación sostenida de la PA favorece el desarrollo progresivo de daño de órgano blanco y comienza a evidenciarse alteraciones estructurales cardíacas, daño renal y remodelado vascular progresivo con aumento en el espesor de la túnica media y cambios en la composición de la matriz extracelular (Dornas y col., 2011). La importancia de este modelo radica en su similitud con la fisiopatología de la hipertensión esencial en el humano (Dornas y col., 2011).

El estudio de la relajación endotelial empleando inhibidores de la enzima NOS ha permitido demostrar que la síntesis de NO juega un papel central en el efecto vasodilatador dependiente del endotelio (Moncada y cols., 1991). Así, la administración aguda de inhibidores de la NOS produce un marcado asenso de la PA acompañado de reducción de la FC, disminución del gasto cardíaco y aumento de la resistencia periférica total (Gouédard y cols., 1996). El NO además resulta un factor importante en el control de la fluctuación de la PA (Persson, 1996). Un estudio preclínico realizado en perros consientes evidenció que la inhibición de la síntesis de NO incrementó la VPA a lo largo de 24 horas (Persson y cols., 1992). El NO también ha demostrado su amplia capacidad para atenuar la oscilación de la PA en ratas (Gouédard y cols., 1996). La administración oral crónica del inhibidor de la NOS, éster metílico de N-Nitro-L-arginina (L-NAME), genera hipertensión persistente asociada a un desbalance entre los factores vasodilatadores y vasoconstrictores que modifican la homeostasis vascular. De esta manera, el tratamiento a largo plazo con L-NAME genera aumento del estrés oxidativo, elevación de citoquinas proinflamatorias, sobreactivación del sistema nervioso simpático y del SRA, cambios estructurales y funcionales en los vasos sanguíneos y el corazón y lesión renal caracterizada por glomerulosclerosis, isquemia glomerular e infiltración intersticial en el riñón (Doggrell y col., 1998; Dornas y col., 2011; Miguel-Carrasco y cols., 2008). Cabe destacar que, en relación a las anomalías cardíacas, el nivel de hipertrofia en este modelo es relativamente menor en comparación con otros modelos con niveles de PA similares (Dornas y col., 2011).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis principal es que el tratamiento oral y crónico con  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores induciría una mayor atenuación de la PA central y de la VPA con respecto al bloqueante  $\beta$ -adrenérgico atenolol y de manera equiparable a la amlodipina. Como consecuencia directa del mayor control de dichos factores de riesgo de índole cardiovascular, carvedilol y nebivolol producirían una protección superior del daño de órgano blanco a nivel del ventrículo izquierdo y de la aorta torácica en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) e hipertensas por la administración de L-NAME en comparación con el atenolol. Finalmente, el presente trabajo postula que la prevención del daño de órgano blanco ejercida por los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación es, en parte, independiente del efecto antihipertensivo.

En la presente tesis doctoral se propone estudiar los efectos de la administración crónica de los  $\beta$ -bloqueantes atenolol, carvedilol y nebivolol o el bloqueante cálcico amlodipina sobre la PA central, la VPA de corto plazo y su impacto sobre el daño de órgano blanco a nivel del ventrículo izquierdo y la aorta torácica en ratas SHR e hipertensas por la administración de L-NAME.

De acuerdo a la hipótesis planteada, los objetivos específicos de la presente tesis son:

- Comparar el efecto de la administración oral durante 2 meses de nebivolol (30 mg/kg/día), carvedilol (30 mg/kg/día), atenolol (90 mg/kg/día), amlodipina (10 mg/kg/día) o vehículo sobre la PAS y su variabilidad de corto y mediano plazo mediante la medición de la PA indirecta en los modelos experimentales bajo estudio.
- Comparar el efecto de la administración oral durante 2 meses de nebivolol (30 mg/kg/día), carvedilol (30 mg/kg/día), atenolol (90 mg/kg/día), amlodipina (10 mg/kg/día) o vehículo sobre la PAS central, frecuencia cardíaca y variabilidad de la PA de corto plazo y latido-a-latido mediante la medición de la PA directa, continua y carotídea en los modelos experimentales bajo estudio.
- Elucidar el mecanismo de acción crónico del nebivolol, carvedilol, atenolol y amlodipina a través del análisis espectral del registro de la PA y el efecto de los

diferentes fármacos sobre la variabilidad de la PA latido-a-latido en distintos dominios de frecuencia.

- Estudiar el efecto de la administración a largo plazo de carvedilol, nebivolol, atenolol y amlodipina sobre marcadores morfológicos de daño de órgano blanco tales como índice de masa ventricular izquierda, área promedio de cardiomiocitos, ecocardiografía y espesor de la túnica media aórtica en los modelos experimentales bajo estudio.
- Estudiar el efecto de la administración a largo plazo de carvedilol, nebivolol, atenolol y amlodipina sobre marcadores bioquímicos de fibrosis e inflamación en los modelos experimentales bajo estudio.
- Evaluar el efecto de la administración a largo plazo de carvedilol, nebivolol, atenolol y amlodipina sobre marcadores histológicos de daño de órgano blanco a nivel del ventrículo izquierdo y la aorta torácica en los modelos experimentales bajo estudio.
- Establecer la relación existente entre la atenuación de la PA y la VPA de corto plazo con la prevención del daño de órgano blanco en los modelos experimentales bajo estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Ácido acético glacial	Sintorgan, Argentina
Ácido clorhídrico	Sintorgan, Argentina
Ácido etilen-diamino-tetraacético disódico (EDTA)	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Ácido etilen-glicol-tetraacético (EGTA)	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Ácido pícrico	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Acrilamida/bisacrilamida (29:1)	Biorad, EE. UU.
Albúmina sérica bovina	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Anticuerpo monoclonal anti $\beta$ -tubulina	Amersham, GE Healthcare Life Science, Suecia
Anticuerpo monoclonal anti gliceraldehído fosfato deshidrogenasa	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.
Anticuerpo policlonal de cabra anti IL-6	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.
Anticuerpo policlonal de cabra anti TGB- $\beta_1$	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.
Anticuerpo policlonal de cabra anti TNF- $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.
Anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con la peroxidasa de rábano	Amersham, GE Healthcare Life Science, Suecia
Amlodipina	Droguerías Saporiti, Argentina
Atenolol	Droguerías Saporiti, Argentina
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Azul de Coomassie	Biorad, EE. UU.
Balsamo de Canadá	Biopack, Argentina
Carbonato de sodio	Anedra, Argentina
Carboximetilcelulosa sódica	Sigma-Aldrich, EE. UU.

Carvedilol	Droguerías Saporiti, Argentina
Cloruro de calcio	Anedra, Argentina
Cloruro de potasio	Anedra, Argentina
Cloruro de sodio	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Cloruro de Zinc	Sigma-Aldrich, EE. UU
Cocktail de inhibidores de proteasa	Thermo Scientific, Rockford, EE. UU
D- $\alpha$ -tocoferilpolietilenglicol succinato 1000	Eastman Chemical Company, Tennessee, EE. UU.
Desoxicolato de sodio	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Dodecil sulfato de sodio	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Eosina Y	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Etanol (100º, 95º, 70º)	Sintorgan, Argentina
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Fluoruro de sodio	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Folin (reactivo de)	Biorad, EE. UU.
Formaldehido	J.T. Baker Inc., EE. UU.
Fosfato ácido de sodio	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Fosfato de sodio	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Fosfato diácido de potasio	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Gelatina porcina	Sigma-Aldrich, EE. UU
Glicerol	Promega, EE. UU.
Glicina	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Hematoxilina de Mayer	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Hidróxido de sodio	Anedra, Argentina
Ketamina	Holliday Scott S.A., Argentina
Leche en polvo descremada	Nestlé, Suiza.



N <sup>w</sup> -Nitro-L-arginina metil éster clorhidrato (L-NAME)	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Marcador de peso molecular Full Range Rainbow	Amersham, GE Healthcare Life Science, Suecia
Marcador de peso molecular Kaleidoscope Prestained Protein Standards	Biorad, EE. UU.
Membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF)	Amersham, GE Healthcare Life Science, Suecia
Metanol	Sintorgan, Argentina
$\beta$ -Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Nebivolol	Laboratorio Raffo, Argentina
Paraformaldehido	Biopack, Argentina
Persulfato de amonio	Promega, EE. UU.
Pervanadato de sodio	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Placas autoradiográficas	Kodak, EE. UU.
Propilenglicol	Biopack, Argentina
Rojo de Ponceau	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Sirius red F3B	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Sistema de detección Amersham ECL-Plus	Amersham, GE Healthcare Life Science, Suecia
Sulfato de cobre pentahidratado	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Tartato de sodio	Sigma-Aldrich, EE. UU.
N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)	Fisher Scientific, EE. UU.
tris(hidroximetil)aminometano (Tris-base)	Sigma-Aldrich, EE. UU.
tris(hidroximetil)aminometano HCL (Tris-HCL)	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Tritón X-100	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Tween 20	Sigma-Aldrich, EE. UU.
Xilazina	Kensol König S.A., Argentina
Xileno	Sintorgan, Argentina

### **Modelos animales**

Se utilizaron dos modelos animales de hipertensión arterial:

- Ratas SHR macho.
- Ratas hipertensas por la administración oral y crónica de L-NAME macho.

El modelo experimental de hipertensión genética fue implementado mediante el uso de ratas SHR (edad: 3 meses, peso corporal: 200 gramos) y animales normotensos Wistar Kyoto (WKY, edad: 3 meses, peso corporal: 200-250 gramos) endocriados en el bioterio de la cátedra de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Para el desarrollo del modelo de hipertensión inducida por L-NAME se utilizaron ratas Wistar (edad: 3 meses, peso corporal: 200-250 gramos), que recibieron solución de L-NAME 0,3 mg/ml (30 mg/kg/día) en el agua de bebida *ad libitum* durante las ocho semanas de tratamiento. Los animales Wistar del grupo control normotenso bebieron agua corriente durante ocho semanas.

Durante todo el desarrollo experimental, los animales se mantuvieron en jaulas adecuadamente acondicionadas, con un máximo de 4 ejemplares, ubicadas en un sitio de acceso limitado con adecuada recirculación de aire y a temperatura controlada de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  y con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Todos los animales fueron alimentados con alimento estándar para roedores (Asociación Cooperativas Argentinas, Buenos Aires, Argentina), conteniendo: 20% de proteínas, 3% de grasas, 2% de fibras, 6% de minerales, 69% de almidón y suplementos vitamínicos.

### **Preparación de las formulaciones de las drogas evaluadas**

Con el objetivo de asegurar que todos los animales estudiados reciban exactamente la dosis necesaria y que no existan diferencias entre ellos respecto a la cantidad de droga ingerida, se desarrollaron formulaciones líquidas de cada uno de los fármacos estudiados para su administración oral por sonda gástrica o trócar.

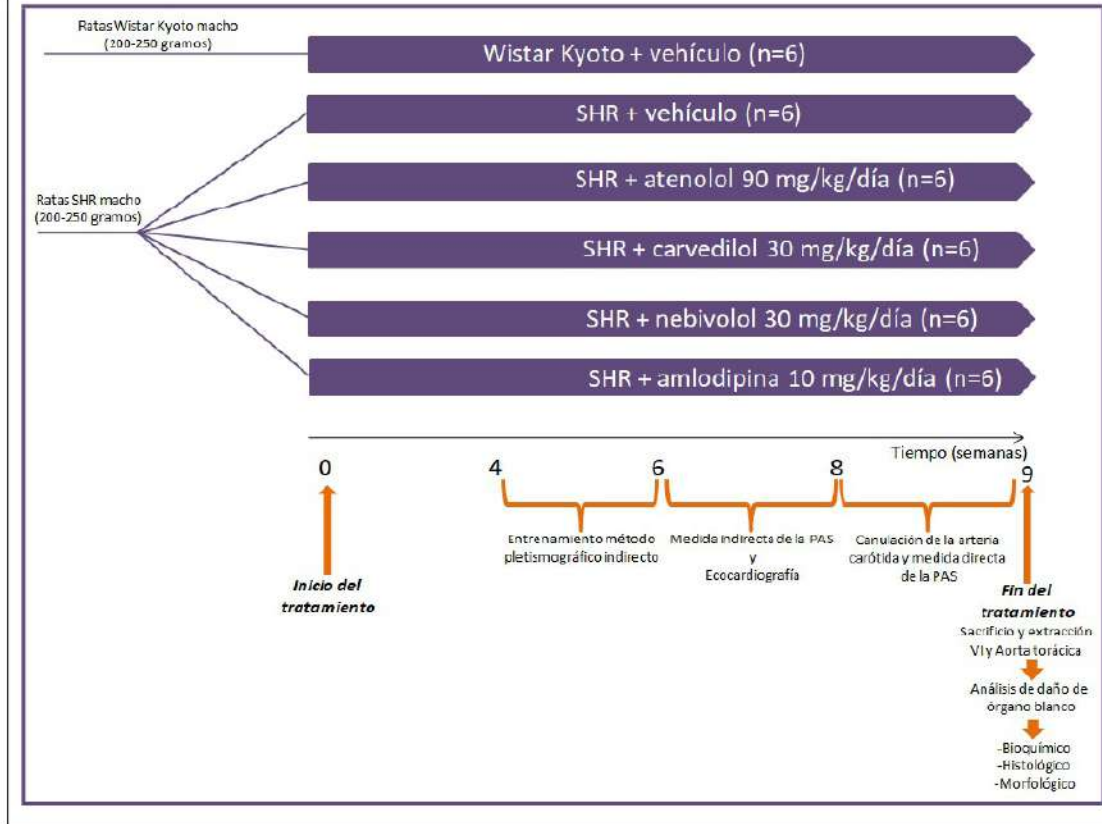
Tanto el carvedilol como el nebivolol presentan escasa solubilidad en agua y para su adecuada solubilización se utilizó un medio que además de los fármacos en una concentración de 0,5% p/v, contenía 10% p/v de succinato de D- $\alpha$ -tocoferilpolietilenglicol 1000 (TPGS), 40% v/v de propilenglicol y agua purificada en cantidad suficiente. La amlodipina, aunque presenta una solubilidad acuosa mayor que los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación, se disolvió en TPGS al 5% p/v como adyuvante para lograr la concentración deseada (0,5% p/v). En cambio, para la administración de atenolol se desarrolló una suspensión oral de 30 mg/mL en una solución de carboximetilcelulosasódica al 0,5% p/v. El vehículo se compuso de una solución de base acuosa con 10% p/v de TPGS, 40% v/v de propilenglicol y 0,5% p/v de carboximetilcelulosa sódica.

### ***Diseño experimental***

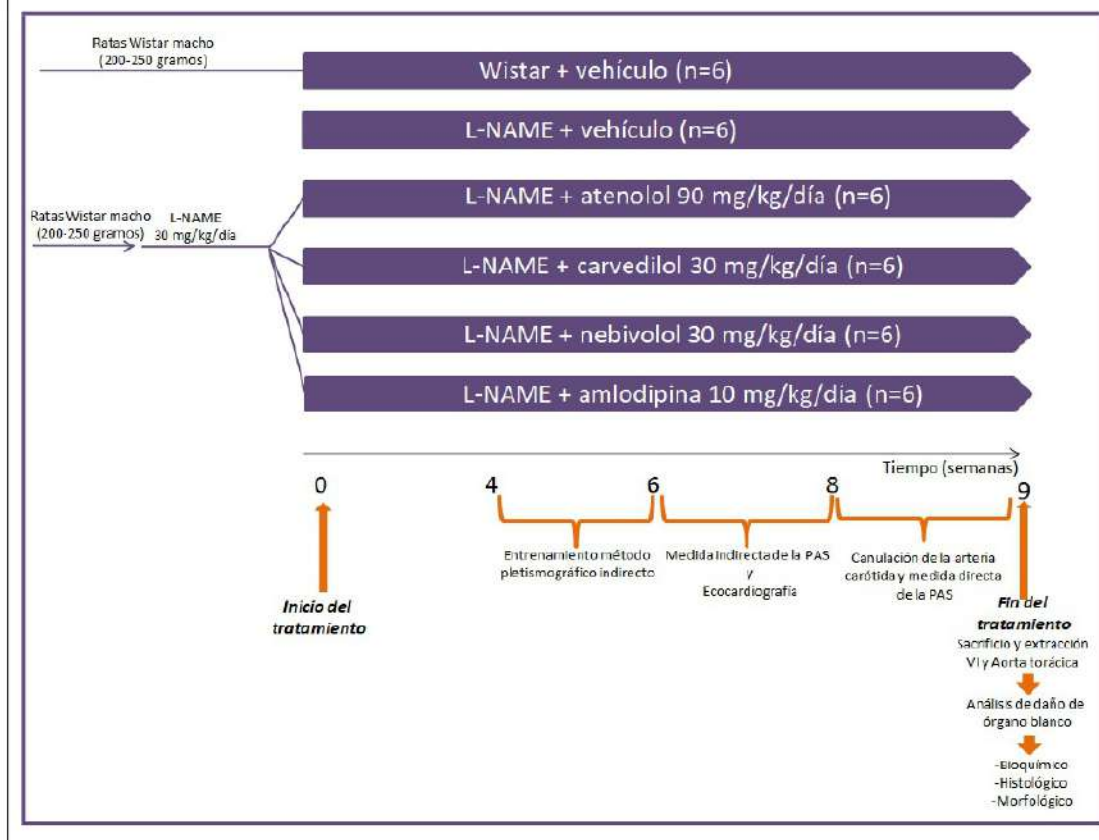
Los animales fueron tratados durante 8 semanas con atenolol 90 mg/kg/día, carvedilol 30 mg/kg/día, nebivolol 30 mg/kg/día, amlodipina 10 mg/kg/día o vehículo (**Figura 3** y **Figura 4**). Los fármacos y el vehículo fueron administrados diariamente por vía oral, como se mencionó anteriormente mediante el empleo de trócar. Para corregir la dosis en función del peso corporal a medida que la edad de los animales avanzaba, se determinó semanalmente el peso promedio por grupo experimental y en función de ello se corrigió el volumen de administración de solución o suspensión de cada fármaco.

Con el fin de evitar una elevada disminución de la PA y de esta manera no sesgar el efecto de la VPA sobre el daño de órgano blanco se emplearon dosis relativamente bajas de las drogas en estudio (Li y cols., 2006; Ohlstein y cols., 1994; Varagic y cols., 2012).

**Figura 3.** Diseño experimental para el modelo de animales genéticamente hipertensos.



**Figura 4.** Diseño experimental para modelo de animales hipertensos por la administración crónica de L-NAME (30 mg/kg/día) en el agua de bebida.



### ***Determinación indirecta de la presión arterial***

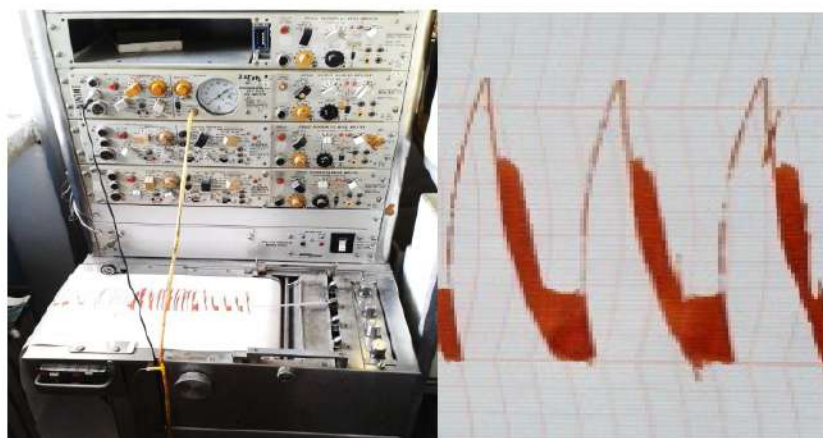
Durante las últimas 2 semanas de tratamiento, se evaluó la PAS en animales despiertos a partir del método indirecto pletoisomográfico utilizando un esfigmomanómetro en la cola de la rata y un micrófono conectado a un amplificador Grass D.C. (modelo 7DAC, Grass Instruments Co. Quincy, MA, EE. UU.) acoplado a un polígrafo (modelo 79D, Grass Instruments Co. Quincy, MA, EE. UU.) (Figura 5). Las ratas fueron entrenadas al método no invasivo de *tail-cuff* 3 veces a la semana durante las 2 semanas previas a las determinaciones finales y bajo las mismas condiciones experimentales, pero donde únicamente se realizaba la inflación-deflación del manguito de presión, sin registrar los valores de PAS. Primero, para su aclimatación, las ratas fueron acondicionadas en una habitación silenciosa durante 60 minutos. Luego, uno a uno, los animales fueron colocados sobre una almohada térmica a 37°C dentro



de un *restrainer* de acrílico con el esfigmomanómetro y el micrófono colocados sobre la cola. Después de 3 minutos de calor centralizado en la arteria caudal de la cola del animal para lograr una adecuada vasodilatación y la obtención de pulso arterial, se registró el valor de la PAS como el promedio de seis mediciones realizadas durante un período de 10 minutos. Se descartaron las medidas consideradas aberrantes por movimientos del animal o artefactos. Además, la medición se realizó consistentemente en el mismo horario, iniciando a las 13 horas, con el fin de evitar las interferencias del ritmo circadiano de la PA sobre los valores obtenidos. Por último, se determinó el DE intradía de la PAS, a partir del DE de las seis mediciones consecutivas de la PAS para cada animal dentro mismo día y el DE entredía de la PAS, calculado como el DE del valor promedio de PAS diaria obtenida cada uno de los días en los que se realizó el experimento.

La evaluación de la PAS y su fluctuación intra y entredía se realizó en función de las "Recomendaciones para la determinación de la presión arterial en animales de experimentación" del *Subcommittee of Professional and Public Education de American Heart Association Council on High Blood Pressure Research*; el cual establece la determinación de la PAS a partir del promedio de 3 a 10 valores en una sesión. Finalmente, para minimizar la posibilidad de sesgo de los resultados, el experimento se realizó a "ciego" con respecto a los grupos experimentales y los animales se sometieron al ensayo de forma aleatoria (Kurtz y cols., 2005).

**Figura 5.** Polígrafo empleado para la obtención indirecta de PAS (izquierda) e imagen representativa del registro de presión obtenido.





### **Ecocardiografía**

Con el objetivo de realizar los estudios ecocardiográficos, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina 35 mg/kg y xilazina 5 mg/kg administradas por vía intramuscular. Se les rasuró el tórax bajo condiciones asépticas y se colocaron en una camilla en decúbito dorsal. Se obtuvieron imágenes de las 4 cámaras del corazón, utilizando un ecocardiógrafo Acuson Sequoia C512 (Siemens, Berlín, Alemania) equipado con un transductor lineal de 14-MHz. Se realizaron ecocardiografías bidimensionales en el eje corto paraesternal para luego obtener trazados en modo M a nivel de los músculos papilares. Los diámetros y los espesores de las paredes del VI fueron determinados durante la sístole y la diástole, según lo establecido en las “Guías para la cuantificación del ventrículo izquierdo por ecocardiografía bidimensional” de la *American Society of Echocardiography* (Schiller y cols., 1989).

El diámetro de fin de diástole del VI (DFDVI) fue medido en el momento de máxima excursión diastólica del ventrículo; mientras que el diámetro de fin de sístole del VI (DFSVI) fue estimado en el tiempo de mayor excursión sistólica de la pared posterior del ventrículo. En las mismas imágenes, se cuantificó el espesor de la pared posterior del VI en diástole (EPPVId) y en sístole (EPPVIs) (**Figura 6**). Para evaluar la función sistólica del VI se calculó la fracción de acortamiento (FA) y la fracción de eyección (Fey) de acuerdo a las siguientes fórmulas:

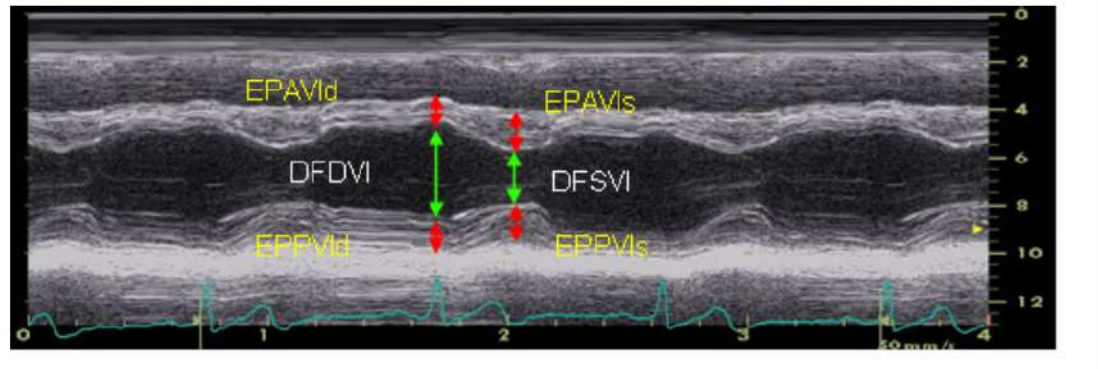
$$FA = \left( \frac{DFDVI - DFSVI}{DFDVI} \right) \times 100$$

$$Fey = \left( \frac{DFDVI^3 - DFSVI^3}{DFDVI^3} \right) \times 100$$

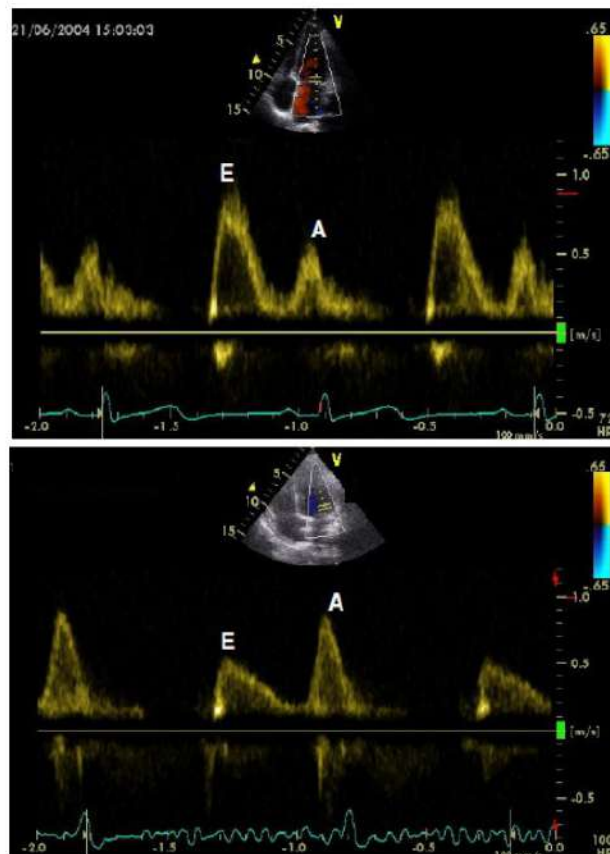
En modo bidimensional y en un corte de 4 cámaras se realizó Doppler transmitral a fin de evaluar la función diastólica del VI. Se calculó el cociente entre la

onda E (llenado temprano) y la onda A (contracción auricular) del llenado ventricular (E/A), y la duración del tiempo de relajación isovolúmica (IVRT) (Figura 7).

**Figura 6.** Imagen ecocardiográfica representativa obtenida en modo M en la que se señalan los diámetros del VI en diástole (DFDVI) y en sístole (DFSVI) (trazo verde), los espesores de pared anterior del VI en diástole (EPAVId) y en sístole (EPAVIs) (trazo rojo) y de la pared posterior de la misma cámara (EPPVId y EPPVIs).



**Figura 7.** Imagen ecocardiográfica representativa obtenida con ecodoppler, en la que se observa la determinación de las velocidades de llenado ventricular E y A. En el cuadrante superior se ejemplifica el patrón de llenado normal, mientras que en el inferior está representado el llenado anormal del VI.

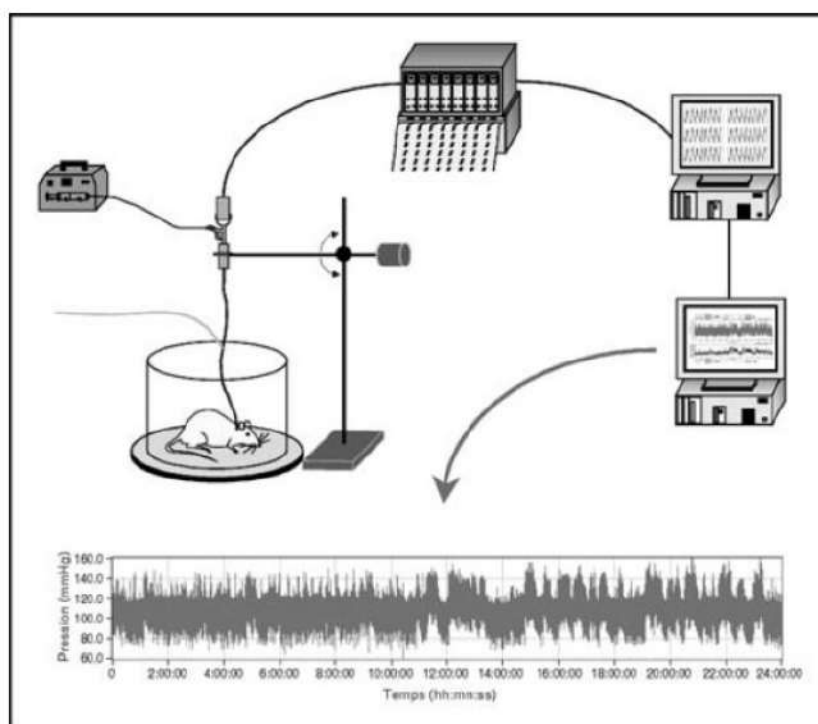


### ***Determinación directa de la presión arterial***

Cumplidos los 2 meses de tratamiento, los animales fueron anestesiados nuevamente con la mezcla ketamina 35 mg/kg y xilazina 5 mg/kg y canulados en su arteria carótida común izquierda mediante una cánula de polietileno con solución salina heparinizada (25 UI/ml). Con el objetivo de lograr medir la PA en animales en libre movimiento, la cánula se introdujo en el interior de la arteria carótida y se condujo, por debajo de la piel, hasta su salida en la base del cuello. Las determinaciones se realizaron en animales despiertos 24 horas después de la colocación de la cánula, ya que se ha establecido que un período de recuperación de 24 horas es adecuado para la evaluación de efectos de los fármacos en ratas

consientes (Pladys y cols., 2004). Al día siguiente, los animales se conectaron a un transductor de presión Spectramed P23XL (Spectramed, Oxnard, CA, EE. UU.), acoplado a un polígrafo Grass 79D (Grass Instruments, Quincy, MA, EE. UU.) y a un convertidor digital (Polyview, PVA 1, Grass- Astro Med, West Warwick, RI EE. UU.) (**Figura 8**). De esta manera, se obtuvieron registros continuos de PA durante dos horas que se analizaron con el software Polyview 2.3 (Astro-Med, West Warwick, RI, EE. UU.) estimándose la PAS central, la frecuencia cardíaca y la VPA de corto plazo en registros de presión de tres minutos a partir del cálculo del desvío estándar (DE) de la PA central y el coeficiente de variación porcentual de la PA (CV%) de acuerdo con trabajos previos de nuestro laboratorio y otros autores (Bertera y cols., 2013; Pladys y cols., 2004). Por último, se analizó la VPA latido-a-latido cardíaco a partir del análisis espectral del registro de presión arterial utilizando la transformada rápida de Fourier con una ventana de Hamming (Polyview Astro-Med, West Warwick, RI). Se calcularon las densidades espectrales en la gama de VLF (0,1-0,2 Hz), LF (0,2 a 0,7 Hz) y HF (0,7-2,5 Hz) (Pladys y cols., 2004). Si bien la variabilidad de LF se ve afectada por la modulación simpática del tono vascular, se utilizó la relación LF/HF como índice de la actividad simpática vascular y VLF/HF como marcador del tono vascular miogénico. Este procedimiento de normalización se empleó para minimizar el efecto de los cambios en los valores absolutos de la variabilidad (Pladys y cols., 2004; Souza y cols., 2008). Es importante destacar que el cociente LF/HF constituye hoy en día un marcador establecido de la actividad simpática vascular empleado tanto en estudios preclínicos como clínicos (Fazan y cols., 2008).

**Figura 8.** Imagen representativa de determinación continua de PA, VPA y FC en animales en movimiento libre.



Adaptado de Su, 2006.

Finalizada la determinación de los parámetros hemodinámicos, los animales fueron sacrificados con guillotina extrayéndose el VI y la aorta torácica para la evaluación del daño de órgano blanco. Se tomó un fragmento de 2,5 cm de longitud de aorta justo por debajo del cayado aórtico. Se extrajo el corazón, luego se aisló el VI y posteriormente se limpió con solución fisiológica. Como marcador morfológico del daño de órgano blanco a nivel cardíaco se evaluó el índice de masa del ventrículo izquierdo (IMVI) utilizando una balanza de precisión (modelo AR1140, OHAUS, New Jersey, EE. UU.) (Miao y cols., 2006) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IMVI} = \frac{\text{Peso VI (mg)}}{\text{Peso corporal (g)}}$$

La mitad inferior del VI y de la aorta torácica se fijaron en formaldehído al 10% p/v en buffer fosfato de sodio, pH 7,4 para las posteriores determinaciones

histológicas. El resto del tejido se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la realización de otros estudios de daño de órgano blanco.

### ***Análisis histopatológico***

Para la evaluación histopatológica del VI y de la aorta torácica se realizaron las tinciones con hematoxilina-eosina (H-E) y Sirius red sobre secciones transversales de tejido de  $4\mu\text{m}$  de espesor. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio (Olympus CX31, Japón) acoplado a una cámara digital (Olympus U-CMA D3, Japón). Las mediciones se realizaron a ciego y bajo las mismas condiciones de luz.

### ***Tinción con Hematoxilina-Eosina***

La hematoxilina es un colorante natural de características básicas que tiñe estructuras ácidas o basófilas, como los núcleos, de color púrpura o violeta. Contrariamente, la eosina es una tintura ácida que se une a componentes básicos presentes en el espacio intra y extracelular, los cuales adquieren una coloración rosa-anaranjada. La tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E) continúa siendo el método más ampliamente utilizado en histología e histopatología, ya que permite visualizar fácilmente la organización estructural de un tejido, su microanatomía y sus células individualizadas con sus núcleos (Torres Gómez y cols., 2011).

Luego del corte histológico del material embebido en parafina utilizando un micrótopo rotatorio (Erma LTE 610, Laboratorio Somaco), las secciones transversales del VI y de la aorta torácica fueron desparafinizadas con xileno y rehidratadas en distintos grados de alcohol etílico ( $100^{\circ}$ ,  $95^{\circ}$  y  $70^{\circ}$ , respectivamente). Primero, se colorearon los núcleos por inmersión durante 15 minutos en una solución de hematoxilina de Mayer. Luego, se retiró el exceso del colorante con agua y se diferenció la hematoxilina fijada al tejido con una solución de alcohol ácido (ácido clorhídrico al 0,5% v/v en etanol  $70^{\circ}$ ). Por último, los cortes se sumergieron durante 30 segundos en solución de trabajo de eosina (250 ml de solución madre en 750 ml de etanol  $80^{\circ}$  y 5 ml de ácido acético glacial - Solución madre de eosina: 10 gramos de Eosina Y en 200 ml de agua destilada y 800 ml de etanol  $96^{\circ}$ ) luego se lavaron rápidamente con agua y fueron deshidratados nuevamente con lavados de etanol de



70º, 95º y 100º, respectivamente. Finalmente, se limpiaron con xileno y se montaron con Bálsamo de Canadá. Los preparados teñidos con H-E se observaron bajo microscopía óptica acoplada a una cámara digital con una magnificación final de 400X para los VI y de 50X para las aortas.

Para los ventrículos, con la tinción de H-E se calculó el área ( $\mu\text{m}^2$ ) de entre 70 y 80 cardiomiocitos por corte histológico, empleando el software analizador de imágenes Image Pro-Plus 3.0. Para la cuantificación del área de cardiomiocitos se seleccionaron únicamente aquellas células de apariencia redonda o rectangular, con núcleo central y bordes claramente delimitados o que se encontraban rodeadas por un mínimo de 3 vasos sanguíneos (Lu y cols., 2016).

Para las aortas, con la tinción de H-E se calcularon los parámetros de morfometría aórtica: espesor de la túnica media ( $\mu\text{m}$ ) y espesor de la media/diámetro de la luz ( $\mu\text{m}/\text{mm}$ ). El espesor de la capa media de la arteria aorta, es decir la distancia desde la lámina elástica interna hasta la lámina elástica externa, se determinó a partir de la longitud ( $\mu\text{m}$ ) del perímetro externo ( $P_{\text{externo}}$ ) e interno ( $P_{\text{interno}}$ ) que se midieron en las secciones de arteria aorta (50X) utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE. UU.) y empleando las siguientes fórmulas (Pereira LM y cols., 2004)(Figura 9):

$$P_{\text{externo}} = \pi \times 2 r_{\text{externo}}$$

$$P_{\text{interno}} = \pi \times 2 r_{\text{interno}}$$

$$\text{Espesor de la media} = r_{\text{externo}} - r_{\text{interno}}$$

Para el cálculo de la relación del espesor de la capa media ( $\mu\text{m}$ ) con el diámetro de la luz (mm), se determinó el diámetro de la luz a partir de la siguiente ecuación (Castro MM y cols., 2008) (Figura 9):

$$\text{Diámetro de la luz aórtica: } 2 \times r_{\text{interno}}$$



deshidrataron nuevamente con lavados de etanol 70º, 96º y 100º, respectivamente y se limpiaron con xileno para luego montarse en un portaobjetos con Bálsamo de Canadá.

Los tejidos se observaron con microscopía óptica acoplada a una cámara digital con una magnificación final de 400X. Para evaluar el depósito de colágeno en el parénquima ventricular o aórtico se analizaron 10 fotos por corte de cada animal empleando el software analizador de imágenes Image Pro-Plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE. UU.) (González y cols., 2014). En la cuantificación de colágeno del VI se consideraron únicamente aquellas fibras intersticiales mientras que en la aorta torácica se determinó el contenido de fibrosis en la túnica media. Se calculó la fracción de colágeno intersticial (FCI) a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{FCI (\%)} = \frac{\text{Área de colágeno} \times 100}{\text{Área total}}$$

### ***Evaluación de daño de órgano blanco***

#### ***Preparación de las muestras de tejido de VI y aorta torácica para Western Blot***

El VI y la aorta torácica fueron homogeneizados en frío, sobre un baño de hielo, empleando un homogenizador de tejidos de alta velocidad (PRO200 Homogenizer, PRO Scientific Inc., Oxford, Connecticut, EE. UU.) en presencia de buffer para extracción de proteínas conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa (NaCl 150 mM, Trisma-HCl 50 mM, desoxicolato de sodio 1% (v/v), EGTA 1 mM, NaF 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, pervanadato de sodio 1 mM) y Cocktail inhibidor de proteasas, pH 8,0. Para la homogenización del VI se emplearon 3 ml de buffer por cada 1 mg de tejido, mientras que para las aortas se utilizaron 15  $\mu$ l de buffer por cada 1 mg. Luego de su homogenización, los tejidos se incubaron 30 min a 4°C y se centrifugaron a una velocidad de 10.000 rpm durante 10 min a 4°C para descartar fragmentos y restos celulares. Se separó el pellet del sobrenadante y sobre este último se efectuaron las medidas de expresión de proteínas.

#### ***Preparación de las muestras de tejido de VI y aorta torácica para Zimografía***

El VI y la aorta torácica fueron homogeneizados en frío, sobre un baño de hielo, empleando un homogenizador de tejidos de alta velocidad (PRO200 Homogenizer, PRO Scientific Inc., Oxford, Connecticut, EE. UU.) en presencia de buffer de lisis para zimografía conteniendo iones calcio y zinc, ya que actúan como cofactores de las metaloproteasas (Tris base 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{ZnCl}_2$  1  $\mu\text{M}$ , Tritón X-100 1%, pH 7,4). Se utilizaron los mismos volúmenes de buffer que los descritos en la preparación de los homogenatos para Western Blot. Luego de su homogenización, los tejidos se centrifugaron a una velocidad de 10.000 rpm durante 10 min a 4°C para descartar fragmentos y restos celulares. Se separó el pellet del sobrenadante y sobre este último se efectuaron las medidas de actividad gelatinolítica.

#### ***Cuantificación del contenido proteico en la totalidad de las muestras para las técnicas de Western Blot y Zimografía***

El contenido proteico de los sobrenadantes fue determinado a partir del método descrito por Lowry basado en la reacción colorimétrica de las proteínas con tartato de cobre en medio alcalino y el reactivo de Folin (Lowry y cols., 1951). La coloración azul obtenida luego de la reacción química fue cuantificada espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Metrolab 325 BD, Metrolab, Argentina) a una longitud de onda de 625 nm. Se utilizó seroalbúmina bovina como estándar proteico para calibrar el método espectrofotométrico de Lowry. Los homogenatos fueron conservados a -80°C, fraccionados en eppendorff conteniendo 100  $\mu\text{l}$  de suspensión, hasta la preparación de las muestras para Western Blot o zimografía.

#### ***Western Blot***

La técnica de Western Blot (*immunoblotting*) fue utilizada para determinar la expresión de la citoquina profibrótica factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y de los mediadores proinflamatorios interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en homogenatos de VI y de aorta torácica (Burnette, 1981). Dicha metodología constituye un sistema para la detección y caracterización de proteínas que se basa en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Primero, implica la separación electroforética por SDS-PAGE y la posterior

transferencia irreversible de las proteínas a una membrana. Los antígenos que se han transferido a la membrana son reconocidos por anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para ellos (Jensen, 2012).

Inicialmente, para la preparación de las muestras a sembrar, una alícuota del homogeneizado de VI o aorta torácica en buffer de homogenización, se resuspendió en buffer 6X (buffer Tris-base 375 mM, pH 6,8 conteniendo SDS 12% (p/v), glicerol 50% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 15% (v/v) y azul de bromofenol 0,06% (p/v)) en una relación muestra/ buffer 6X de 6/1. Luego, las muestras se incubaron durante 5 min en baño maría a 100°C y se mantuvieron a -20°C hasta el momento de las determinaciones.

Alícuotas de muestras conteniendo una masa de 50  $\mu$ g de proteína se separaron por electroforesis (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) en geles de poliacrilamida 12% (p/v) en condiciones desnaturalizantes. Se corrieron simultáneamente estándares de peso molecular Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham, GE Healthcare Life Science, Suecia). Luego de la electroforesis, las proteínas se electrotransferieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) 0,45  $\mu$ m utilizando una solución compuesta por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v) en el sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) en condiciones de voltaje constante (110 V) durante 90 min y sobre un baño de hielo. Finalizada la transferencia, el procedimiento se corroboró incubando las membranas durante 30 minutos con una solución de rojo de Ponceau al 0,4 % (p/v) en ácido acético glacial al 1% (v/v) para visualizar las calles y las proteínas electrotransferidas. Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora en una solución conteniendo leche descremada 3% (p/v) en buffer fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, por sus siglas en inglés;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,76 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 Mm, pH 7,4) para impedir la unión inespecífica de los anticuerpos a otras proteínas. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en buffer PBS: ratón anti-TGF $\beta_1$  (PM=13 kDa), cabra anti-TNF $\alpha$  (PM= 17 kDa), cabra anti-IL6 (PM= 21 kDa), conejo anti-GAPDH (PM=37 kDa) y conejo anti-Tubulina (PM=52 kDa). A continuación, se realizaron 3 ciclos de lavado de las membranas, de 5 minutos cada uno con PBS conteniendo Tween 20 al 0,1% (v/v) y las mismas se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente y bajo agitación constante, con anticuerpo secundario de cabra



anti IgG de conejo, burro anti IgG de cabra o cabra anti IgG de ratón, todos ellos conjugados con peroxidasa de rábano picante y en una dilución 1/5000 en PBS. Las bandas se revelaron empleando el sistema de detección quimioluminiscente ECL-plus (Amersham, GE Healthcare Life Science, Suecia) utilizando placas fotográficas (Kodak, Rochester, Nueva York, EE. UU.).

Por último, las placas de revelado se escanearon y el análisis densitométrico se llevó a cabo utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE. UU.). La cantidad de proteína sembrada se normalizó por el contenido de GAPDH o  $\beta$ -tubulina. Los resultados finales se expresaron en unidades densitométricas arbitrarias relativas a los animales control (Wistar para el grupo hipertenso por la administración de L-NAME y WKY para las ratas SHR).

### **Zimografía**

Se utilizó la técnica zimográfica para evaluar la actividad de las enzimas metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9. La zimografía en gel es un método en el cual las enzimas proteolíticas, presentes en una determinada muestra, son separadas en base a su peso molecular y luego detectadas por su capacidad de digerir un sustrato específico (Vandooren y cols., 2013). La técnica consiste en la copolimerización del sustrato de las metaloproteasas, en este caso gelatina, con la acrilamida en un gel de SDS-PAGE. En la separación, durante la electroforesis, las metaloproteasas se desnaturalizan, pero finalizada la misma, el gel se incuba con un buffer en presencia de cofactores esenciales que le permiten a las enzimas plegarse nuevamente y así degradar al sustrato. Las zonas proteolíticas del zimograma se vuelven visibles luego de su tinción con el colorante Coomassie Blue. La zimografía en gel permite la detección en simultáneo de formas activas y latentes de las gelatinasas (Ricci y cols., 2016).

Para preparar las muestras a sembrar, una alícuota del homogeneizado de VI o aorta torácica en buffer de homogenización, se resuspendió en buffer 5X (Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, conteniendo SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,06% (p/v)).

Alícuotas de homogenatos conteniendo una masa de 50  $\mu$ g de proteína se separaron por electroforesis (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) en gel de poli(acrilamida 7,5% (p/v) copolimerizado con gelatina porcina 1% en



condiciones desnaturalizantes y empleando como medio acuoso buffer Tris-Glicina-SDS, pH 8,3, a una temperatura de 4°C. Se corrieron simultáneamente estándares de peso molecular Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Biorad, Hercules, California, EE. UU.). Luego de la corrida electroforética, con el objetivo de eliminar el SDS, los geles se limpiaron con buffer de lavado conteniendo Tris-HCl 50mM y Tritón X-100 2,5% (v/v), pH 7,5; 3 veces durante 20 minutos y luego con buffer Tris-HCl 50mM pH 7,4; 3 veces durante 10 minutos. Los geles se incubaron a una temperatura fija de 37°C empleando un baño termostático con agitación (modelo Dubnoff, Vicking S.R.L, Argentina) durante 18 horas en presencia de buffer de incubación (Tris-HCl 50mM, NaCl 0,15M y  $\text{CaCl}_2$  10mM -como cofactor enzimático-, pH 7,4). Finalmente, el revelado del zimograma se realizó a partir de la tinción de los geles con el colorante azul de Coomssie R250 (0,5% (p/v) en solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético glacial 10% (v/v) en agua bidestilada) y posterior decoloración con solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético glacial 10% (v/v) en agua bidestilada. Esta técnica de revelado expone zonas claras donde el sustrato ha sido degradado sobre un fondo de color azul. La presencia de Pro-MMP2, MMP-2 y MMP-9 se determinó por comparación de las bandas gelatinolíticas con el marcador comercial de peso molecular.

Por último, se escanearon los geles y el análisis densitométrico se llevó a cabo utilizando el programa ScionImage (Scion Corp, Frederick, Maryland, EE. UU.). Se cuantificó el área gelatinolítica y la intensidad de las bandas, expresándose en unidades densitométricas arbitrarias relativas a un estándar interno (MMP de promielocito U-937), corrido en cada gel, al que se le asignó el valor de 1. Se corroboró que las bandas gelatinolíticas seleccionadas resultaron específicas porque desaparecieron en presencia de EDTA 0,01 M (quelante del  $\text{Ca}^{2+}$ ) en el buffer de incubación. Los resultados finales se expresaron en unidades arbitrarias en función de los animales control, correspondiente a los animales Wistar para el grupo hipertenso por la administración de L-NAME y WKY para las SHR.

### ***Análisis estadístico***

La distribución normal de los datos y las variables del estudio se comprobaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se calcularon la media y la desviación

estándar de cada variable para cada grupo de animales y los datos se expresaron como la media  $\pm$  EEM (error estándar de la media).

La comparación estadística entre los diferentes grupos de tratamiento fue realizada mediante el test estadístico ANOVA de una vía y la aplicación del método de Tukey como test a posteriori.

Con el objetivo de estudiar la correlación existente entre datos de PA, VPA y daño de órgano blanco se empleó el coeficiente de correlación de Pearson, el cual constituye una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas y continuas.

En ambos casos, para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.). Se consideró estadísticamente significativa una diferencia de  $p < 0,05$ .

### ***Consideraciones éticas***

Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los "Principios de cuidado de los animales de laboratorio" (publicación de NIH No. 85-3, Revisión de 1985) y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (EXP-UBA N°0062949/2015).

## RESULTADOS

### RESULTADOS EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

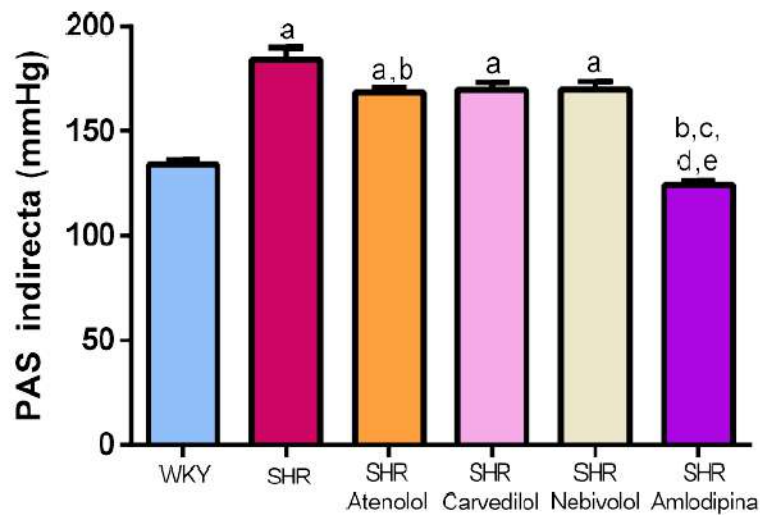
#### *Evaluación de los efectos hemodinámicos indirectos del tratamiento con $\beta$ -bloqueantes o amlodipina*

El análisis de la PAS indirecta por el método de *tail-cuff* estableció que, aunque el tratamiento con atenolol o amlodipina disminuye de manera significativa el incremento de la PAS de los animales SHR, solo el bloqueante cálcico logró equiparar su valor hasta el nivel del grupo WKY normotenso. Si bien tanto nebivolol como carvedilol redujeron la PAS, su efecto no alcanzó la relevancia estadística.

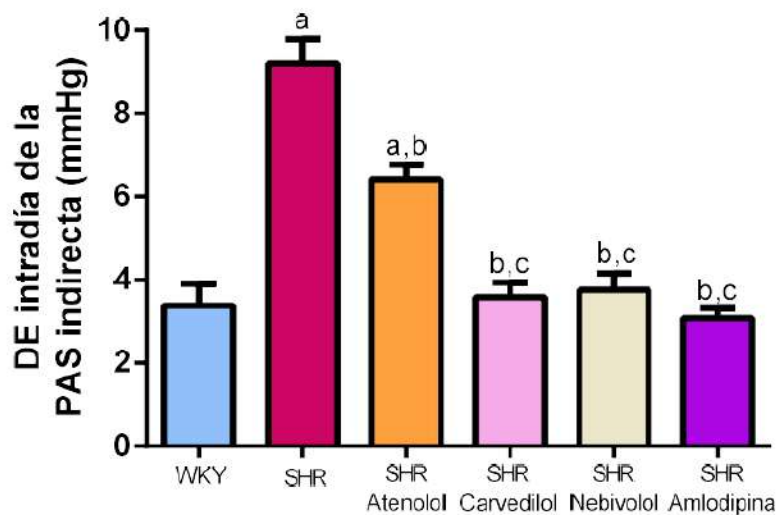
Los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina resultaron igualmente eficaces para reducir el DE intradía de la PAS, un parámetro relacionado con la VPA de corto plazo (**Figura 10**). Al estimar la VPA de mediano plazo, a partir del cálculo de DE entredía de la PAS, se observó que las ratas SHR presentan un incremento en dicho parámetro. El nebivolol y la amlodipina disminuyeron el DE entredía de la PAS indirecta mientras que el carvedilol, aunque mostró cierta tendencia en su reducción, su efecto no alcanza la significancia estadística. El atenolol, en cambio, empeoró la estimación de la VPA a mediano plazo.

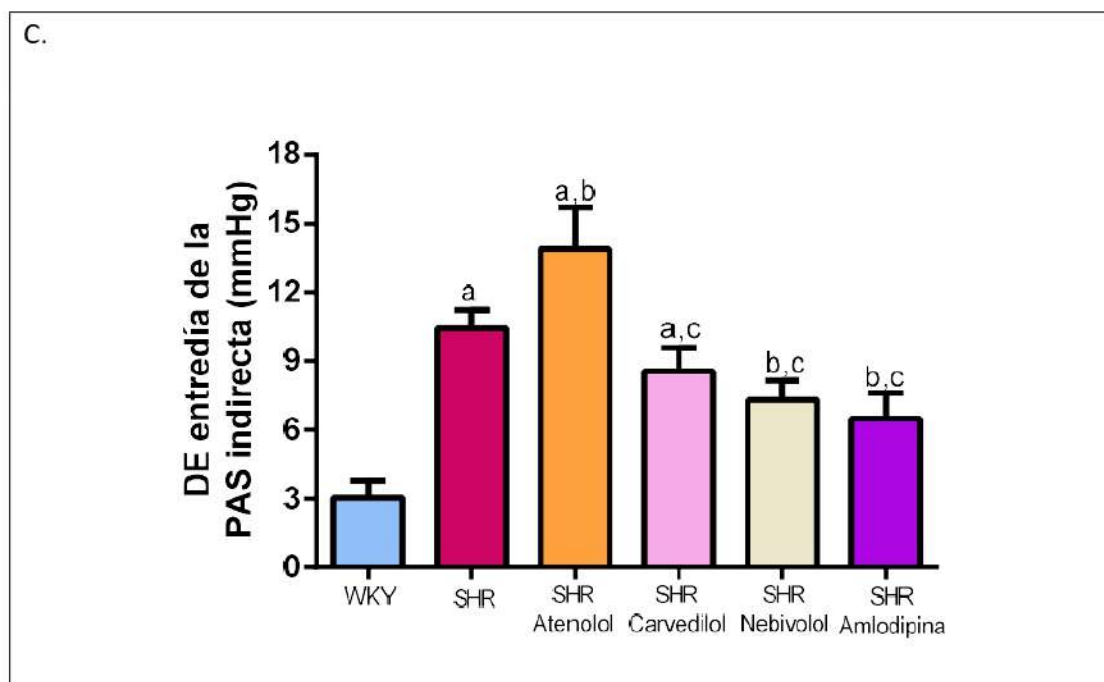
**Figura 10.** Presión arterial sistólica indirecta (periférica) (A), DE intradía de la presión arterial sistólica indirecta (B) y DE entredía de la presión arterial sistólica indirecta (C) de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, carvedilol, nebivolol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. WKY; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol; <sup>d</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Carvedilol; <sup>e</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Nebivolol.

A.



B.



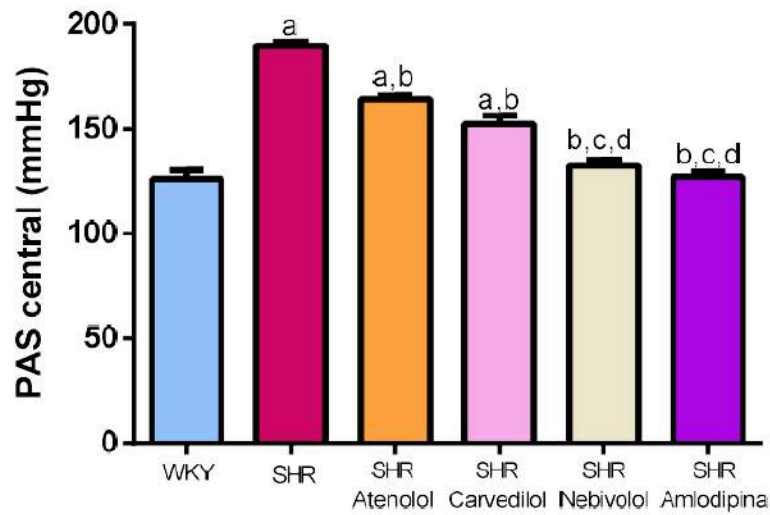


### ***Evaluación de los efectos hemodinámicos directos del tratamiento con $\beta$ -bloqueantes o amlodipina***

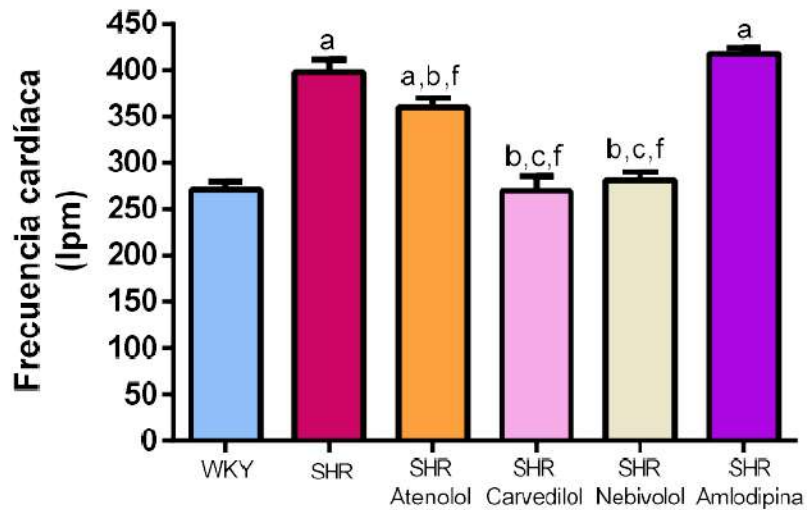
En la evaluación de la PAS directa, a nivel carotídeo, se determinó que los animales SHR presentaron un aumento de la PAS y de la FC. Aunque el atenolol y el carvedilol redujeron significativamente la PAS central, solamente con la administración del  $\beta$ -bloqueante nebivolol o el bloqueante cálcico amlodipina se logró restablecer los valores hasta alcanzar el nivel de presión de los animales WKY normotensos. Si bien el atenolol disminuyó la frecuencia cardíaca, el nebivolol y el carvedilol mostraron un efecto más pronunciado, mientras que la amlodipina no evidenció respuesta (**Figura 11**).

**Figura 11.** Presión arterial sistólica directa (central) (A) y frecuencia cardíaca (B) de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, carvedilol, nebivolol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. WKY; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol; <sup>d</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Carvedilol.

A.



B.



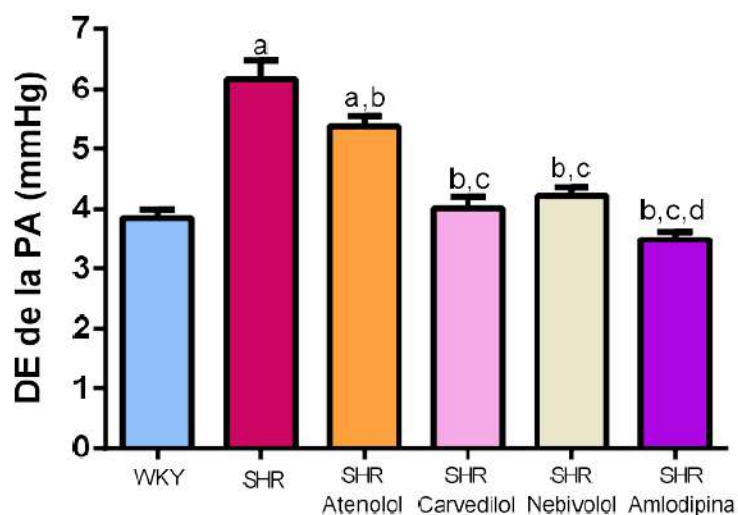
Con respecto al análisis de VPA de corto plazo, se observó que, aunque el atenolol redujo el DE y el CV% de la PA central, su respuesta fue ampliamente



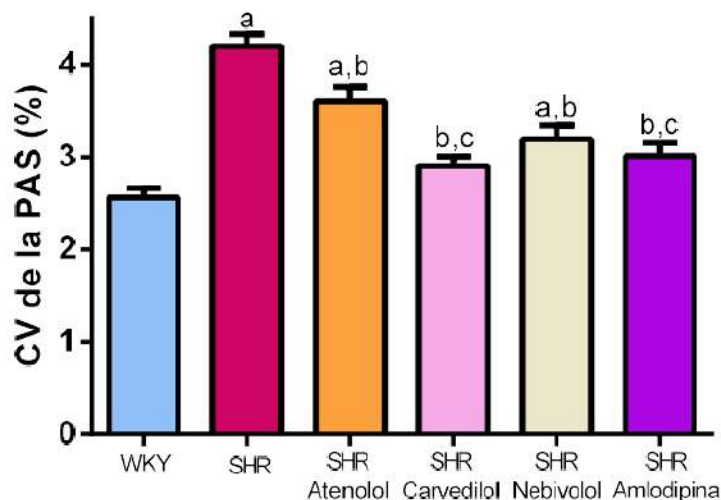
superada por los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina. El nebivolol mostró una acción mayor que el atenolol en el cálculo del CV%, pero dicha diferencia no llega a ser estadísticamente significativa. La respuesta de los fármacos sobre la VPA de corto plazo difiere de su efecto sobre la PA, indicando que ambos parámetros resultan acciones hemodinámicas independientes. En este caso, aunque en la determinación directa de la PAS el carvedilol presentó un efecto antihipertensivo similar al atenolol y menor que el nebivolol y la amlodipina, demostró una reducción del DE equiparable al nebivolol y la amlodipina (**Figura 12**).

**Figura 12.** DE de la presión arterial directa (A) y CV% de la presión arterial directa (B) de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, carvedilol, nebivolol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup>p<0,05 vs. WKY; <sup>b</sup>p<0,05 vs. SHR; <sup>c</sup>p<0,05 vs. SHR Atenolol; <sup>d</sup>p<0,05 vs. SHR Carvedilol.

A.



B.

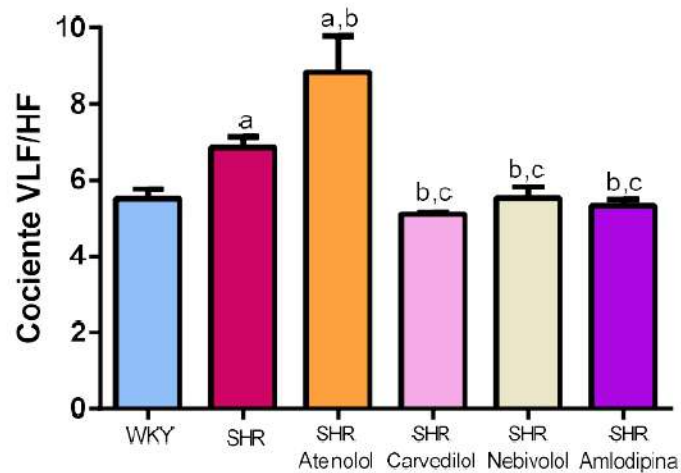


La evaluación de la VPA latido-a-latido cardíaco a partir del análisis espectral del registro de PA estableció que los animales SHR manifiestan una elevación del tono vascular miogénico, a partir del aumento del cociente VLF/HF, y de la actividad

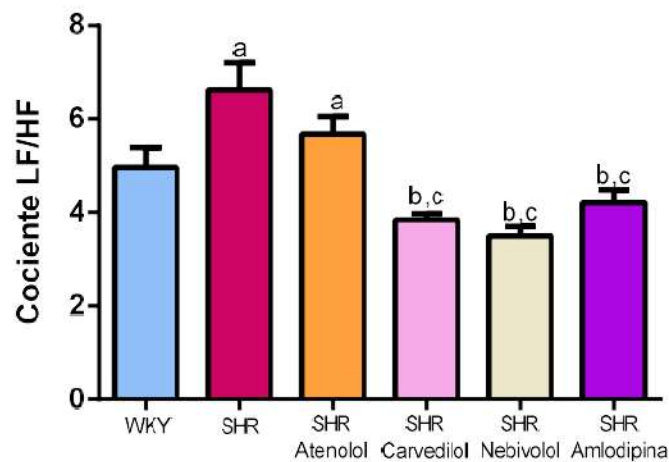
simpática vascular, a partir del incremento en la relación LF/HF. Aunque el tratamiento crónico con atenolol no presentó efecto sobre el índice LF/HF, elevó la razón VLF/HF. Contrariamente a estos resultados, la administración sostenida de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación o la amlodipina normalizó el tono vascular miogénico y la actividad simpática vascular (**Figura 13**).

**Figura 13.** Cociente VLF/HF (A) y cociente LF/HF (B) de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, carvedilol, nebivolol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. WKY; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol.

A.



B.



### ***Comparación de los efectos hemodinámicos directos e indirectos del tratamiento con $\beta$ -bloqueantes o amlodipina***

El efecto antihipertensivo de los agentes empleados difiere si la evaluación del nivel de PAS se realiza a nivel central o periférico. En este sentido, aunque el carvedilol y el nebivolol no redujeron la PAS periférica sí presentaron acción antihipertensiva central. La mayor atenuación de la VPA de corto plazo evidenciada de manera indirecta por el nebivolol y el carvedilol respecto del atenolol fue confirmada en el análisis directo de PA. Si bien el atenolol redujo levemente el DE de la PA central, los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico mostraron un efecto superior.

### ***Evaluación morfométrica y de funcionalidad ventricular cardíaca por ecocardiografía***

Los hallazgos ecocardiográficos revelaron que los animales hipertensos presentan un aumento en el espesor de la pared anterior y posterior del VI, tanto en la sístole como en la diástole, respecto de las ratas normotensas, además de una prolongación del tiempo de relajación isovolumétrica y una reducción de la fracción de acortamiento ( $p < 0,05$ ). De estos resultados se deduce que este modelo de hipertensión esencial presenta hipertrofia del VI y alteración de la función sistólica y diastólica cardíaca.

Aunque el atenolol no mostró efecto sobre el espesor de la pared ventricular izquierda, los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina normalizaron el espesor de la pared anterior en la diástole y el espesor de la pared posterior en la sístole, pero sólo el carvedilol y el nebivolol redujeron el espesor de la pared posterior en la diástole. El carvedilol además revirtió el espesor de la pared anterior en la sístole, siendo el único fármaco estudiado que restituyó completamente la pared del VI.

La administración crónica de  $\beta$ -bloqueantes o amlodipina no indujo cambios en la fracción de acortamiento o de eyección, indicadores de la función sistólica del miocardio. Se observó una disminución del cociente de velocidades E/A en los animales SHR. Aunque esta alteración no llega a ser estadísticamente significativa ni a invertirse completamente la relación de las velocidades, podría ser un indicador de la

existencia de cierta alteración en el patrón de llenado normal del ventrículo durante la fase diastólica. El atenolol, el nebivolol y la amlodipina elevaron la relación de las velocidades E/A de los animales hipertensos. No se observaron cambios en el diámetro de fin de diástole y sístole. Por último, todos los fármacos antihipertensivos evaluados mejoraron sustancialmente el tiempo de relajación isovolumétrica (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Parámetros ecocardiográficos de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM.

Parámetro ecocardiográfico	WKY (n=6)	SHR (n=6)	SHR Atenolol (n=6)	SHR Carvedilol (n=6)	SHR Nebivolol (n=6)	SHR Amlodipina (n=6)
Espesor de la pared anterior en diástole (mm)	1,44 $\pm$ 0,12	2,28 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,93 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,58 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	1,80 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	1,80 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
Espesor de la pared anterior en sístole (mm)	2,31 $\pm$ 0,06	2,83 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	2,83 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	2,05 $\pm$ 0,08 <sup>b,c,e,f</sup>	2,80 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	2,58 $\pm$ 0,05
Espesor de la pared posterior en diástole (mm)	1,31 $\pm$ 0,08	2,10 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	2,20 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,55 $\pm$ 0,10 <sup>b,c,f</sup>	1,80 $\pm$ 0,05 <sup>b,c</sup>	1,98 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
Espesor de la pared posterior en sístole (mm)	2,27 $\pm$ 0,13	2,70 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	2,87 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	2,08 $\pm$ 0,13 <sup>b,c,e</sup>	2,53 $\pm$ 0,01 <sup>b,c</sup>	2,35 $\pm$ 0,03 <sup>b,c</sup>
Tiempo de relajación isovolumétrica (mseg)	25,3 $\pm$ 2,4	39,5 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	29,0 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	28,3 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	27,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	23,7 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>
Diámetro de fin de diástole (mm)	6,95 $\pm$ 0,16	6,53 $\pm$ 0,15	6,77 $\pm$ 0,15	6,73 $\pm$ 0,40	7,40 $\pm$ 0,10	7,60 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>
Diámetro de fin de sístole (mm)	4,14 $\pm$ 0,12	4,05 $\pm$ 0,16	4,07 $\pm$ 0,01	4,53 $\pm$ 0,32	4,60 $\pm$ 0,20	4,80 $\pm$ 0,25
Fracción de Eyección (%)	78,6 $\pm$ 1,5	74,4 $\pm$ 3,2	76,1 $\pm$ 3,4	67,4 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	75,3 $\pm$ 2,3	74,8 $\pm$ 1,5
Fracción de Acortamiento (%)	40,4 $\pm$ 1,4	35,0 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	41,7 $\pm$ 4,3	34,6 $\pm$ 1,0	37,5 $\pm$ 2,0	36,9 $\pm$ 1,3
Relación de velocidades E/A	2,10 $\pm$ 0,09	1,85 $\pm$ 0,07	2,44 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	1,89 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	2,95 $\pm$ 0,12 <sup>a,b,c,d</sup>	2,50 $\pm$ 0,17 <sup>b,d</sup>

<sup>a</sup>p<0,05 vs. WKY; <sup>b</sup>p<0,05 vs. SHR; <sup>c</sup>p<0,05 vs. SHR Atenolol; <sup>d</sup>p<0,05 vs. SHR Carvedilol; <sup>e</sup>p<0,05 vs. SHR Nebivolol; <sup>f</sup>p<0,05 vs. SHR amlodipina.



**Efecto sobre la hipertrofia y fibrosis ventricular izquierda**

Finalizada la evaluación de la totalidad de los parámetros hemodinámicos, los animales fueron sacrificados y se determinó el peso corporal, el peso del VI y el índice de masa ventricular izquierda.

La evaluación macroscópica de la hipertrofia ventricular mostró la misma tendencia que los resultados del análisis ecocardiográfico ya que los animales hipertensos presentaron un aumento en el peso del VI y, por ende, del IMVI. Sin embargo, en este caso el tratamiento crónico con atenolol o amlodipina no evidenció efecto. Los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores mostraron una reducción significativa del peso del VI y de su índice de hipertrofia en comparación a ratas SHR tratadas con vehículo, atenolol o amlodipina. No obstante, no alcanzaron a normalizar completamente dicho parámetro de evaluación macroscópica. Aunque el carvedilol fue la única droga que atenuó la totalidad de los espesores ventriculares, determinados ecocardiográficamente, ambos  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación lograron la mayor reducción del IMVI. Por último, no se observaron cambios en el peso de los animales debido al tratamiento antihipertensivo (Tabla 7).

**Tabla 7.** Peso del ventrículo izquierdo, peso del animal y su relación en ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM.

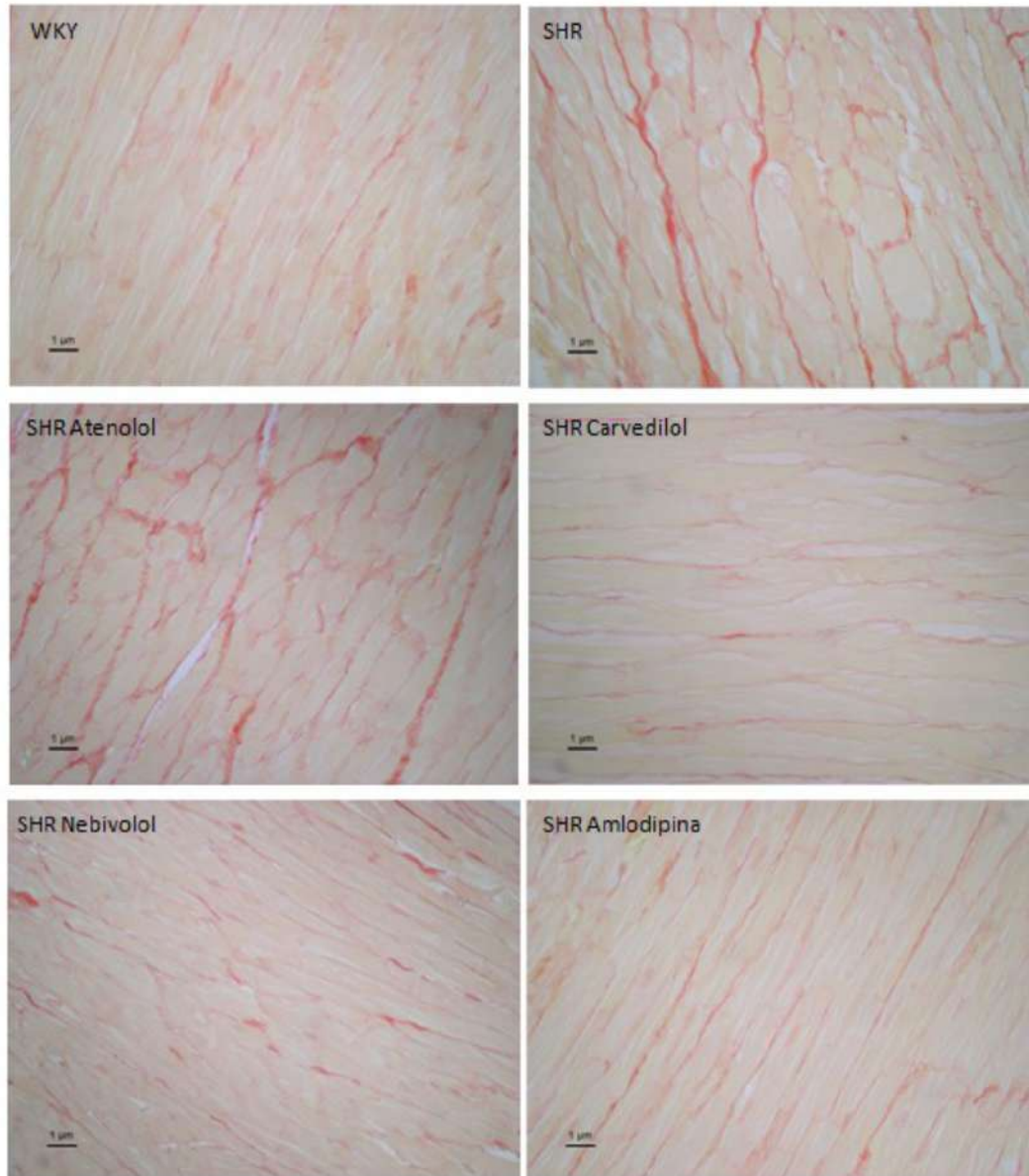
Parámetro	WKY (n=6)	SHR (n=6)	SHR Atenolol (n=6)	SHR Carvedilol (n=6)	SHR Nebivolol (n=6)	SHR Amlodipina (n=6)
Peso del ventrículo izquierdo (mg)	670,1 $\pm$ 10,2	1056,3 $\pm$ 28,6 <sup>a</sup>	1089,6 $\pm$ 22,3 <sup>a</sup>	875,2 $\pm$ 35,0 <sup>a,b,c,f</sup>	916,53 $\pm$ 9,4 <sup>a,b,c,f</sup>	1059,8 $\pm$ 9,3 <sup>a</sup>
Peso del animal (g)	300 $\pm$ 12	305 $\pm$ 14	309 $\pm$ 5	300 $\pm$ 12	308 $\pm$ 4	320 $\pm$ 10
Índice de masa ventricular izquierda (mg/g)	2,19 $\pm$ 0,10	3,51 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	3,52 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	2,95 $\pm$ 0,08 <sup>a,b,c</sup>	2,98 $\pm$ 0,06 <sup>a,b,c</sup>	3,31 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p<0,05 vs. WKY; <sup>b</sup>p<0,05 vs. SHR; <sup>c</sup>p<0,05 vs. SHR Atenolol; <sup>f</sup>p<0,05 vs. SHR Amlodipina.

Para completar el estudio de la hipertrofia ventricular izquierda evaluada macroscópicamente y por ecocardiografía, se determinó el efecto de los tratamientos a nivel microscopio, sobre la morfología de los cardiomiocitos y la matriz extracelular, más específicamente sobre el contenido de colágeno intersticial.

La evaluación histopatológica de la fibrosis ventricular a partir de la tinción con sirius red estableció la existencia de un incremento en el depósito de colágeno de los animales con hipertensión genética en relación a los normotensos. En las imágenes representativas de la figura 14 puede observarse que el grupo SHR presentan un aumento tanto en el número de fibras como en su grosor en comparación de los animales WKY. El tratamiento crónico con atenolol induce una reducción en el número de fibras, pero en las fotografías del tratamiento con carvedilol, nebivolol o amlodipina se visualiza que el colágeno fibrilar aparece más afinado al igual que en las ratas WKY.

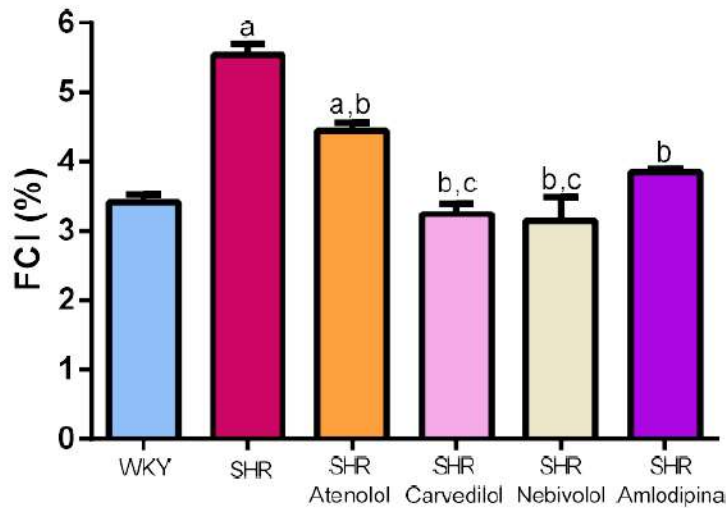
**Figura 14.** Imágenes representativas de los ventrículos izquierdos teñidos con sirius red de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Las fotografías se muestran con una escala final de 400X. Barra de escala: 1  $\mu$ m.



El análisis cuantitativo estableció un incremento de 62% de la FCI en los ventrículos izquierdos de los animales con hipertensión genética. Si bien el atenolol redujo el contenido de colágeno intersticial, el nebivolol, el carvedilol y la amlodipina revirtieron completamente esta alteración de la estructura histológica cardíaca. Más aún, el efecto de los  $\beta$ -bloqueantes

de tercera generación resultó significativamente superior al  $\beta$ -bloqueante de segunda generación atenolol (Figura 15).

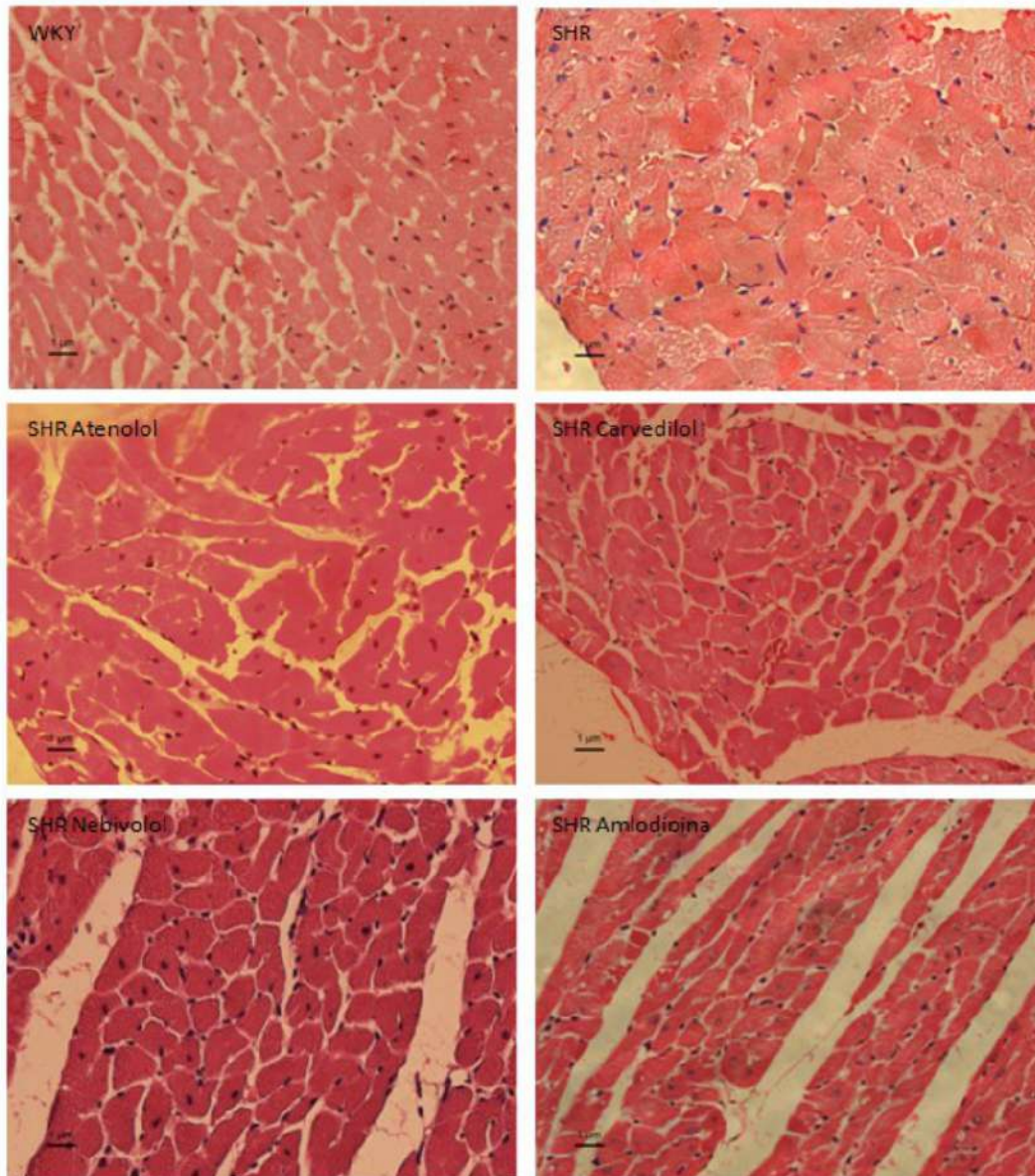
**Figura 15.** Fibrosis ventricular izquierda de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. FCI: fracción de colágeno intersticial. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. WKY; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol.



Con el objetivo de determinar el grado de hipertrofia de los cardiomiocitos se realizó la tinción con H-E de las secciones transversales de VI. En la figura 16 se muestran las imágenes representativas de los cortes histológicos de VI en donde se visualiza que los animales SHR presentan un aumento en el área de los cardiomiocitos en relación a los animales control normotensos, en donde las células cardíacas aparecen más pequeñas. Prácticamente no se observan cambios en el tamaño celular en la fotografía de los animales SHR tratados con atenolol mientras que se evidencia cierta reducción en el área luego de la terapia crónica con carvedilol, nebivolol o amlodipina (Figura 16).



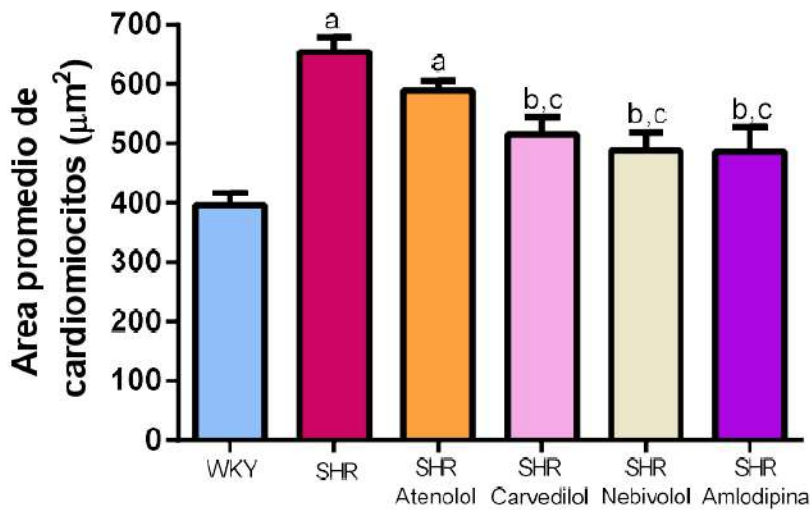
**Figura 16.** Imágenes representativas de los ventrículos izquierdos teñidos con H-E de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Las fotografías se muestran con una escala final de 400X. Barra de escala: 1  $\mu$ m.



El análisis de las fotografías establece que la hipertensión genética induce una duplicación en el área de los cardiomiocitos (WKY: 350,5 vs. SHR: 653,4;  $p < 0,05$ ) indicando que los mismos se encuentran marcadamente hipertrofiados. Aunque la administración de atenolol mostró cierta tendencia en reducir el área de las células cardíacas, su valor no alcanza la diferencia estadística respecto de los animales hipertensos. El tratamiento a largo plazo con los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores o amlodipina redujo significativamente el área

de los cardiomiocitos, logrando una disminución de tamaño de aproximadamente 25% en relación a las ratas SHR (Figura 17).

**Figura 17.** Área promedio de cardiomiocitos de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. WKY; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol.



El análisis microscópico de la morfología del VI concuerda con los hallazgos obtenidos a nivel macroscópico. En las ratas SHR, el aumento del IMVI y el espesor de las paredes del VI determinado ecocardiográficamente coincide con el aumento en el área promedio de cardiomiocitos y la mayor fibrosis. Aunque el tratamiento crónico con atenolol no indujo cambios a nivel macroscópico, se observaron pequeñas modificaciones en la microestructura ventricular tanto en el grado de hipertrofia de cardiomiocitos como en el contenido de colágeno intersticial. Para el caso de la amlodipina, la reducción en el área de las células cardíacas y la fibrosis se vio acompañada por la disminución en el espesor de la pared anterior durante la diástole y la pared posterior en la sístole determinadas ecocardiográficamente pero no modificó el peso neto del VI. Contrariamente, los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación normalizaron tanto los parámetros microscópicos como macroscópicos de la estructura ventricular cardíaca.

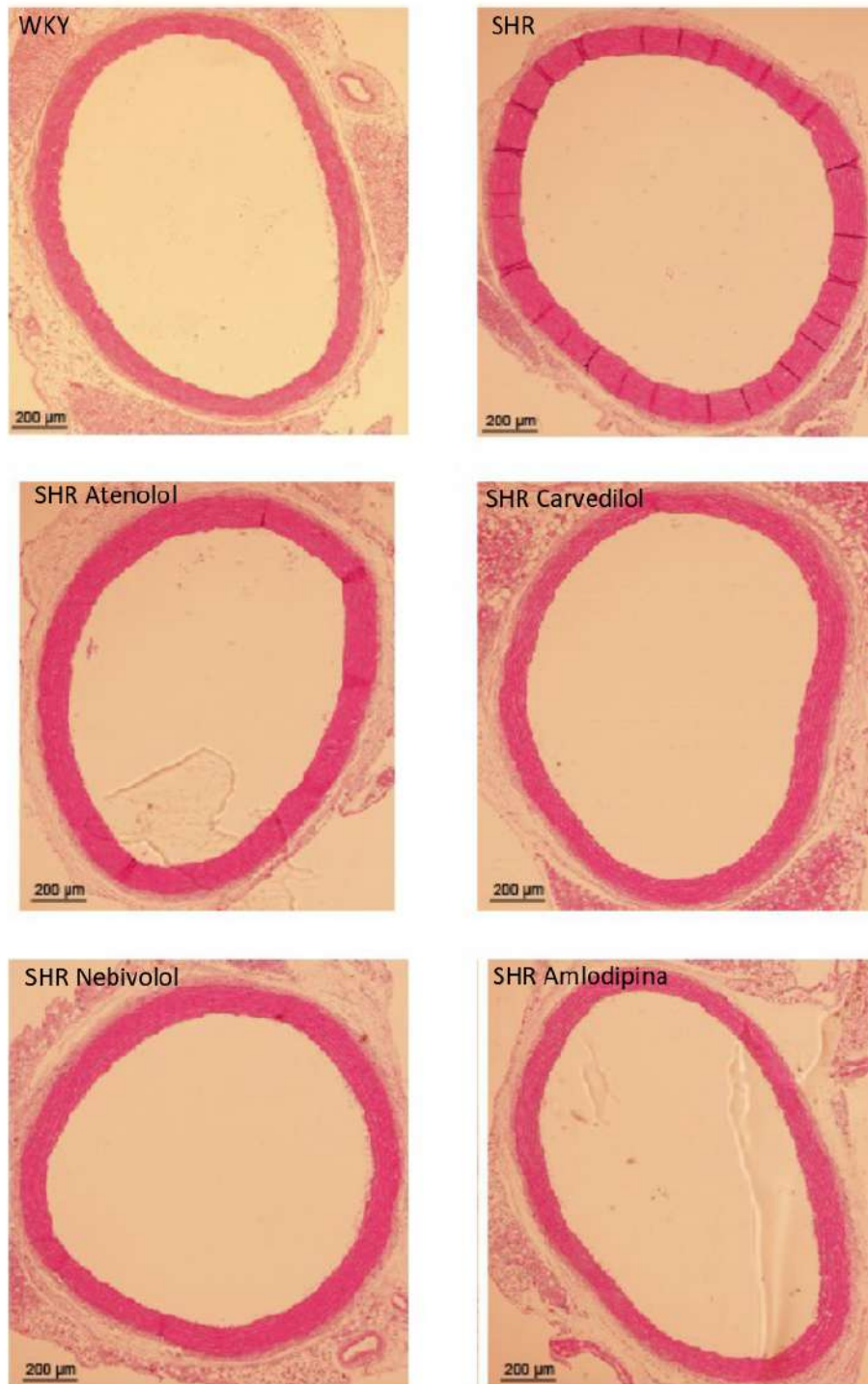
### **Evaluación de la morfología aórtica**



Con el objetivo de evaluar si la administración crónica de  $\beta$ -bloqueantes o amlodipina induce cambios en la morfología de la arteria aorta de las ratas hipertensas, se determinó el espesor de la capa media, su relación con el diámetro de la luz del vaso y el grado de fibrosis.

En la figura 18 se muestran las imágenes representativas de los cortes histológicos de aorta teñidos con H-E en donde el núcleo se colorea en tonos violetas y el citoplasma de las células aparece de color rosado. Esta tinción permite diferenciar fácilmente la membrana elástica interna (primera línea de color oscuro por debajo del subendotelio) y la membrana elástica externa (última línea de mayor intensidad previo al comienzo de la adventicia) que delimitan la capa muscular media. Los animales con hipertensión genética presentaron un aumento en el espesor de la túnica media en relación a los animales control normotensos. En los grupos SHR carvedilol, nebivolol y amlodipina se observa un afinamiento de la capa muscular, que muestra un grosor similar a las ratas WKY tratadas con vehículo.

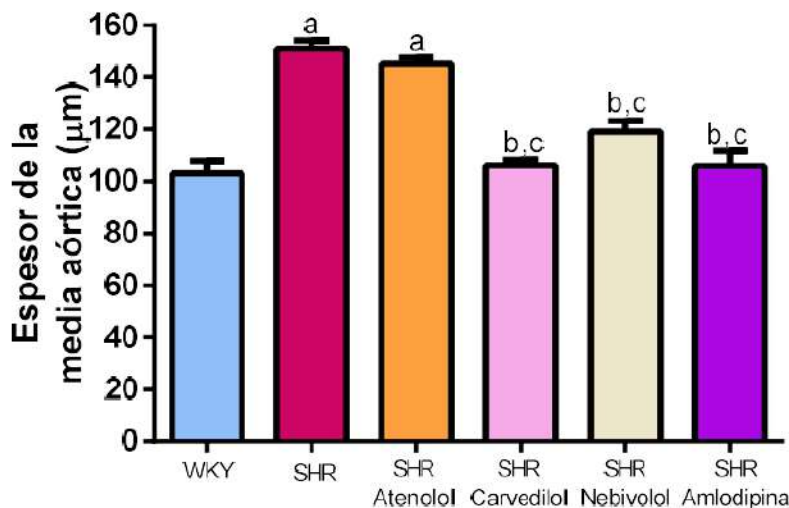
**Figura 18.** Imágenes representativas de los anillos aórticos teñidos con H-E de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Las fotografías se muestran con una escala final de 50X. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

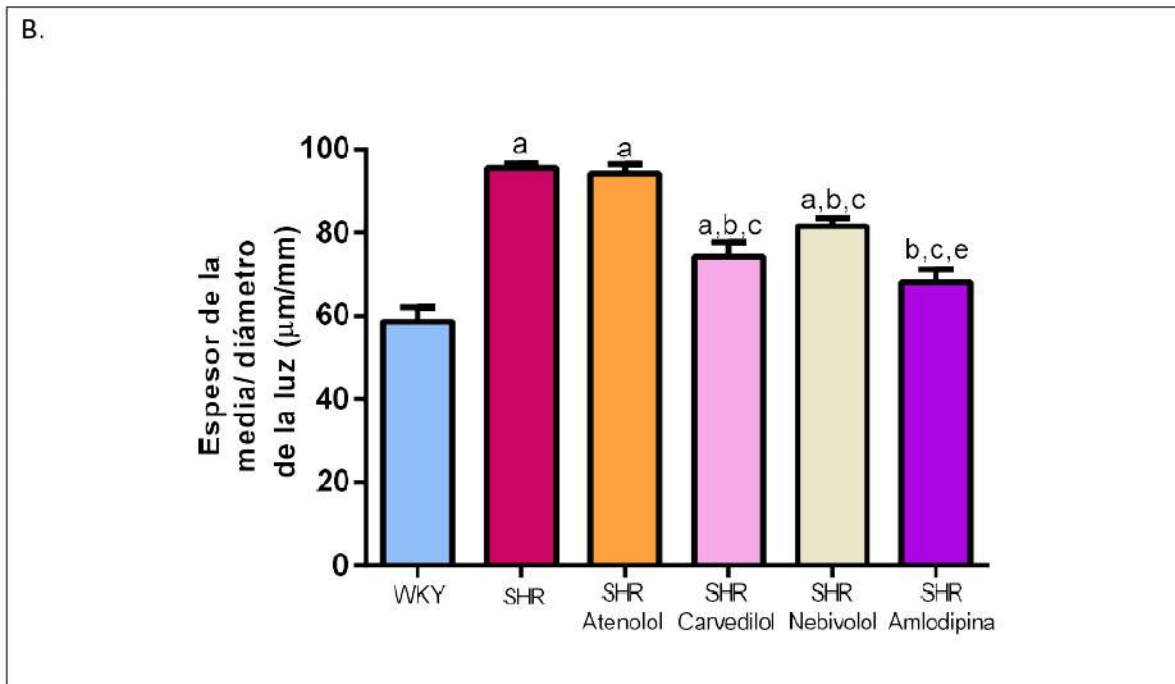


El análisis cuantitativo de los cortes histológicos estableció que la hipertensión genética de los animales SHR aumentó 50% el grosor de la capa media aórtica y elevó la relación existente entre el espesor de la media y el diámetro de la luz ( $p < 0,05$ ). Tanto los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación como el bloqueante cálcico normalizaron el espesor de la media aórtica y la relación espesor de la media/diámetro de la luz. Sin embargo, en este último parámetro, el análisis de los datos indica que la amlodipina resultó estadísticamente superior al nebivolol pero no al carvedilol para reducirlo. El atenolol no evidenció efecto sobre los parámetros morfométricos aórticos (**Figura 19**).

**Figura 19.** Espesor de la media aórtica (A) y relación espesor de la media aórtica/diámetro de la luz (B) de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. WKY; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol; <sup>e</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Nebivolol.

A.

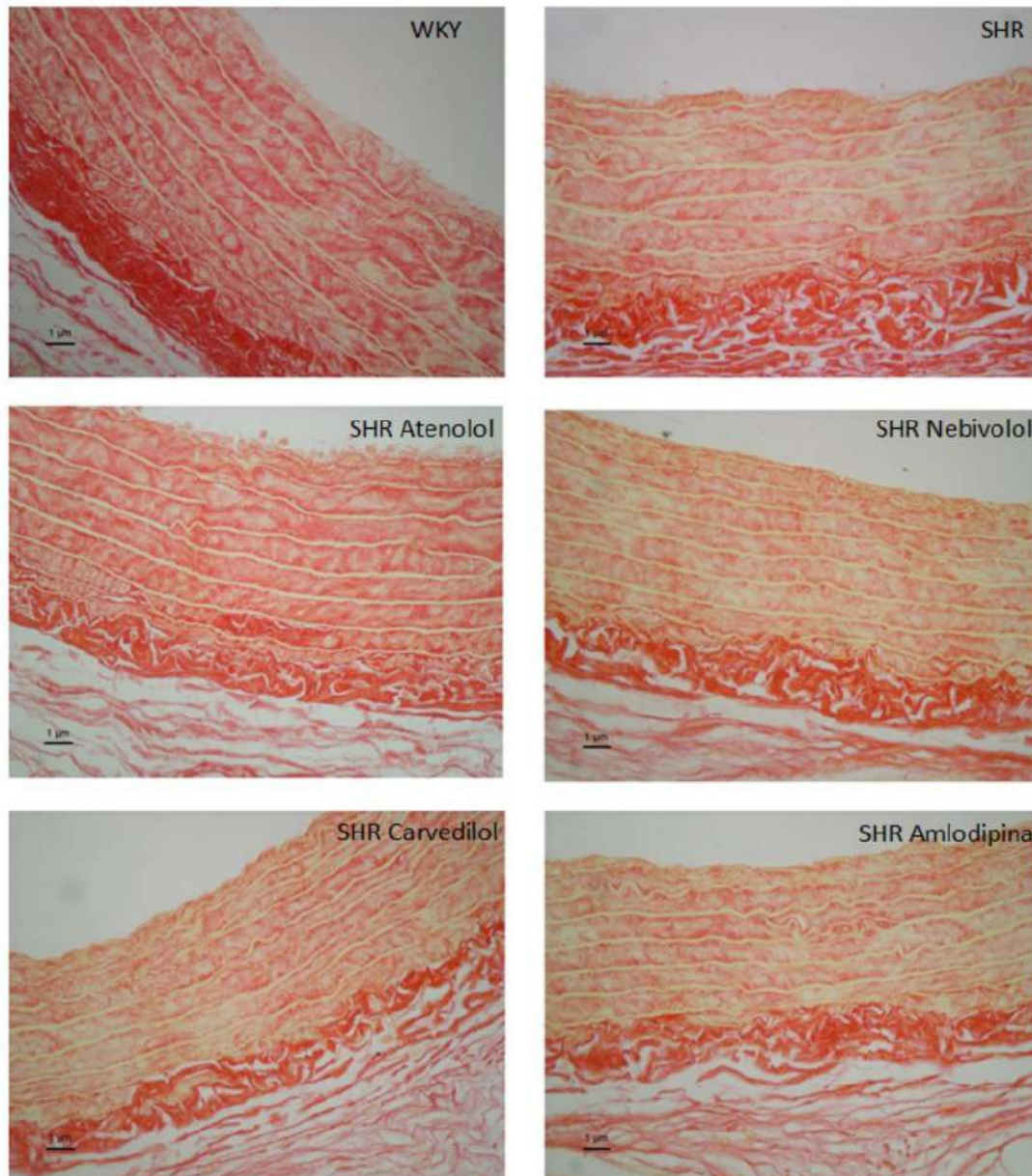




El análisis histopatológico de la fibrosis aórtica establece que los animales con hipertensión genética presentan un aumento en el número de fibras de colágeno a comparación de los animales normotensos. Aunque el tratamiento crónico con atenolol induce una leve disminución en el número de fibras, en las fotografías de los grupos tratados crónicamente con carvedilol, nebivolol o amlodipina se visualiza un patrón en el contenido de fibras similar a los animales WKY (**Figura 20**).



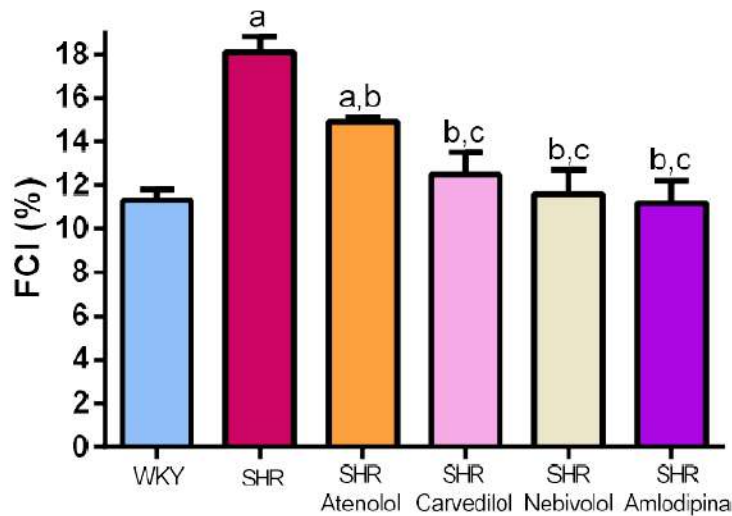
**Figura 20.** Imágenes representativas de los cortes transversales de anillos aórticos teñidos con sirius red de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Las fotografías se muestran con una escala final de 400X. Barra de escala: 1  $\mu$ m.



La cuantificación de la fibrosis aórtica a partir de la tinción con sirius red estableció la existencia de un incremento en el depósito de colágeno de los animales SHR en relación a los normotensos, evidenciado por la elevación del 68% de la fibrosis intersticial. Los resultados de los tratamientos evaluados siguen el mismo patrón que en el VI: aunque el atenolol

redujo el contenido de colágeno en la túnica media, el nebivolol, el carvedilol y la amlodipina revirtieron completamente esta alteración normalizando el contenido de colágeno del vaso sanguíneo (Figura 21). Nuevamente el efecto de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación resultó significativamente superior al  $\beta$ -bloqueante de segunda generación atenolol.

**Figura 21.** Fibrosis aórtica de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. WKY; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol.



### ***Comparación de los efectos morfométricos sobre ventrículo izquierdo y aorta torácica***

La hipertensión esencial de los animales SHR indujo la hipertrofia macroscópica del VI, de cardiomiocitos y de la túnica media aórtica al mismo tiempo que generó un aumento en el contenido de colágeno de los órganos evaluados. El atenolol evidenció una reducción significativa en el contenido de fibrosis del VI y de la aorta la cual no se vio acompañada de una disminución de la hipertrofia macroscópica del VI, evaluada a partir del IMVI y ecocardiográficamente, ni del espesor de la capa media. En cambio, los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina indujeron una reducción equiparable en la totalidad de los datos patológicos evaluados en ambos órganos, tanto en la comparación de las drogas entre sí como entre los parámetros de hipertrofia y fibrosis.



En su conjunto, el análisis morfológico del VI y la aorta torácica muestran que los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación presentan un efecto superior al atenolol en términos de daño de órgano y eficacia comparable al bloqueante cálcico amlodipina.

### ***Efecto sobre los marcadores bioquímicos de daño de órgano blanco***

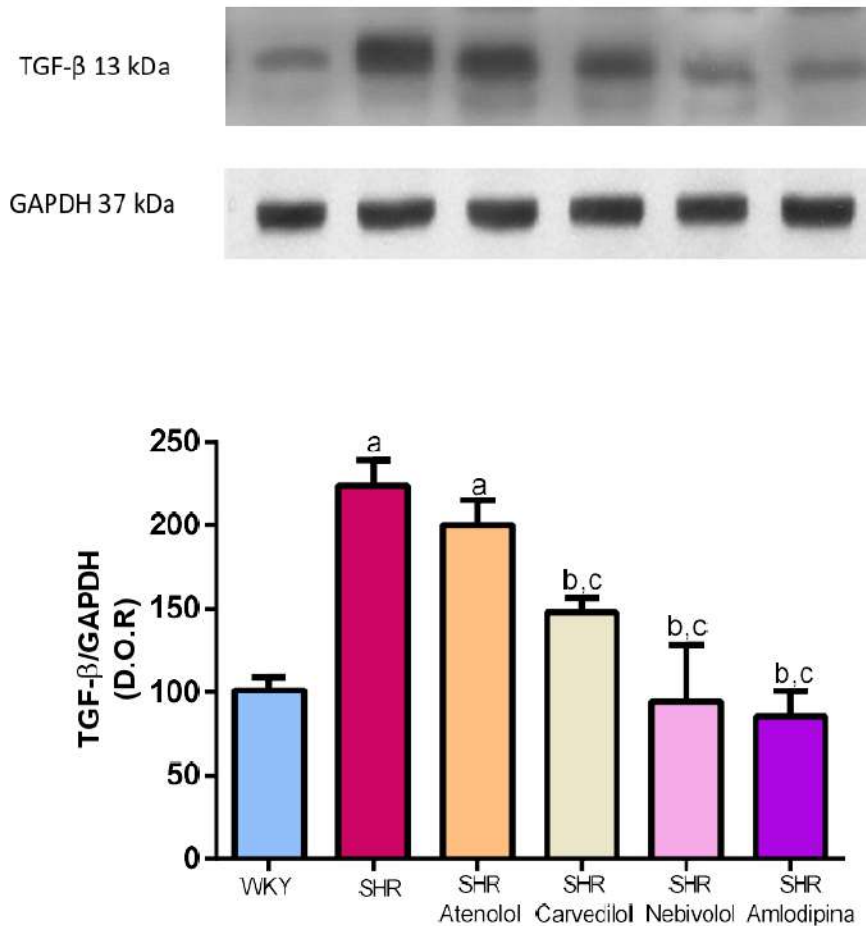
Se realizó la determinación bioquímica del daño de órgano blanco a partir de la evaluación de la expresión y actividad de marcadores moleculares de inflamación y fibrosis.

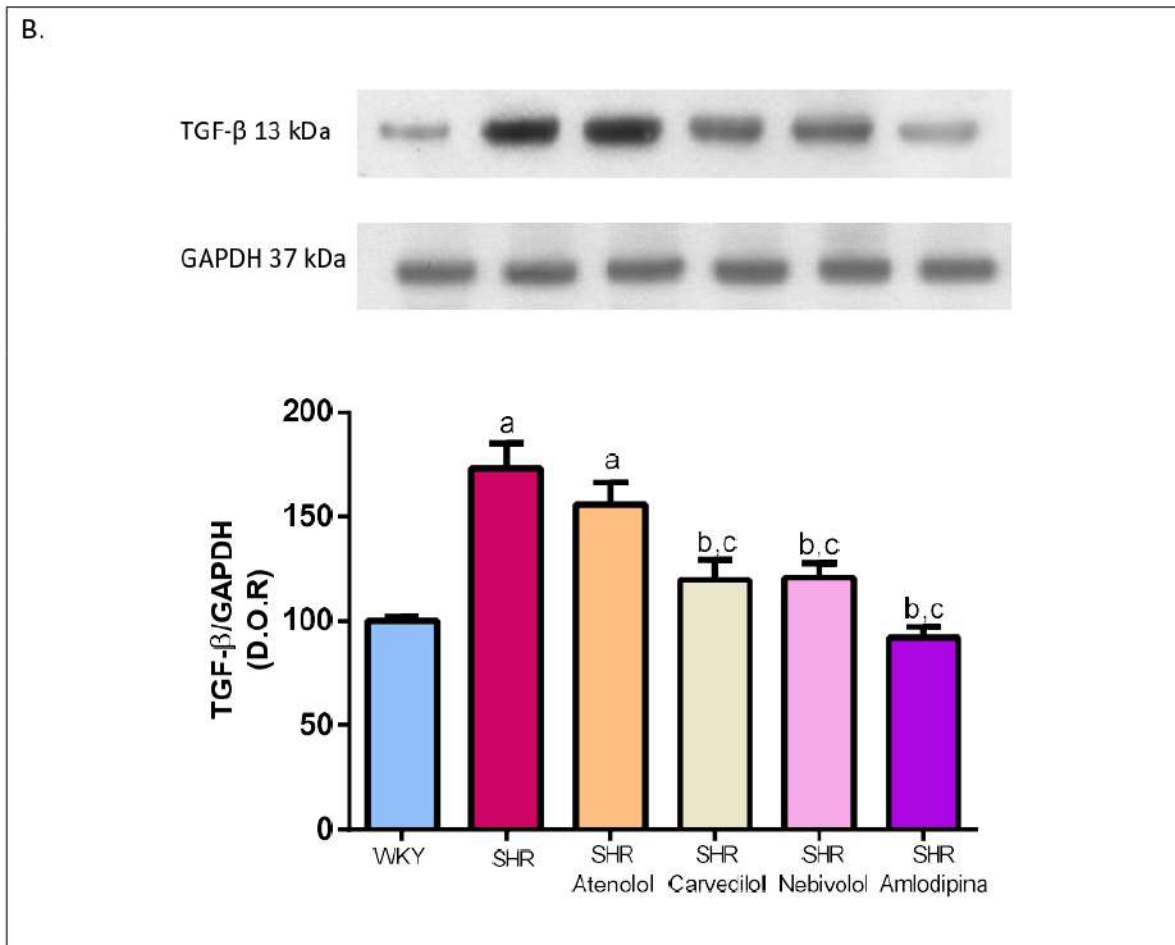
### ***Expresión de TGF- $\beta$***

Se evaluaron los niveles de la citoquina profibrótica TGF- $\beta$  en el VI y la aorta torácica por la técnica de western blot. El análisis de las placas de revelado mostró la duplicación de los niveles de TGF- $\beta$  en los animales SHR respecto de los controles WKY normotensos ( $p < 0,05$ ). La administración oral crónica de nebivolol, carvedilol y amlodipina, pero no de atenolol, normalizó la sobreexpresión de dicha citoquina tanto a nivel del VI como de la aorta torácica (**Figura 22**). Las drogas evaluadas evidenciaron el mismo patrón de respuesta en ambos órganos estudiados.

**Figura 22.** Expresión de TGF- $\beta$  e imágenes representativas de las placas de revelado de western blot en VI (A) y aorta torácica (B) de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales WKY controles. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. WKY; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol.

A.





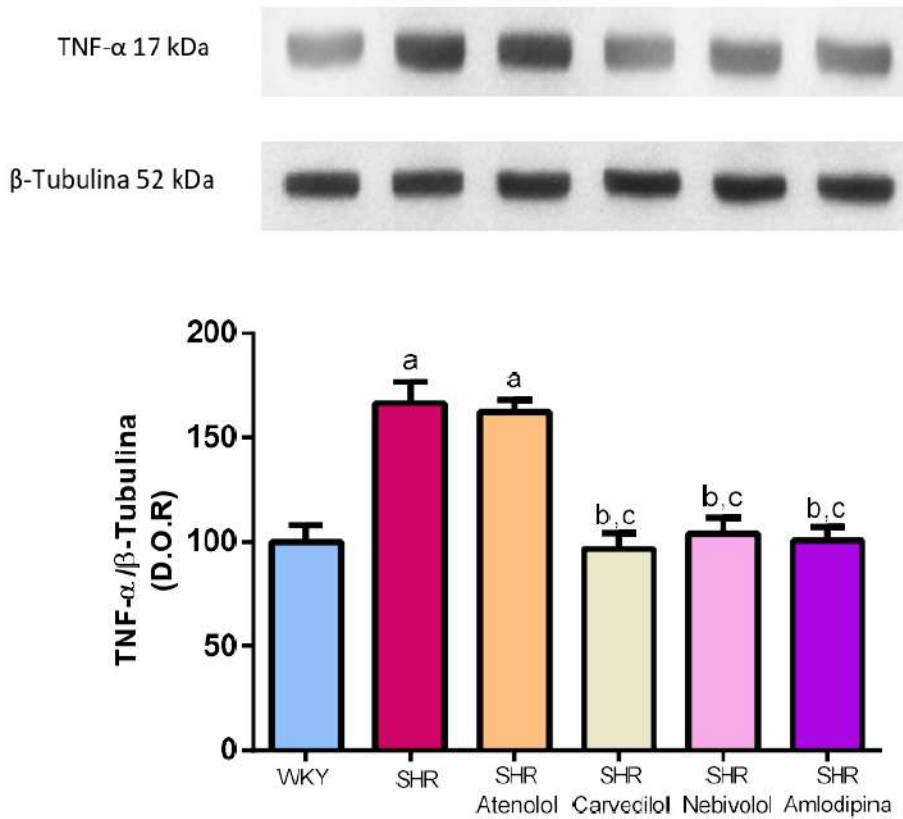
### **Expresión de TNF- $\alpha$ e IL-6**

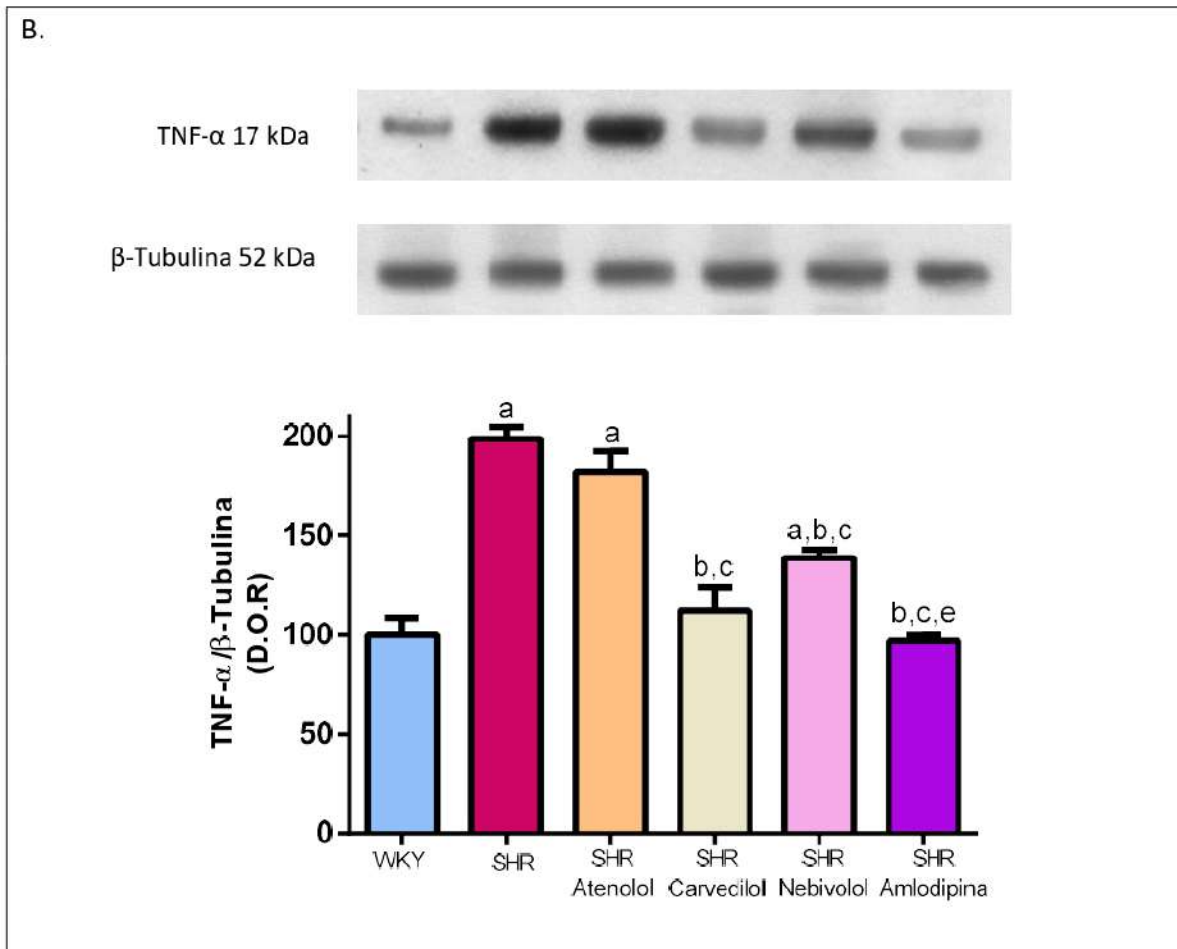
Al evaluar la expresión de las citoquinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 se obtuvieron resultados similares a los encontrados para el mediador profibrótico TGF- $\beta$ .

En el caso del TNF- $\alpha$ , los animales SHR tratados con vehículo mostraron un aumento del 66% y 98% en los niveles de la citoquina en el VI y la aorta torácica, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Aunque en el VI los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico disminuyeron completamente su sobreexpresión, en la aorta la amlodipina redujo los niveles de TNF- $\alpha$  de manera significativamente superior al carvedilol, pero no al nebivolol (**Figura 23**). Además, el carvedilol presentó un efecto más pronunciado sobre el VI que sobre la aorta en donde su acción fue sobrepasada por el nebivolol y la amlodipina.

**Figura 23.** Expresión de TNF- $\alpha$  e imágenes representativas de las placas de revelado de western blot en VI (A) y aorta torácica (B) de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales WKY controles. <sup>a</sup>p<0,05 vs. WKY; <sup>b</sup>p<0,05 vs. SHR; <sup>c</sup>p<0,05 vs. SHR Atenolol; <sup>e</sup>p<0,05 vs. SHR Carvedilol.

A.

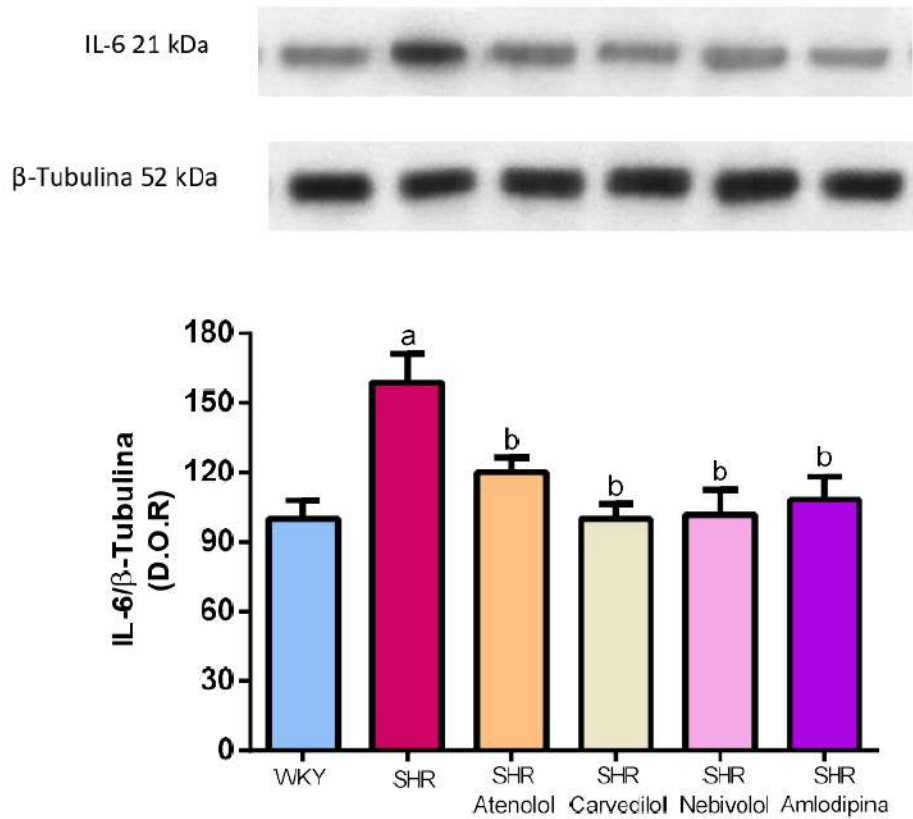




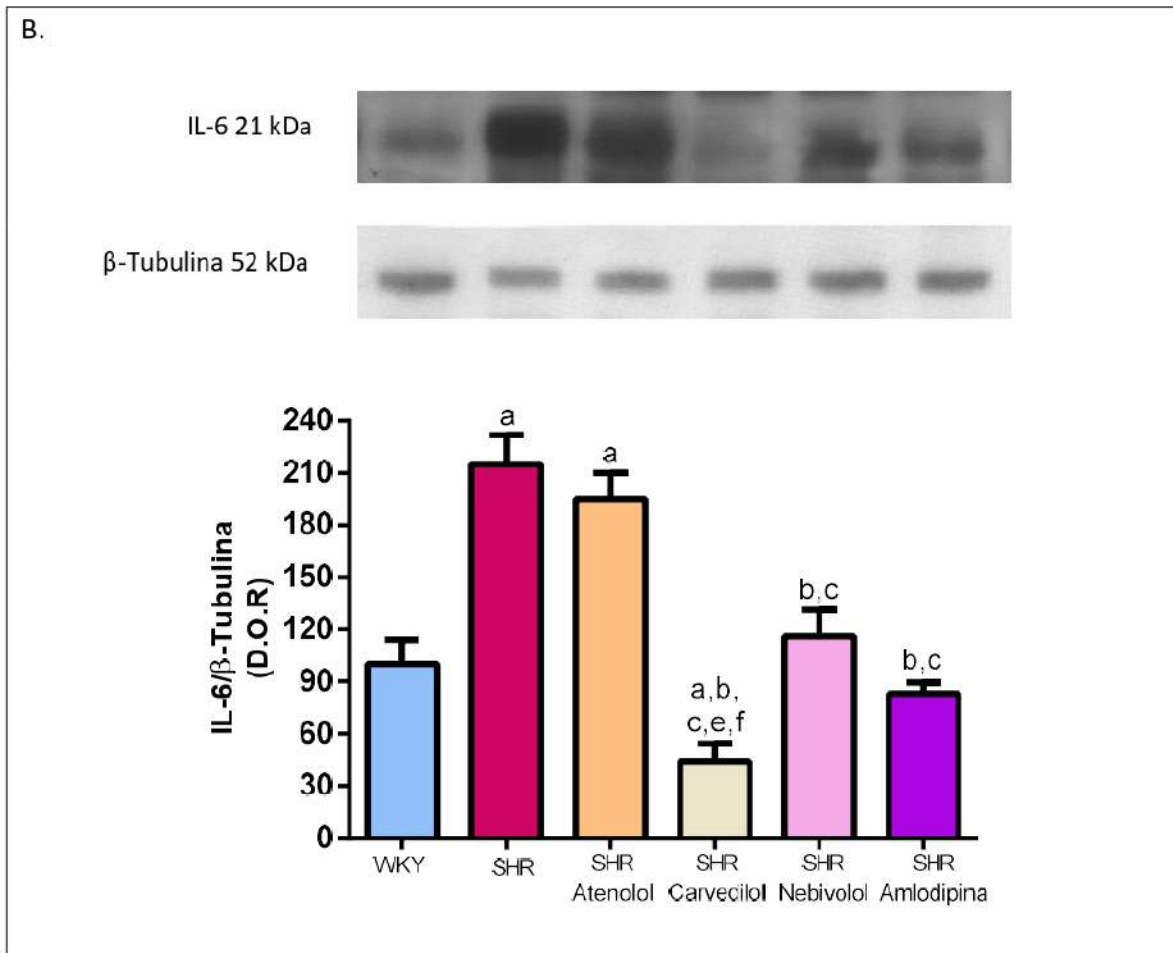
Por último, en el caso de la IL-6, en los animales SHR se observó una elevación del 59% y 215% en los niveles de dicho mediador en el VI y la aorta torácica, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Al evaluar el efecto de los tratamientos, las drogas no respondieron de la misma manera en los órganos evaluados: aunque todos los fármacos redujeron la cantidad de IL-6 a nivel ventricular, en la aorta solo los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico disminuyeron significativamente su sobreexpresión, resultando el efecto del nebivolol superior al carvedilol y la amlodipina (**Figura 24**).

**Figura 24.** Expresión de IL-6 e imágenes representativas de las placas de revelado de western blot en VI (A) y aorta torácica (B) de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales WKY controles. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. WKY; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol; <sup>e</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Carvedilol; <sup>f</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Amlodipina.

A.







### **Actividad de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9**

Se realizó la técnica de zimografía en gel sobre el VI y la aorta torácica con el objetivo de determinar el posible efecto de los tratamientos antihipertensivos sobre la actividad enzimática de las metaloproteasas de matriz MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B).

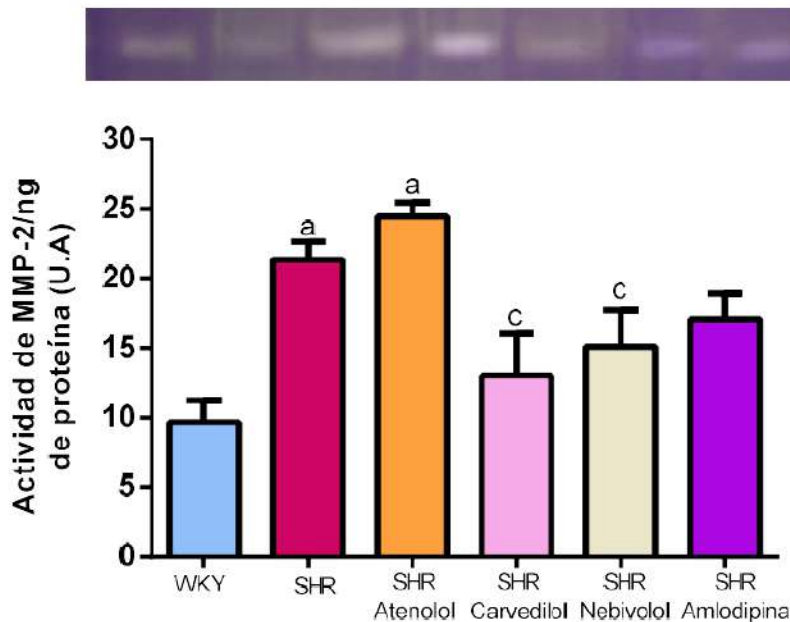
En la arteria aorta de animales genéticamente hipertensos, en concordancia con los resultados obtenidos con la técnica de western blot para el estudio de citoquinas proinflamatorias, el aumento de la tensión arterial elevó sustancialmente la actividad de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9 en relación con las ratas Wistar normotensas. El análisis de los datos indicó que, aunque los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico atenuaron el incremento de actividad gelatinolítica de MMP-2 de las ratas hipertensas, dicha diferencia no resultó ser estadísticamente significativa debido a la amplia variabilidad de los resultados. Sin embargo, sí se evidenció una disminución

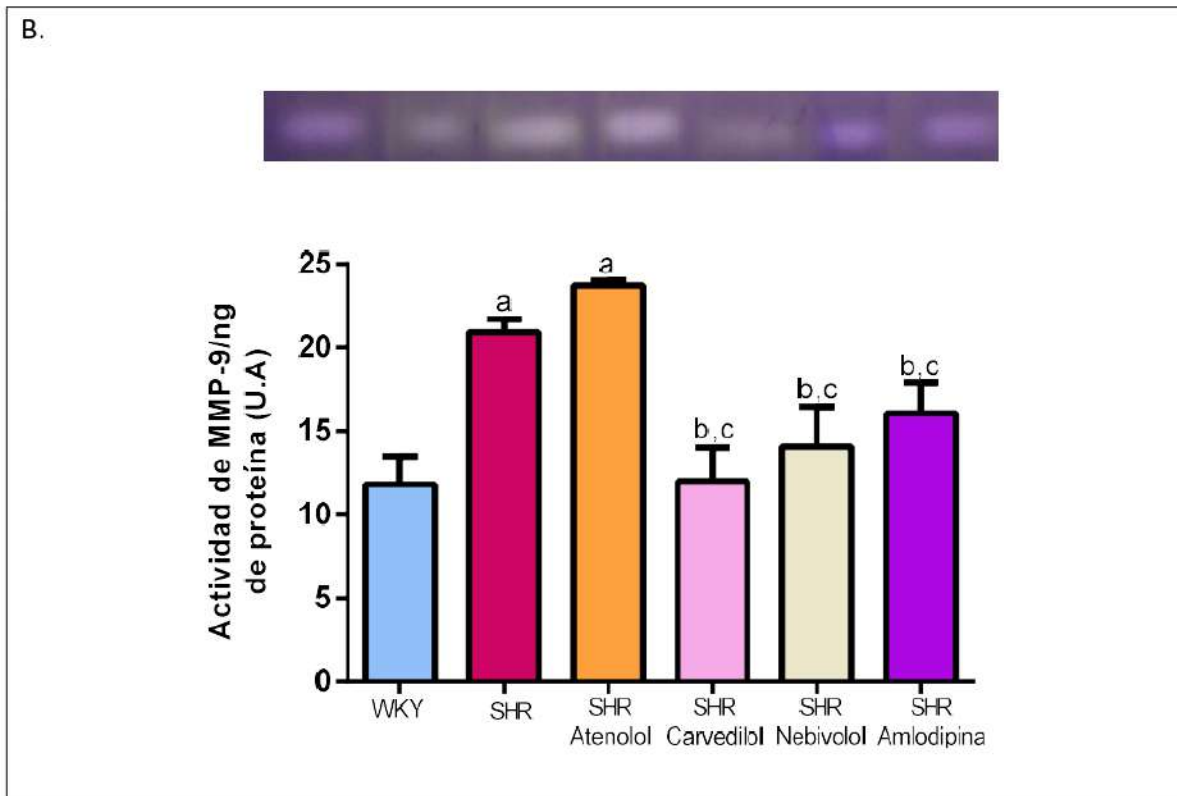


sustancial por parte del carvedilol y nebivolol respecto del atenolol. Únicamente los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores y el bloqueante cálcico mostraron efecto sobre la gelatinasa B (Figura 25).

**Figura 25.** Actividad de MMP-2 (A) y MMP-9 (B) determinada por zimografía en aorta torácica de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales WKY controles. En las imágenes representativas del zimograma, los homogenatos fueron sembrados en el mismo orden que se muestran los resultados en los gráficos más el estándar interno de promielocito que corresponde a la primera calle. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Wistar; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol.

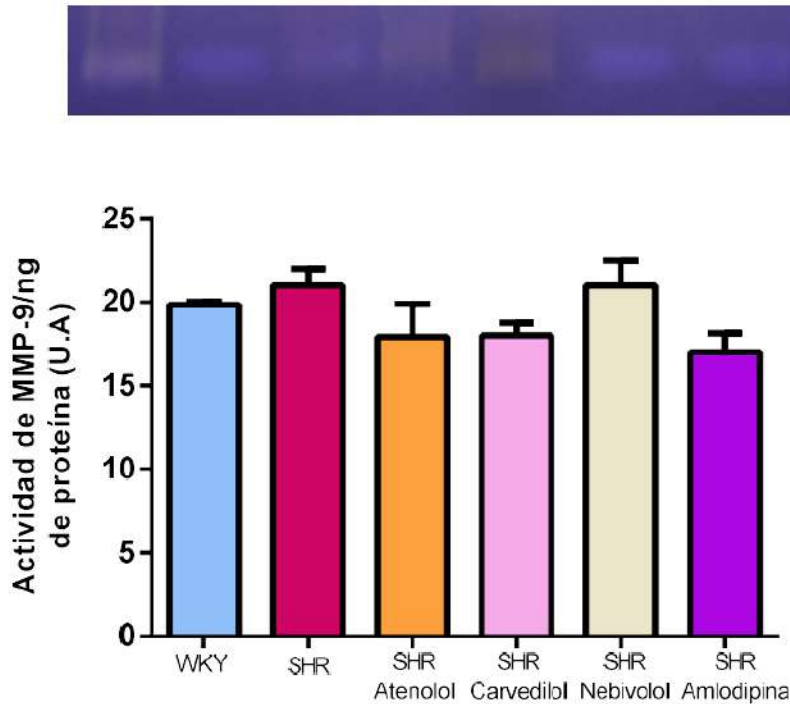
A.





No se encontraron diferencias entre la actividad enzimática de MMP-9 en el VI de animales WKY y SHR tratados crónicamente con vehículo, atenolol, nebivolol, carvedilol o amlodipina (**Figura 26**). La actividad de la isoforma 2 no pudo determinarse en el VI debido a la sensibilidad del método.

**Figura 26.** Actividad de MMP-9 determinada por zimografía en ventrículo izquierdo de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales Wistar controles. En la imagen representativa del zimograma, los homogenatos fueron sembrados en el mismo orden que se muestran los resultados en el gráfico más el estándar interno de promielocito que corresponde a la primera calle.



### ***Correlación entre parámetros hemodinámicos y de daño de órgano blanco***

Con el objetivo de determinar la contribución relativa de los distintos parámetros hemodinámicos sobre marcadores de daño de órgano blanco se calculó el cociente de relación de Pearson para establecer la existencia de linealidad entre las variables evaluadas. Se investigó la relación existente entre la PA, determinada de manera periférica y central, con sus respectivos índices de variabilidad, con parámetros morfológicos de hipertrofia y fibrosis en VI y aorta torácica.

Las relaciones encontradas entre la PA y la VPA de corto plazo con el daño morfológico o histológico de los órganos evaluados se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Coeficiente de regresión lineal (Pearson r) entre los parámetros de presión arterial y variabilidad de presión arterial con los datos histomorfológicos de daño de órgano blanco en VI y aorta torácica en SHR.

		Parámetro morfológico de daño de órgano blanco					
		Índice de hipertrofia ventricular izquierda (mg/g)	Área de cardiomiocitos ( $\mu\text{m}^2$ )	Fibrosis del ventrículo izquierdo (FCI %)	Espesor de la capa media aórtica ( $\mu\text{m}$ )	Espesor de la media/diámetro de la luz ( $\mu\text{m}/\text{mm}$ )	Fibrosis de la arteria aorta (FCI %)
Medición de PA o VPA	PAS periférica (mmHg)	0,4376*	0,6862*	0,4500	0,7435*	0,7790*	0,5029*
	DE intradía de la PAS periférica (mmHg)	0,4383*	0,7154*	0,5587*	0,6404*	0,6299*	0,7616*
	DE entredía de la PAS periférica (mmHg)	0,4931*	0,6027*	0,3272	0,3759*	0,5384*	0,3554
	PAS central (mmHg)	0,0633	0,1764	0,7847*	0,4108*	0,4413*	0,7981*
	DE de la PA central (mmHg)	0,4215*	0,6454*	0,5292*	0,6632	0,7454*	0,6500*
	CV de la PA central (%)	0,4116*	0,6351*	0,4113*	0,6597*	0,5899*	0,1724

\*p<0,05

Se evidenció una correlación positiva entre el índice de hipertrofia ventricular izquierda con la PAS periférica y la VPA determinada de manera directa e indirecta pero no con el nivel de PAS central. De manera similar, la fibrosis del VI se asoció positivamente con los niveles de PAS central y de VPA determinada de manera directa e indirecta pero no con la PAS periférica, estableciendo la mayor importancia del valor de PAS central y VPA por sobre la PAS periférica para el desarrollo de fibrosis del VI.

El análisis morfométrico de la aorta torácica se correlacionó positivamente con la totalidad de los parámetros de PA y VPA. Por último, se encontró una asociación positiva entre los parámetros de PA y VPA de corto plazo, medidos tanto directa como indirectamente, y la fibrosis de la aorta. Sin embargo, el cociente de relación de Pearson entre el DE intradía de la PAS periférica, la PAS central y el DE de la PA central con la fibrosis aórtica resultan mayores que para la PAS periférica. Estos resultados indican que pequeños cambios en dichos parámetros hemodinámicos contribuyen marcadamente y de manera superior a la PAS periférica en el desarrollo de fibrosis de la arteria aorta.

## RESULTADOS EN RATAS HIPERTENSAS POR LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE L-NAME

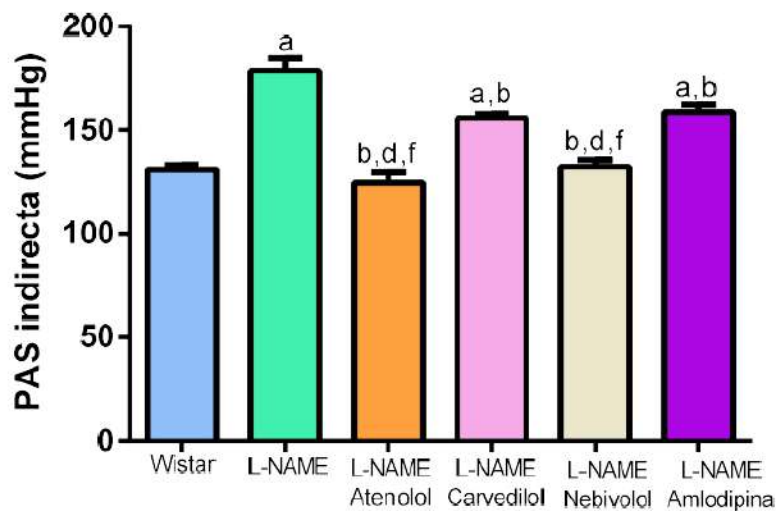
### *Evaluación de los efectos hemodinámicos indirectos del tratamiento con $\beta$ -bloqueantes o amlodipina*

La determinación de la PAS periférica por el método indirecto de *tail-cuff* reveló que todas las drogas administradas redujeron significativamente el incremento de la presión sistólica de los animales hipertensos por la administración de L-NAME. Sin embargo, tanto el atenolol como el nebivolol evidenciaron un efecto superior al del carvedilol y la amlodipina ya que llegaron a normalizar el nivel de PAS. Por otro lado, los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina resultaron igualmente de eficaces para reducir la estimación de la VPA de corto plazo, a partir del cálculo del DE intradía de la PAS (**Figura 27**). Al estimar la VPA de mediano plazo, a través del cálculo de DE entredía de la PAS, se observó que las ratas hipertensas por L-NAME presentan una marcada elevación de dicho parámetro, ya que el mismo se cuadruplicó en los animales hipertensos. El nebivolol y la amlodipina disminuyeron

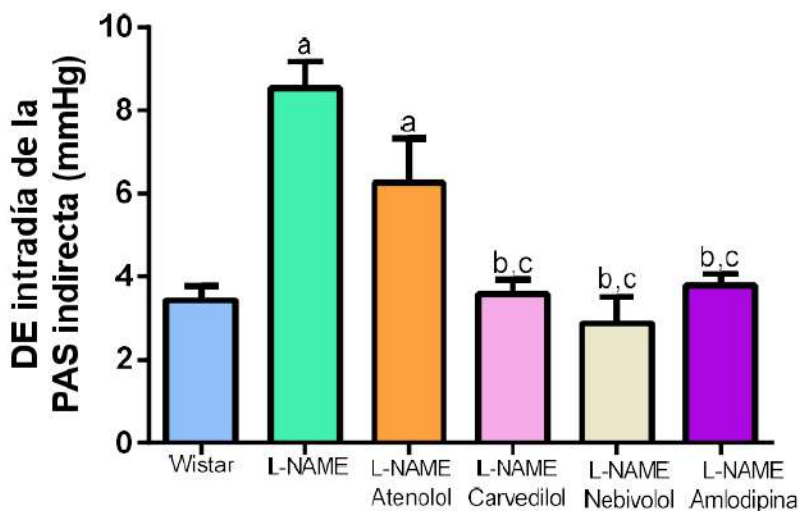
el DE entredía de la PAS indirecta mientras que el carvedilol y el atenolol, aunque mostraron cierta tendencia en reducirlo, su valor no alcanzó la diferencia estadística.

**Figura 27.** Presión arterial sistólica indirecta (periférica) (A), DE intradía de la presión arterial sistólica indirecta (B) y DE entredía de la presión arterial sistólica indirecta (C) de ratas Wistar e hipertensas por L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, carvedilol, nebivolol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Wistar; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. L-NAME; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. L-NAME Atenolol; <sup>d</sup> $p < 0,05$  vs. L-NAME Carvedilol; <sup>f</sup> $p < 0,05$  vs. L-NAME Amlodipina.

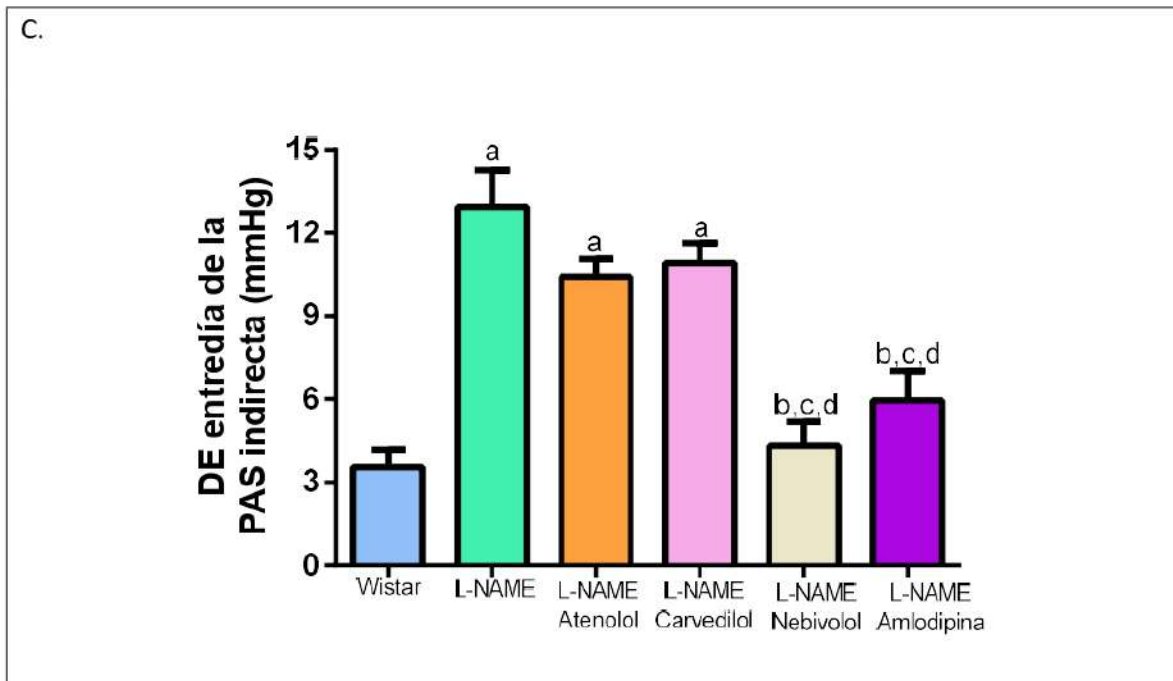
A.



B.







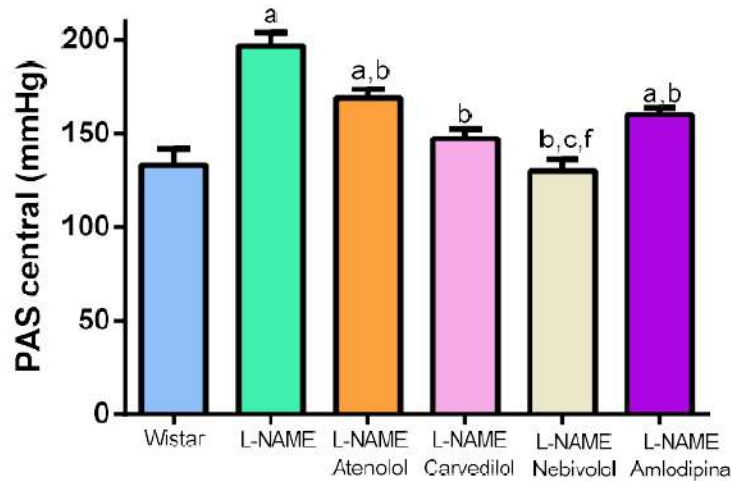
### ***Evaluación de los efectos hemodinámicos directos del tratamiento con $\beta$ -bloqueantes o amlodipina***

La evaluación de la PAS central estimada en la arteria carótida evidenció que los animales hipertensos por L-NAME presentan un aumento de la misma y de la frecuencia cardíaca. Al igual que lo observado a nivel periférico, todos los fármacos administrados disminuyeron significativamente la PAS central, pero en este caso, el nebivolol y el carvedilol lo hicieron en mayor medida que el atenolol y la amlodipina, logrando restablecer los valores hasta alcanzar el nivel de presión de los animales Wistar normotensos. Aunque el atenolol disminuyó la frecuencia cardíaca, el nebivolol y el carvedilol mostraron un efecto más pronunciado, mientras que la amlodipina no evidenció respuesta (**Figura 28**).

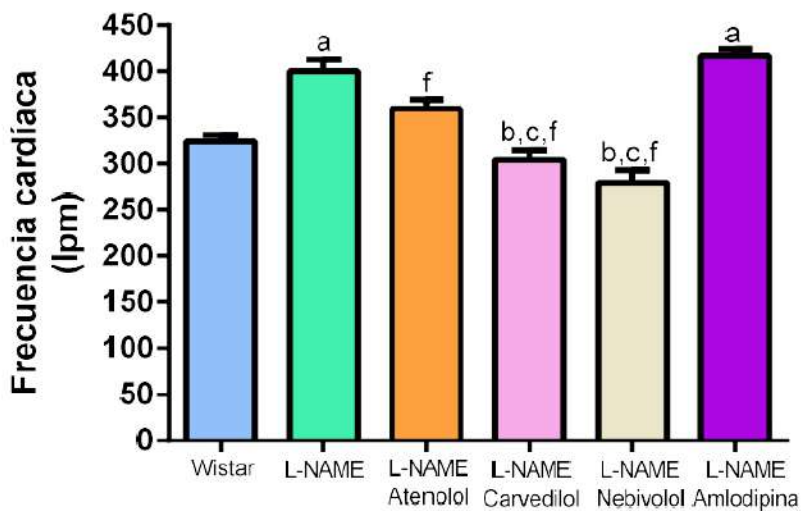


**Figura 28.** Presión arterial sistólica directa (central) (A) y frecuencia cardíaca (B) de ratas Wistar e hipertensas por L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, carvedilol, nebivolol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Wistar; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. L-NAME; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. L-NAME Atenolol; <sup>f</sup> $p < 0,05$  vs. L-NAME Amlodipina.

A.



B.

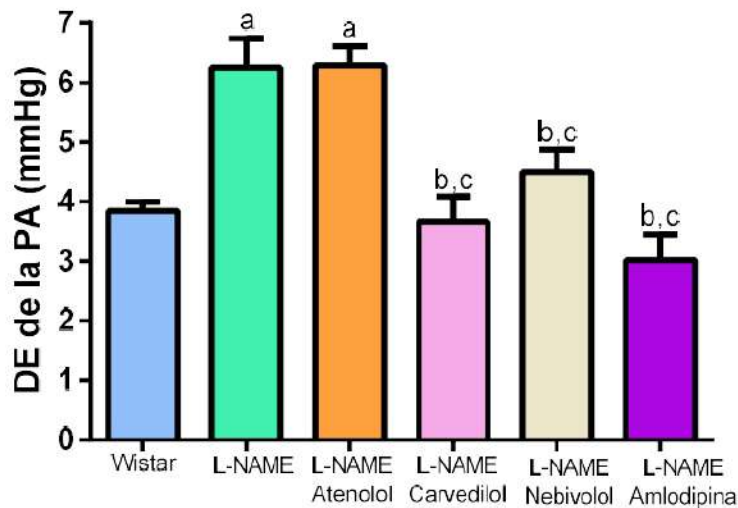


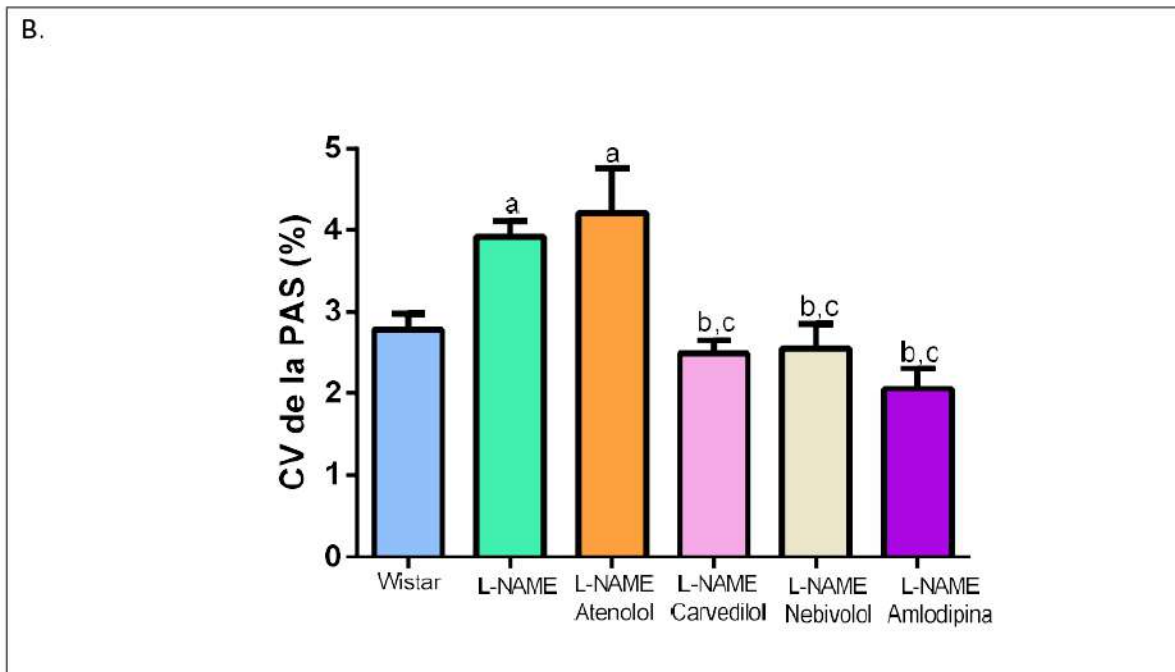
Con respecto al análisis de VPA de corto plazo, se observó que los animales hipertensos por L-NAME presentan una duplicación del DE de la PA central mientras que el

CV% de la PA se encuentra significativamente incrementado ( $p < 0,05$ ). Los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina redujeron sustancialmente los parámetros directos de VPA de corto plazo e incluso normalizaron su valor hasta alcanzar el nivel de los animales Wistar normotensos. Por su parte, el atenolol carece de respuesta sobre dichos factores hemodinámicos (Figura 29). El efecto de los fármacos sobre la VPA de corto plazo difiere de la respuesta obtenida sobre la PA indicando que ambos parámetros resultan de acciones hemodinámicas independientes. En este sentido, aunque el atenolol redujo significativamente la PAS central de los animales hipertensos por L-NAME, no evidenció acción sobre la determinación directa de la VPA de corto plazo. Por otro lado, si bien el nebivolol disminuyó la PAS central en mayor medida que la amlodipina y el carvedilol (diferencia no significativa) fue, de las tres drogas, la que presentó menor efecto sobre el DE la PA.

**Figura 29.** DE de la presión arterial directa (A) y CV% de la presión arterial directa (B) de ratas Wistar e hipertensas por L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, carvedilol, nebivolol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Wistar; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. L-NAME; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. L-NAME Atenolol.

A.

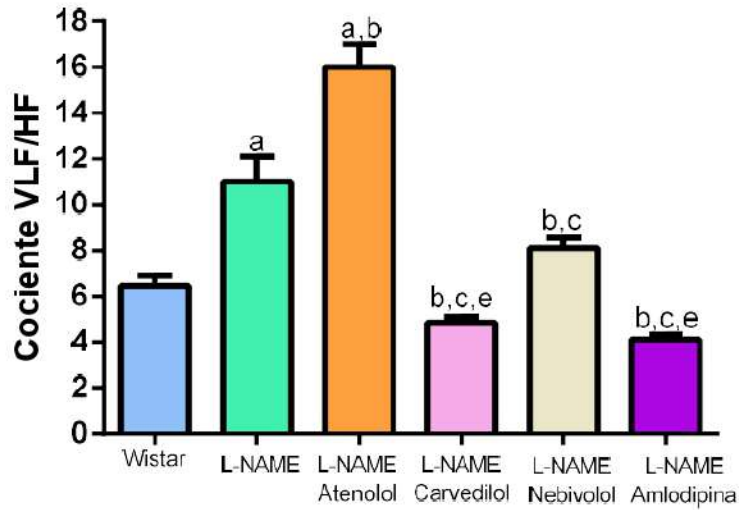




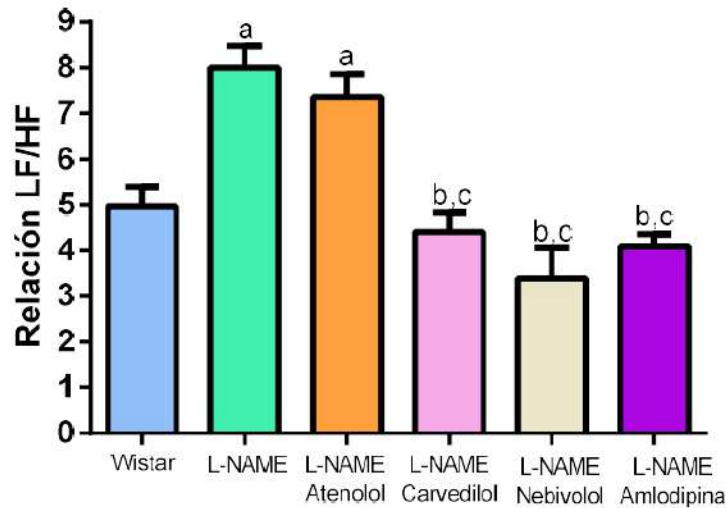
El análisis de la VPA latido-a-latido cardíaco obtenido a partir de la aplicación de la transformada rápida de Fourier en el registro continuo y directo de PA estableció que las ratas hipertensas por L-NAME presentan un incremento de la respuesta vascular miogénica y de la actividad simpática vascular, evidenciado por la elevación del cociente VLF/HF y LF/HF, respectivamente. Mientras que el tratamiento a largo plazo con atenolol incrementó marcadamente el índice VLF/HF y no modificó la relación LF/HF, la administración de  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación o amlodipina normalizó las razones VLF/HF y LF/HF (Figura 30).

**Figura 30.** Cociente VLF/HF (A) y cociente LF/HF (B) de ratas Wistar e hipertensas por L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, carvedilol, nebivolol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup>p<0,05 vs. Wistar; <sup>b</sup>p<0,05 vs. L-NAME; <sup>c</sup>p<0,05 vs. L-NAME Atenolol; <sup>e</sup>p<0,05 vs. L-NAME Nebivolol.

A.



B.



*Comparación de los efectos hemodinámicos directos e indirectos del tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes o amlodipina*

El efecto sobre la PA y la VPA de los agentes antihipertensivos estudiados difiere si la evaluación hemodinámica se realiza a nivel central o periférico. Así, aunque el carvedilol presentó una leve acción antihipertensiva periférica, su efecto sobre la PA central resultó más pronunciado. En términos de PAS, la amlodipina demostró una respuesta menor en comparación a los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación tanto a nivel indirecto como directo, siendo la diferencia estadísticamente significativa con el nebivolol, pero no así con el carvedilol. El efecto de los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores sobre la VPA de corto plazo evidenciado de manera indirecta fue corroborado en el análisis directo de PA. Contrario a ello, aunque el atenolol demostró una leve tendencia para reducir el DE intradía de la PAS periférica, su acción no llega a ser estadísticamente significativa y además el efecto sobre la VPA de corto plazo se perdió en el análisis directo del registro continuo de PA.

### ***Evaluación morfológica y de funcionalidad ventricular cardíaca por ecocardiografía***

El análisis del estudio ecocardiográfico evidenció que los animales hipertensos por la administración de L-NAME exhiben un incremento en el espesor de la pared anterior y posterior del VI tanto durante la sístole como la diástole cardíaca, una prolongación del tiempo de relajación isovolumétrica y una inversión de la relación de las velocidades de llenado ventricular E/A a comparación de las ratas Wistar normotensas ( $p < 0,05$ ). Estos resultados serían indicadores de la presencia de hipertrofia del VI y alteración de la función sistólica y diastólica del ciclo cardíaco. Cabe destacar que en los animales hipertensos por L-NAME, el aumento del espesor de las paredes ventriculares resulta menor al observado en los animales SHR.

En mayor o menor medida, las cuatro drogas evaluadas disminuyeron el espesor de las paredes del VI durante ambas fases cardíacas. Si bien únicamente el atenolol y el carvedilol redujeron significativamente el espesor de la pared anterior durante la diástole, el nebivolol y la amlodipina mostraron una fuerte tendencia para disminuirlo. De la misma manera, aunque la amlodipina fue el único fármaco que no generó una atenuación estadísticamente significativa en el espesor de la pared anterior durante la sístole evidenció

una amplia reducción de dicho parámetro ecocardiográfico. El atenolol y el carvedilol fueron las drogas que restituyeron la totalidad de los espesores de la pared ventricular.

El aumento de la tensión arterial inducido por el L-NAME ocasionó la inversión de la relación de velocidades de llenado ventricular, siendo la razón  $E/A < 1$ . Esta situación indicaría la existencia de una alteración patológica en el patrón de llenado del ventrículo durante la fase diastólica. Pese a que las cuatro drogas normalizaron la relación  $E/A$ , es decir la misma volvió a ser superior a 1 ( $E/A > 1$ ), el carvedilol y el nebivolol presentaron un efecto estadísticamente superior al atenolol. Contrariamente, solo el atenolol y la amlodipina redujeron significativamente el tiempo de relajación isovolumétrica. Aunque el carvedilol y el nebivolol mostraron cierta tendencia en su normalización, la diferencia no llega a ser estadísticamente diferente respecto de los animales hipertensos por L-NAME (**Tabla 9**). No se observaron cambios en la fracción de eyección, fracción de acortamiento y el diámetro de fin de diástole y sístole.



**Tabla 9.** Parámetros ecocardiográficos de ratas Wistar e hipertensas por L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM.

Parámetro ecocardiográfico	Wistar (n=6)	L-NAME (n=6)	L-NAME Atenolol (n=6)	L-NAME Carvedilol (n=6)	L-NAME Nebivolol (n=6)	L-NAME Amlodipina (n=6)
Espesor de la pared anterior en diástole (mm)	1,50 $\pm$ 0,06	1,97 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,40 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	1,58 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	1,63 $\pm$ 0,03	1,63 $\pm$ 0,05
Espesor de la pared anterior en sístole (mm)	2,10 $\pm$ 0,16	2,77 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,20 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	2,30 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	2,33 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	2,45 $\pm$ 0,06
Espesor de la pared posterior en diástole (mm)	1,60 $\pm$ 0,04	2,10 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	1,63 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	1,70 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	1,72 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	1,68 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>
Espesor de la pared posterior en sístole (mm)	2,18 $\pm$ 0,10	2,87 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	2,03 $\pm$ 0,07 <sup>b,d</sup>	2,38 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	2,10 $\pm$ 0,01 <sup>b,d</sup>	2,20 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>
Tiempo de relajación isovolumétrica (mseg)	28,3 $\pm$ 2,9	38,6 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	32,5 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	34,3 $\pm$ 0,6	36,0 $\pm$ 2,0	32,0 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>
Diámetro de fin de diástole (mm)	8,00 $\pm$ 0,30	7,37 $\pm$ 0,21	8,35 $\pm$ 0,12	7,53 $\pm$ 0,13	7,08 $\pm$ 0,39	7,90 $\pm$ 0,31
Diámetro de fin de sístole (mm)	5,06 $\pm$ 0,18	4,97 $\pm$ 0,30	5,53 $\pm$ 0,17	5,15 $\pm$ 0,17	4,77 $\pm$ 0,37	5,30 $\pm$ 0,32
Fracción de Eyección (%)	72,4 $\pm$ 1,4	67,2 $\pm$ 3,6	70,8 $\pm$ 2,3	65,0 $\pm$ 2,2	68,5 $\pm$ 3,0	66,8 $\pm$ 3,7
Fracción de Acortamiento (%)	36,4 $\pm$ 1,0	32,9 $\pm$ 2,5	33,8 $\pm$ 1,8	31,6 $\pm$ 1,8	33,2 $\pm$ 2,3	32,9 $\pm$ 2,9
Relación de velocidades E/A	1,44 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,27 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	1,76 $\pm$ 0,04 <sup>b,c</sup>	1,59 $\pm$ 0,08 <sup>b,c</sup>	1,57 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p<0,05 vs. Wistar; <sup>b</sup>p<0,05 vs. L-NAME; <sup>c</sup>p<0,05 vs. L-NAME Atenolol; <sup>d</sup>p<0,05 vs. L-NAME Carvedilol.

**Efecto sobre la hipertrofia y fibrosis ventricular izquierda**

La primera aproximación al estudio morfométrico del VI mediante la evaluación de su hipertrofia macroscópica evidenció el mismo patrón que los resultados del análisis ecocardiográfico ya que los animales hipertensos presentaron un aumento del IMVI, indicando la presencia de hipertrofia. En este caso el tratamiento crónico con las cuatro drogas evaluadas redujo significativamente el peso del VI y la relación peso del VI/peso del animal hasta normalizar completamente dicho parámetro. Aunque el atenolol y el carvedilol fueron las drogas que normalizaron la totalidad de los espesores ventriculares, determinados ecocardiográficamente, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro fármacos para reducir el IMVI. Por último, no se observaron cambios en el peso de los animales debido al tratamiento antihipertensivo (Tabla 10).

**Tabla 10.** Peso del ventrículo izquierdo, peso del animal y su relación en ratas Wistar e hipertensas por L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM.

Parámetro	Wistar (n=6)	L-NAME (n=6)	L-NAME Atenolol (n=6)	L-NAME Carvedilol (n=6)	L-NAME Nebivolol (n=6)	L-NAME Amlodipina (n=6)
Peso del ventrículo izquierdo (mg)	952,2 $\pm$ 12,2	1130,0 $\pm$ 8,3 <sup>a</sup>	905,4 $\pm$ 25,7 <sup>b</sup>	875,2 $\pm$ 35,0 <sup>b</sup>	823,1 $\pm$ 12,8 <sup>a,b</sup>	868,9 $\pm$ 9,3 <sup>b</sup>
Peso del animal (g)	447 $\pm$ 24	442 $\pm$ 13	437 $\pm$ 8	402 $\pm$ 10	390 $\pm$ 4	423 $\pm$ 17
Índice de masa ventricular izquierda (mg/g)	2,13 $\pm$ 0,03	2,56 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	2,13 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	2,10 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	2,06 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>

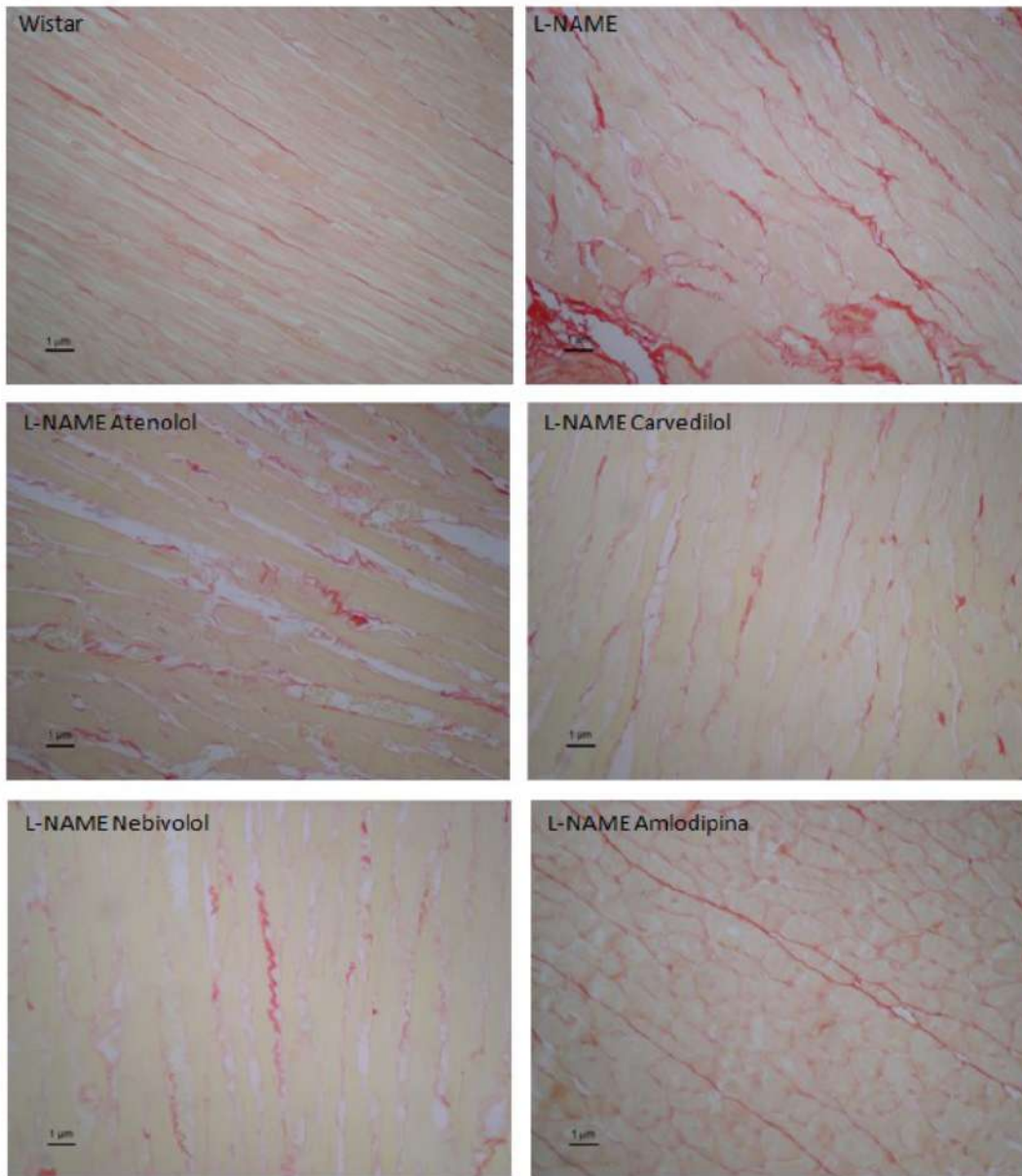
<sup>a</sup>p<0,05 vs. Wistar; <sup>b</sup>p<0,05 vs. L-NAME

Con el objetivo de estudiar aún más en detalle los resultados macroscópicos obtenidos de la hipertrofia del VI, se evaluó la acción de los  $\beta$ -bloqueantes y del bloqueante cálcico sobre la microestructura cardíaca a partir del análisis del área de cardiomiocitos y del contenido de colágeno intersticial del VI empleando un microscopio óptico.

La visualización de la estructura histológica cardíaca del VI con la tinción con sirius red muestra que los animales hipertensos por la administración de L-NAME presentan un

aumento en el número y grosor de las fibras de colágeno. El tratamiento con atenolol, aunque muestra cierta tendencia en reducir la fibrosis intersticial, su efecto es ampliamente sobrepasado por los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina en donde en las fotografías se percibe que el número de fibras y su disposición resulta similar al de los animales Wistar normotensos (**Figura 31**).

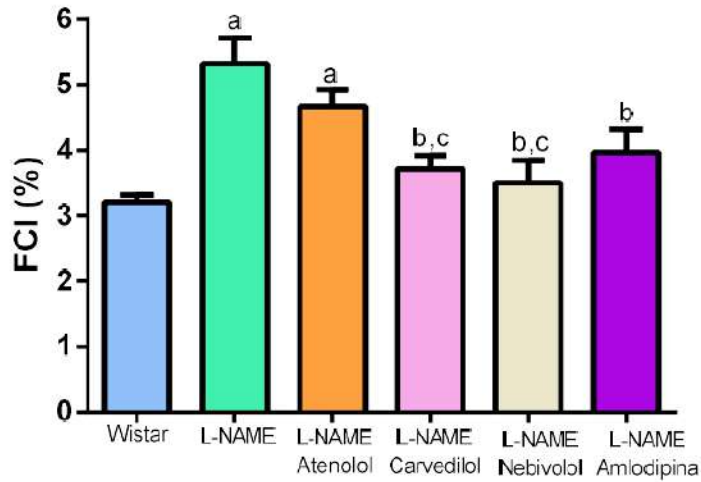
**Figura 31.** Imágenes representativas de los ventrículos izquierdos teñidos con sirius red de ratas Wistar e hipertensas por L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Las fotografías se muestran con una escala final de 400X. Barra de escala: 1  $\mu$ m.



El análisis cuantitativo de las fotografías estableció la existencia de un aumento del 65% en la cuantificación de la fibrosis ventricular de los animales hipertensos por la administración de L-NAME en relación a los animales normotensos. El nebivolol, el carvedilol y la amlodipina revirtieron completamente esta alteración histopatológica, reduciendo sustancialmente el contenido de colágeno del VI (**Figura 32**). Más aún, la prevención de la

fibrosis ventricular evidenciada por los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación resultó significativamente superior al  $\beta$ -bloqueante de segunda generación atenolol, que aunque demostró cierta tendencia en reducirla su efecto no alcanza la significancia estadística.

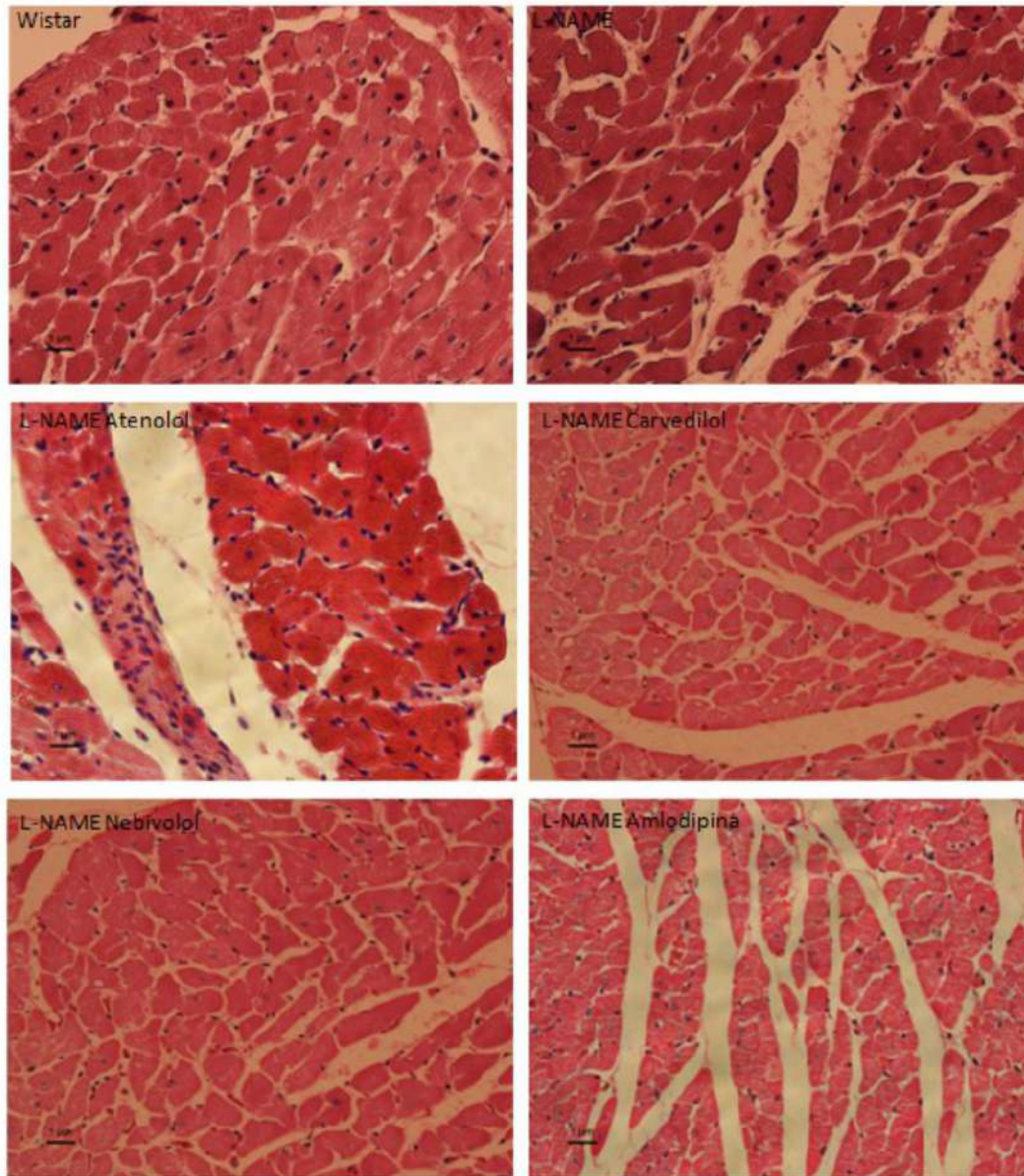
**Figura 32.** Fibrosis ventricular izquierda de ratas Wistar e hipertensas por L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. WKY; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. SHR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. SHR Atenolol.



Por otro lado, con la tinción de H-E, se calculó el área promedio de los cardiomiocitos para determinar su grado de hipertrofia. En la figura 33 se muestran las fotografías representativas de las secciones de VI teñidas con H-E, en donde los cardiomiocitos se visualizan con un corte transversal. Se observa un aumento en el diámetro y área de las células cardíacas de las ratas hipertensas e hipertensas tratadas con atenolol. Para el resto de los fármacos evaluados, el área de los cardiomiocitos se asemeja al tamaño de las células de los animales Wistar normotensos.



**Figura 33.** Imágenes representativas de los ventrículos izquierdos teñidos con H-E de ratas Wistar e hipertensas por la administración de L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Las fotografías se muestran con una escala final de 400X. Barra de escala: 1  $\mu$ m.

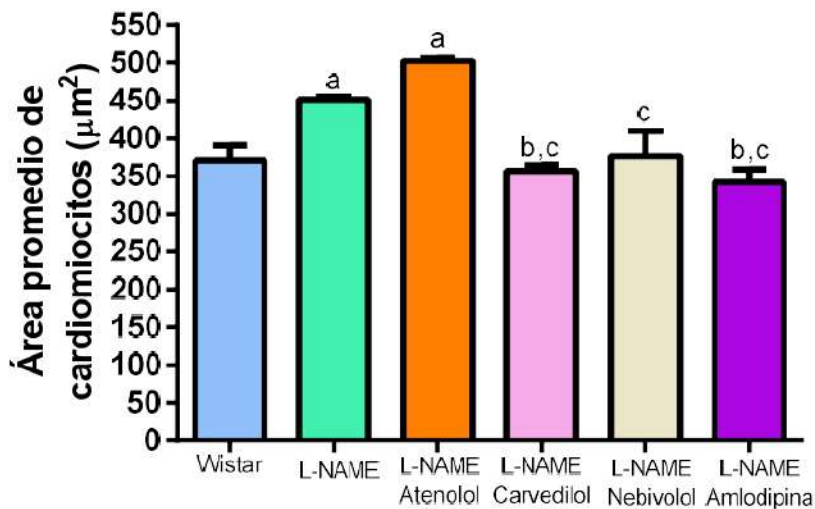


El estudio fotográfico cuantitativo de los cortes transversales del tejido estableció que la hipertensión inducida por L-NAME produce una elevación del 22% en el área promedio de las células musculares cardíacas ( $p < 0,05$ ). La administración de carvedilol, nebivolol y amlodipina redujo significativamente el área transversal de los cardiomiocitos,



que retornó hacia valores similares a los obtenidos para animales normotensos. Por su parte, el tratamiento crónico oral con atenolol no evidenció efecto sobre la hipertrofia de las células cardíacas (Figura 34). Estos resultados muestran que, en términos de evaluación histopatológica del VI, el efecto de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina fue significativamente superior al  $\beta$ -bloqueante de segunda generación atenolol.

**Figura 34.** Área promedio de cardiomiocitos de ratas Wistar e hipertensas por la administración de L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup>p<0,05 vs. WKY; <sup>b</sup>p<0,05 vs. SHR; <sup>c</sup>p<0,05 vs. SHR Atenolol.



El estudio microscópico de la morfología del VI difiere, en parte, de algunos hallazgos obtenidos a nivel macroscópico. En primer lugar, al analizar la hipertrofia del VI a partir del IMVI, se observó que la totalidad de las drogas administradas normalizaban dicho cociente. Incluso la misma tendencia de resultados se observó al evaluar el espesor de las paredes ventriculares por ecocardiografía. Aunque el tratamiento crónico con atenolol redujo el IMVI, el análisis en detalle determinó la falta de efecto sobre la fibrosis cardíaca y el aumento en el área transversal de cardiomiocitos. Sin embargo, aunque su efecto fue menor que para el resto de las drogas evaluadas, normalizó la relación de velocidades E/A retornando su valor por encima de 1. De todas formas, teniendo en cuenta estos resultados, cabe aclarar que la determinación del IMVI, a partir de su peso, resulta una primera aproximación al estudio morfométrico cardíaco y constituye un índice de baja sensibilidad

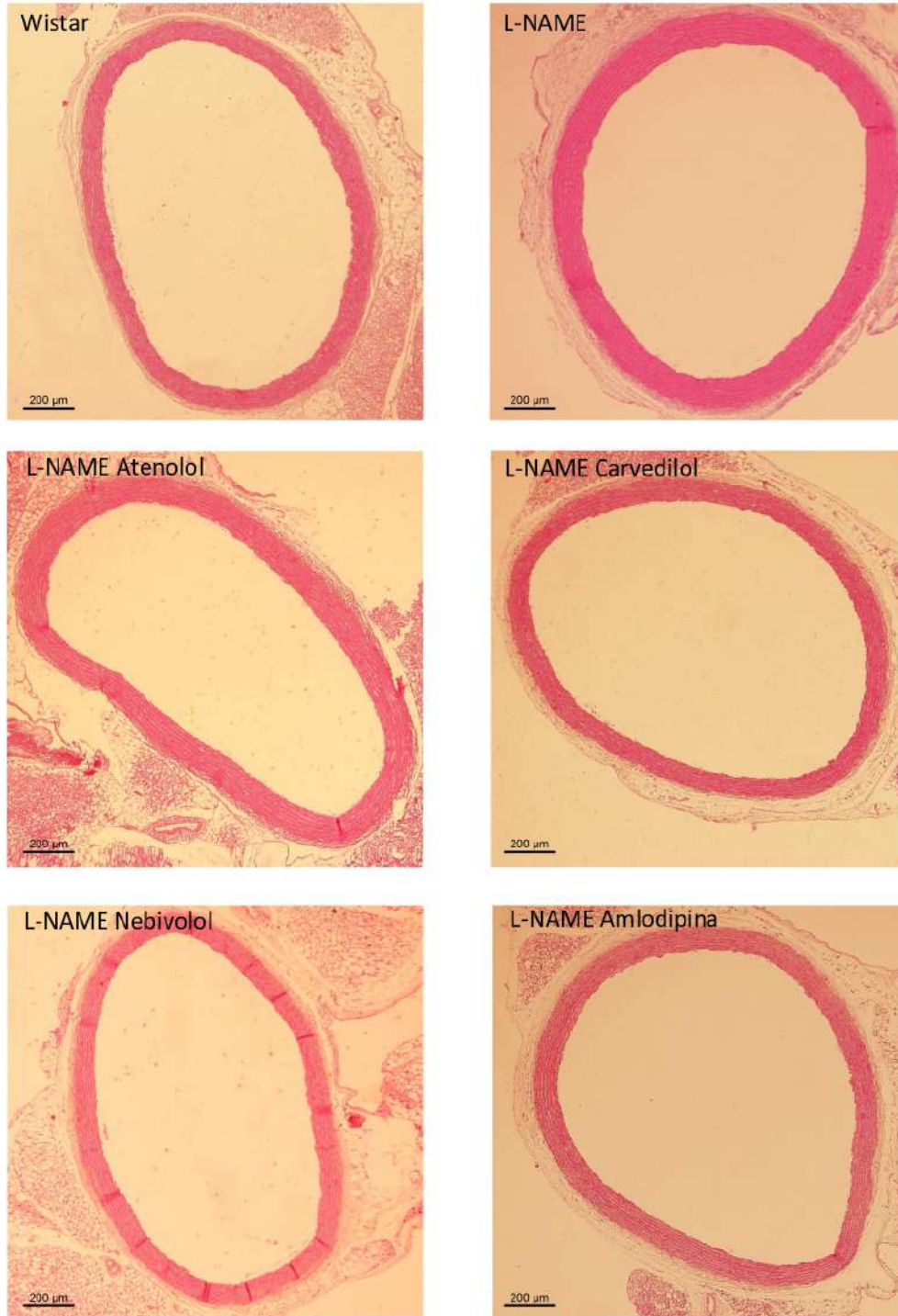
para determinar la posible presencia de fibrosis o hipertrofia de cardiomiocitos (Devereux y cols., 1986). Contrariamente al atenolol, los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores y la amlodipina fueron capaces de normalizar tanto los parámetros microscópicos como macroscópicos de la estructura ventricular cardíaca ya que la disminución del área de cardiomiocitos y del contenido de colágeno intersticial se vio acompañada por la disminución en el espesor y peso del VI y por la normalización de la relación de velocidades de llenado E/A.

### ***Evaluación de la morfología aórtica***

Con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos sobre la morfología de la arteria aorta de ratas hipertensas por L-NAME en términos de hipertrofia y fibrosis, se estudió el espesor de la capa media, su relación con el diámetro de la luz del vaso y la fibrosis.

La tinción con H-E permite distinguir rápidamente la capa media aórtica a partir de la delimitación de la misma considerando la membrana elástica interna y externa como sus límites interno y externo, respectivamente. Los animales hipertensos por L-NAME presentan un aumento en el espesor de la túnica media en relación a los animales control normotensos. El tratamiento con atenolol prácticamente no modificó el espesor de la media. En los grupos L-NAME carvedilol, nebivolol y amlodipina se observa un afinamiento en el espesor de la capa muscular (**Figura 35**).

**Figura 35.** Imágenes representativas de anillos de aorta teñidos con hematoxilina-eosina de ratas Wistar e hipertensas por L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Las fotografías se muestran con una escala final de 50X. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

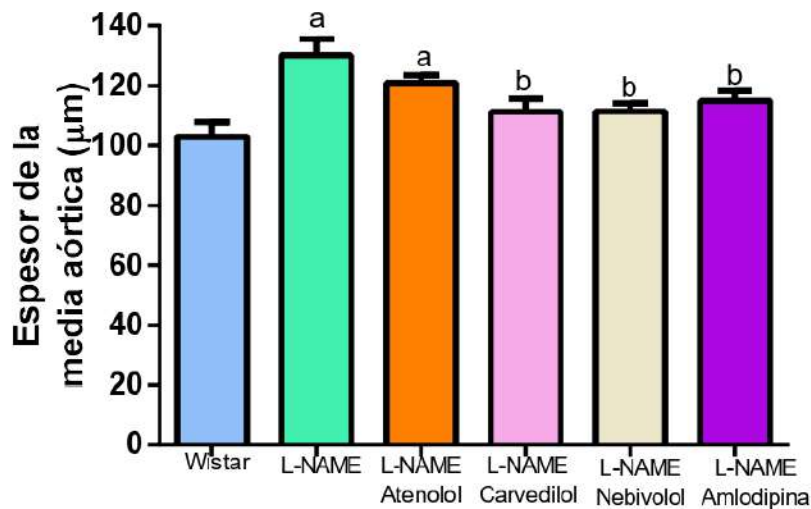


Con respecto a la determinación cuantitativa del grado de hipertrofia de la túnica media de la aorta, la elevación sostenida de la tensión arterial inducida por la administración

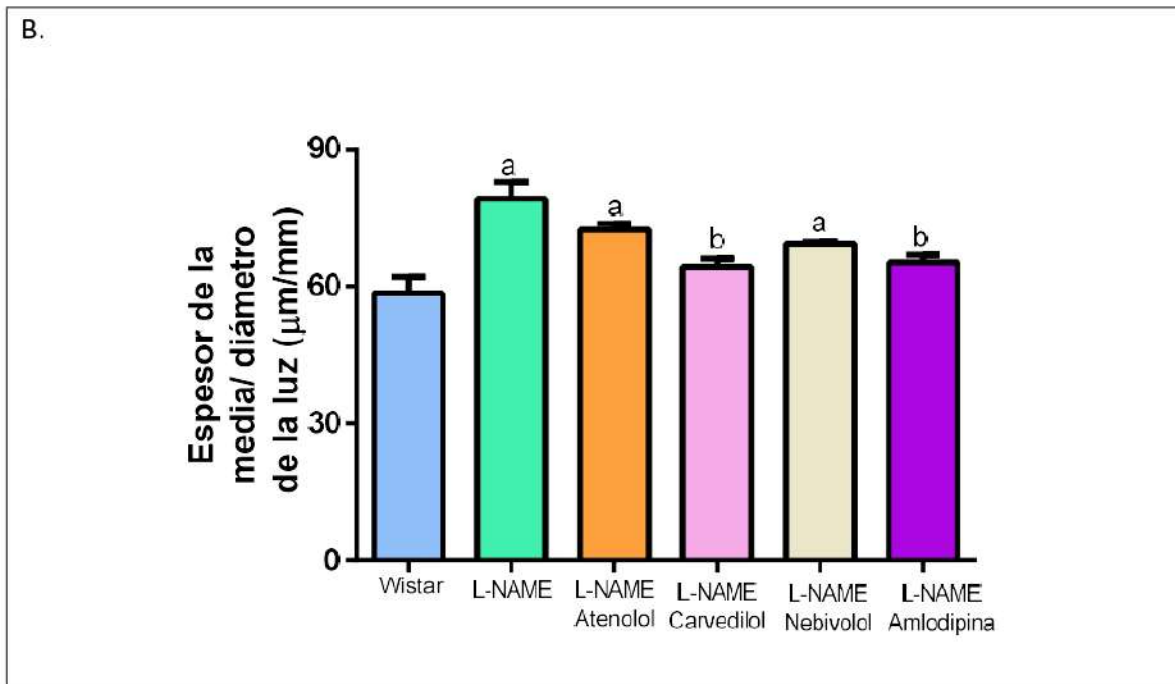
crónica de L-NAME produjo un aumento significativo del espesor de la capa media y de la relación espesor de la media/diámetro de la luz. Aunque el carvedilol, el nebivolol y la amlodipina disminuyeron el grosor de la media en relación a los animales hipertensos, únicamente el carvedilol y la amlodipina evidenciaron efecto sobre la relación existente entre el espesor de la media y el diámetro de la luz del vaso. Si bien luego de la administración de nebivolol se observa cierta tendencia en la reducción de este último parámetro morfométrico, esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa respecto de los animales hipertensos por L-NAME. El atenolol, en cambio, no presentó respuesta sobre ninguno de los parámetros morfométricos evaluados (Figura 36).

**Figura 36.** Espesor de la media aórtica (A) y relación espesor de la media aórtica/diámetro de la luz (B) de ratas Wistar e hipertensas por L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Wistar; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. L-NAME.

A.

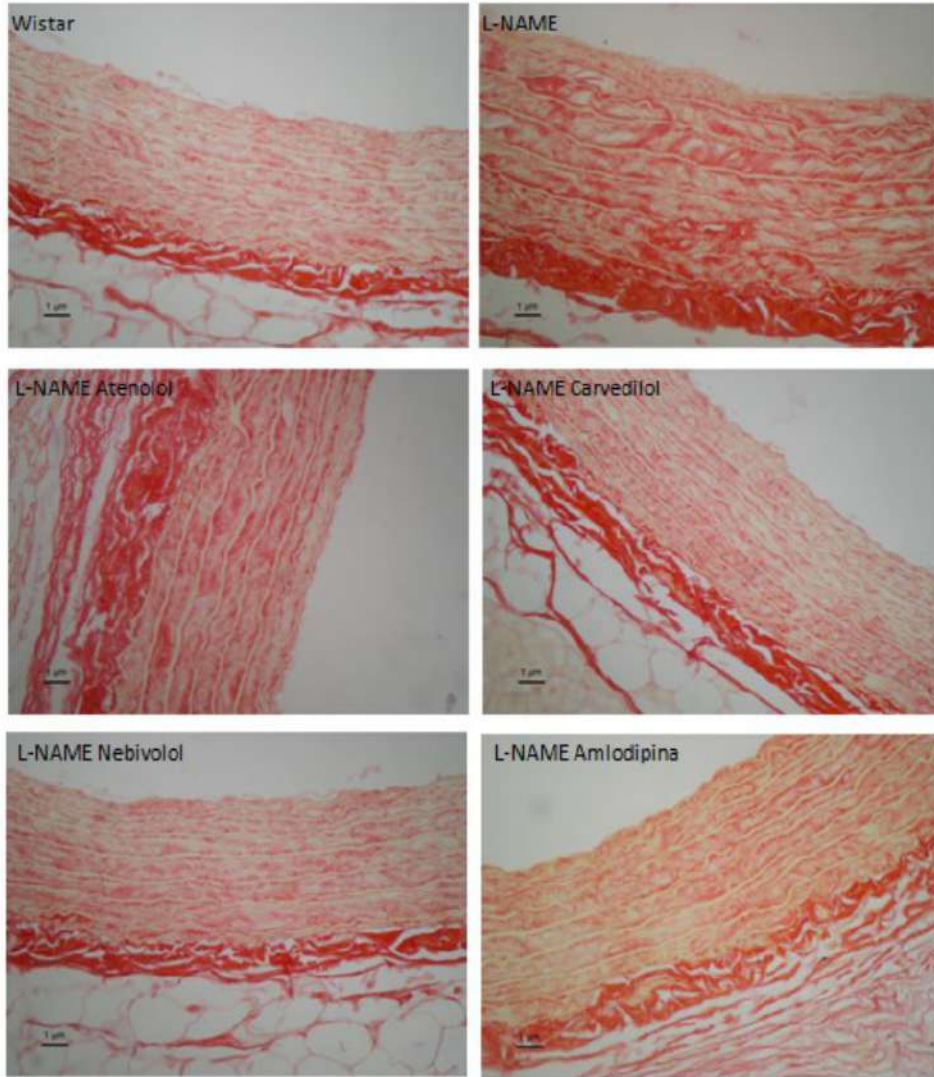






El análisis fotográfico de los anillos de aorta teñidos con sirius red permite visualizar que los animales hipertensos por L-NAME exhiben una mayor densidad de fibras de colágeno en relación a los animales Wistar control. El tratamiento con atenolol genera una leve reducción en el contenido de fibrosis, pero luego de la administración crónica de carvedilol, nebivolol y amlodipina disminuye el contenido de colágeno intersticial observándose imágenes de características similares a las ratas Wistar (**Figura 37**).

**Figura 37.** Imágenes representativas de los cortes transversales de anillos aórticos teñidos con sirius red de ratas Wistar e hipertensas por la administración de L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Las fotografías se muestran con una escala final de 400X. Barra de escala: 1  $\mu$ m.

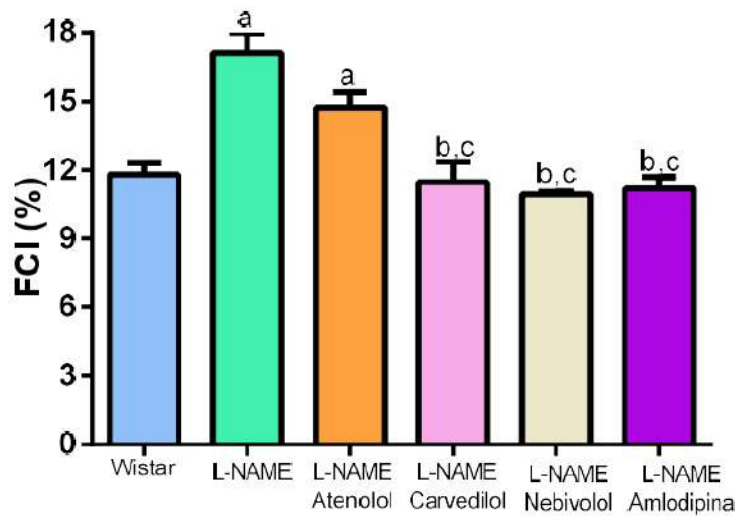


El estudio cuantitativo del contenido de colágeno intersticial a partir de la tinción con sirius red determinó un aumento del 45% de la fibrosis de la capa media aórtica de los animales hipertensos por L-NAME en relación a las ratas normotensas. El análisis de los datos sigue el mismo patrón que lo observado en el VI: aunque el atenolol mostró cierto grado de reducción del contenido de colágeno en la túnica media, dicha diferencia no llega a ser estadísticamente significativa a comparación de los animales hipertensos tratados con vehículo. Por otro lado, el nebivolol, el carvedilol y la amlodipina revirtieron completamente



esta alteración normalizando el contenido de colágeno de la arteria (**Figura 38**). El nebivolol, a diferencia de lo ocurrido en los parámetros morfométricos de hipertrofia de la aorta, presentó un efecto equiparable al carvedilol y la amlodipina. El efecto de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación resultó significativamente superior al atenolol en términos de fibrosis aórtica.

**Figura 38.** Fibrosis aórtica de ratas Wistar e hipertensas por la administración de L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media  $\pm$  EEM. <sup>a</sup>p<0,05 vs. Wistar; <sup>b</sup>p<0,05 vs. L-NAME; <sup>c</sup>p<0,05 vs. L-NAME Atenolol.



### ***Comparación de los efectos morfométricos sobre ventrículo izquierdo y aorta torácica***

El aumento de la PA inducido por la administración a largo plazo de L-NAME generó fibrosis e hipertrofia en el VI y la aorta torácica evidenciadas por las técnicas histopatológicas y morfológicas implementadas. Con respecto a las drogas estudiadas, aunque el atenolol redujo la hipertrofia macroscópica del VI, evaluada a partir de su peso y espesor, dicho efecto no se acompañó de una disminución en el área de cardiomiocitos o del contenido de colágeno. Además, el atenolol, no evidenció efecto sobre los parámetros morfométricos de la arteria aorta. Los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores y la amlodipina indujeron una reducción equiparable del IMVI, área de cardiomiocitos y contenido de colágeno intersticial. El mismo

patrón de resultados se observó en la evaluación histopatológica de daño aórtico en donde el carvedilol y la amlodipina redujeron el espesor de la media y la relación espesor de la media/diámetro de la luz mientras que el nebivolol únicamente normalizó el grosor de la capa muscular.

En su conjunto, el análisis de los resultados obtenidos en el estudio morfológico del VI y la aorta torácica muestran, en términos de daño de órgano, una mayor eficacia de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación sobre el atenolol y su efecto comparable a la amlodipina.

### ***Efecto sobre los marcadores bioquímicos de daño de órgano blanco***

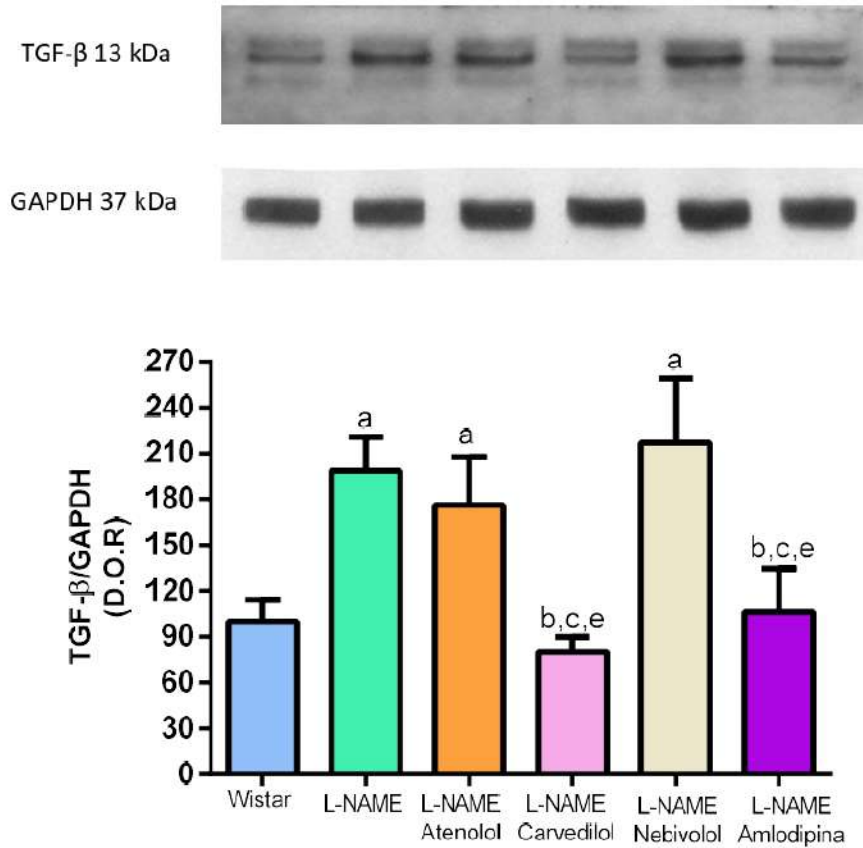
Con el objetivo de determinar el efecto de los tratamientos evaluados sobre la expresión y actividad de marcadores moleculares de inflamación y fibrosis, se realizó la determinación bioquímica del daño de órgano blanco en el VI y la aorta torácica.

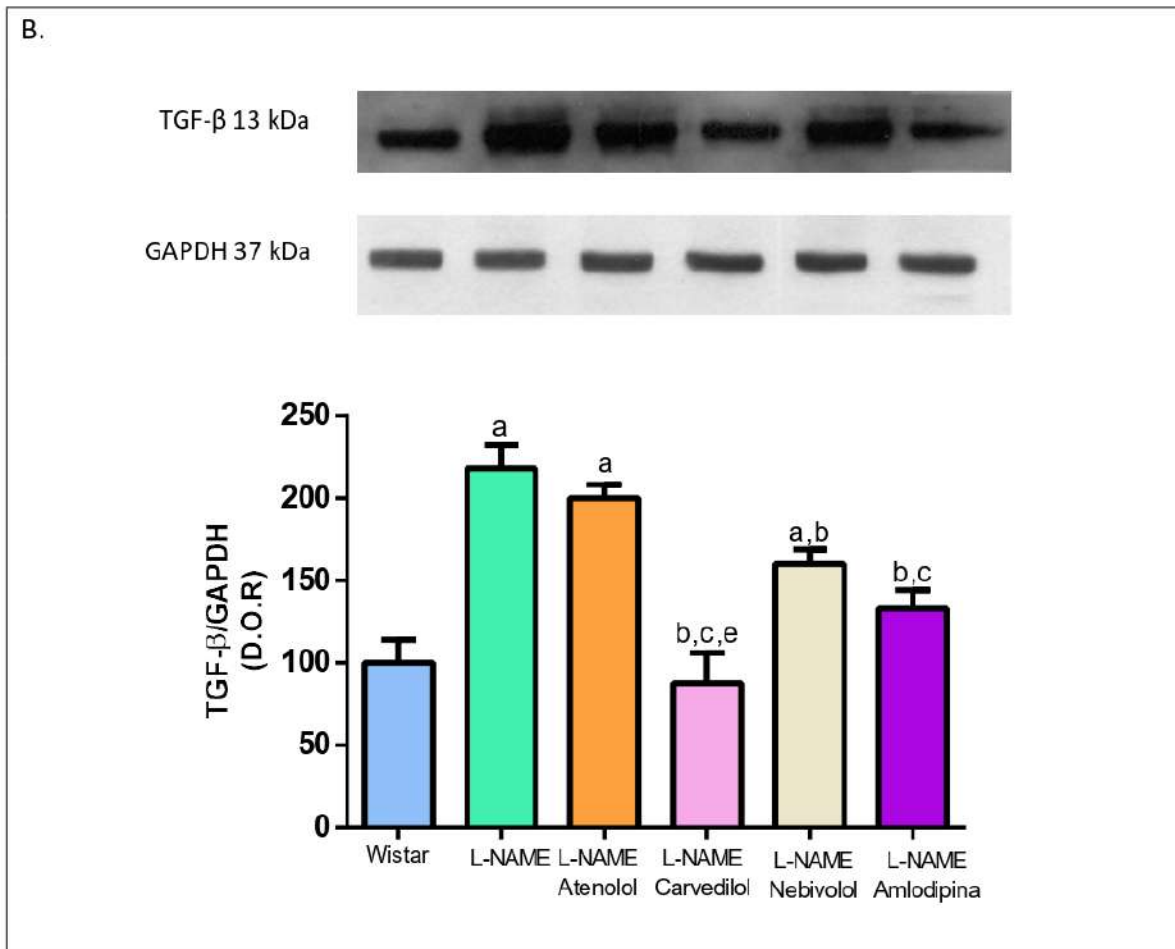
### ***Expresión de TGF- $\beta$***

A partir de la técnica de western blot se evaluaron los niveles del mediador profibrótico TGF- $\beta$  en VI y aorta torácica. El estudio de las bandas de revelado determinó que la hipertensión inducida por la administración crónica de L-NAME duplica la expresión de TGF- $\beta$  en ambos órganos estudiados ( $p < 0,05$ ). En el VI, el carvedilol y la amlodipina normalizaron completamente la expresión de dicho mediador químico, aunque el atenolol y el nebivolol no evidenciaron efecto. Al analizar las placas pertenecientes a la aorta de los grupos de animales hipertensos por L-NAME bajo distintos tratamientos, se hallaron resultados dispares. En este caso tanto los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación como la amlodipina redujeron la expresión de TGF- $\beta$  aunque de manera diversa. El nebivolol generó una disminución del TGF- $\beta$  estadísticamente significativa en relación con los animales hipertensos por L-NAME mientras que la amlodipina atenuó su expresión evidenciando una diferencia significativa a comparación de los animales hipertensos e hipertensos tratados con atenolol. Por último, el carvedilol fue la droga que presentó efecto más pronunciado ya que el descenso en la producción del TGF- $\beta$  resultó superior al atenolol, el nebivolol y la amlodipina (**Figura 39**).

**Figura 39.** Expresión de TGF- $\beta$  e imágenes representativas de las placas de revelado de western blot en VI (A) y aorta torácica (B) de ratas Wistar e hipertensas por la administración de L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales Wistar controles. <sup>a</sup>p<0,05 vs. Wistar; <sup>b</sup>p<0,05 vs. L-NAME; <sup>c</sup>p<0,05 vs. L-NAME Atenolol; <sup>e</sup>p<0,05 vs. L-NAME Nebivolol.

A.





### Expresión de TNF- $\alpha$ e IL-6

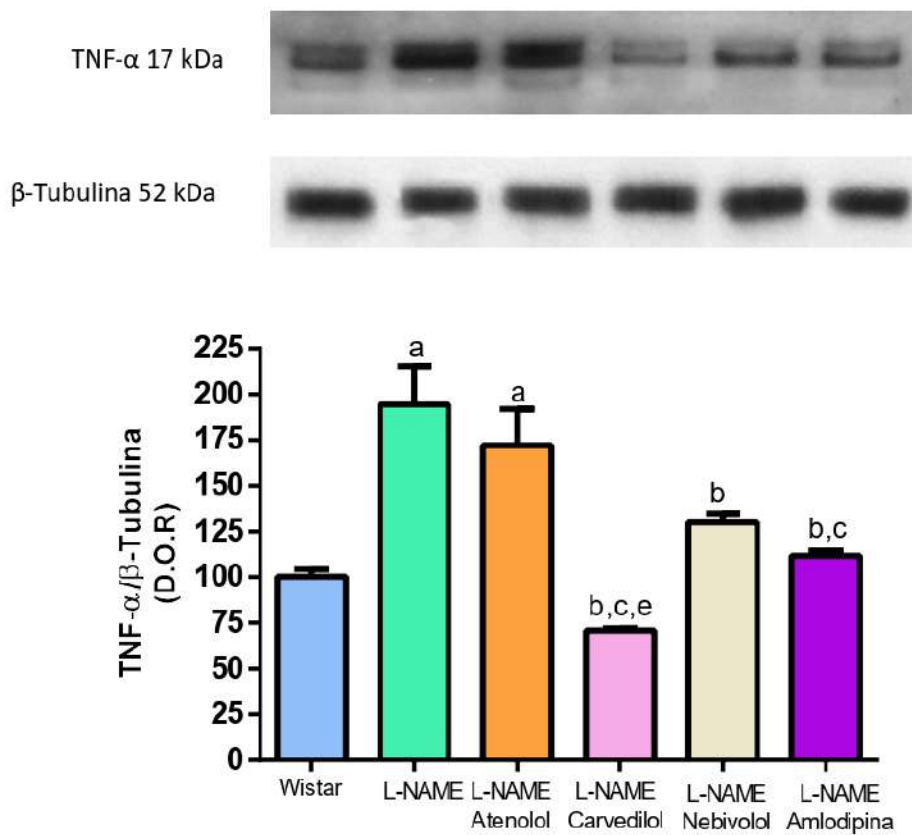
Al evaluar la expresión de las citoquinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 se obtuvieron resultados similares a los encontrados para el mediador profibrótico TGF- $\beta$ .

Para el caso del TNF- $\alpha$ , el análisis de las placas de revelado mostró un incremento en los animales hipertensos respecto de los controles Wistar normotensos (94% y 44% para VI y aorta torácica, respectivamente  $p < 0,05$ ). En el VI, la administración crónica y oral de nebivolol, carvedilol y amlodipina, pero no de atenolol, redujo significativamente la sobreexpresión de TNF- $\alpha$  en comparación de los animales L-NAME (**Figura 40**). El carvedilol fue la droga que evidenció más efecto, mostrando una disminución significativamente superior al atenolol, nebivolol y amlodipina. Se obtuvieron distintos resultados al estudiar la acción de los fármacos sobre la expresión aórtica de TNF- $\alpha$  en animales hipertensos por L-NAME. En este caso, únicamente el carvedilol y la amlodipina redujeron la sobreexpresión de este mediador inflamatorio. Mientras que el nebivolol y el atenolol no evidenciaron

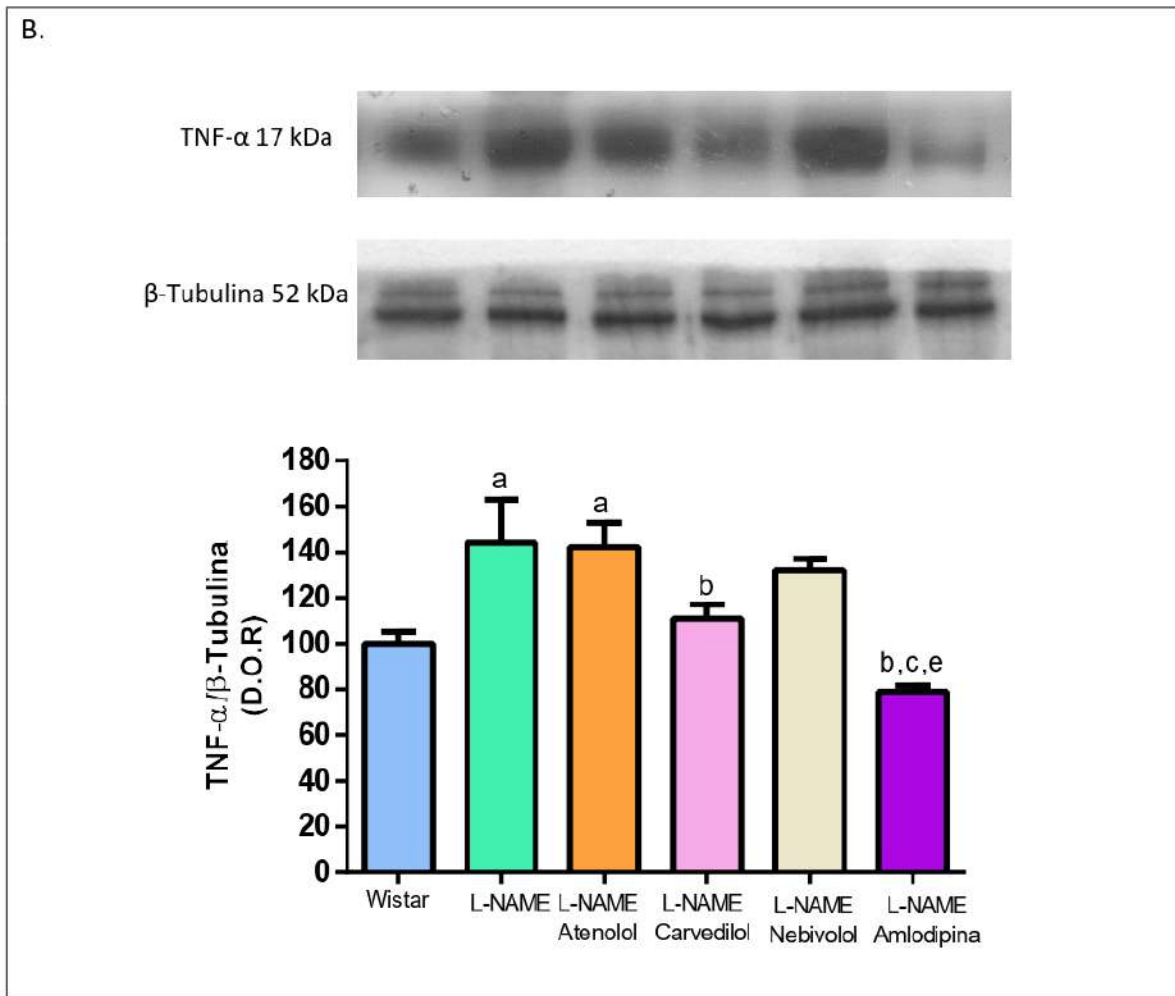
respuesta. El carvedilol presentó un efecto más pronunciado sobre el VI que sobre la aorta en donde su acción fue sobrepasada por la amlodipina.

**Figura 40.** Expresión de TNF- $\alpha$  e imágenes representativas de las placas de revelado de western blot en VI (A) y aorta torácica (B) de ratas Wistar e hipertensas por la administración de L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales Wistar controles. <sup>a</sup>p<0,05 vs. Wistar; <sup>b</sup>p<0,05 vs. L-NAME; <sup>c</sup>p<0,05 vs. L-NAME Atenolol; <sup>e</sup>p<0,05 vs. L-NAME Nebivolol.

A.





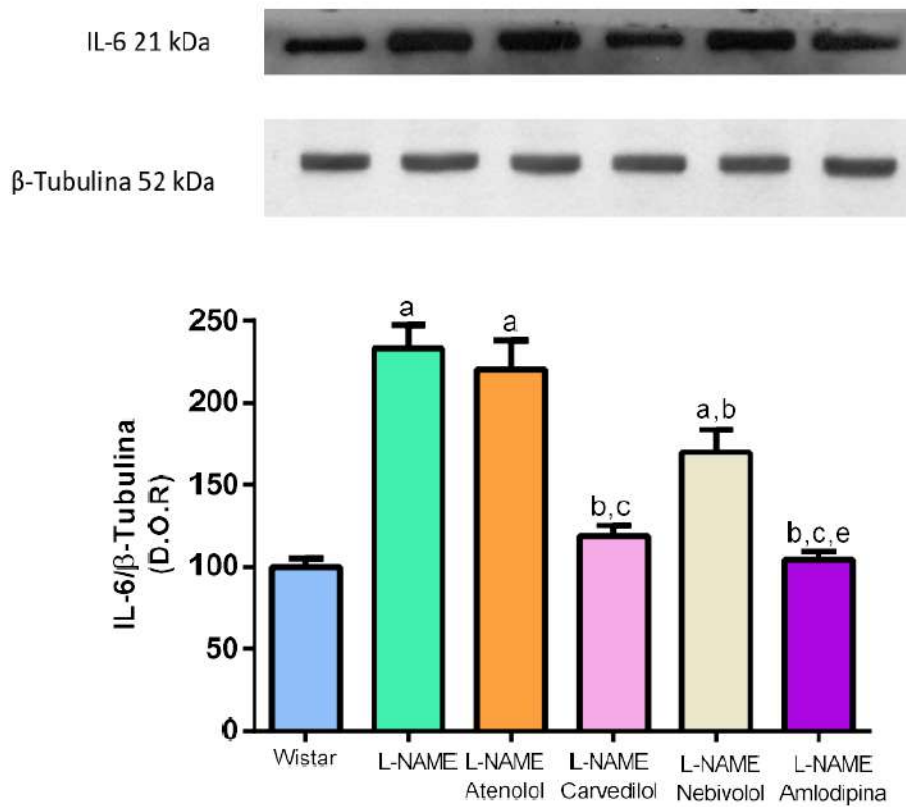


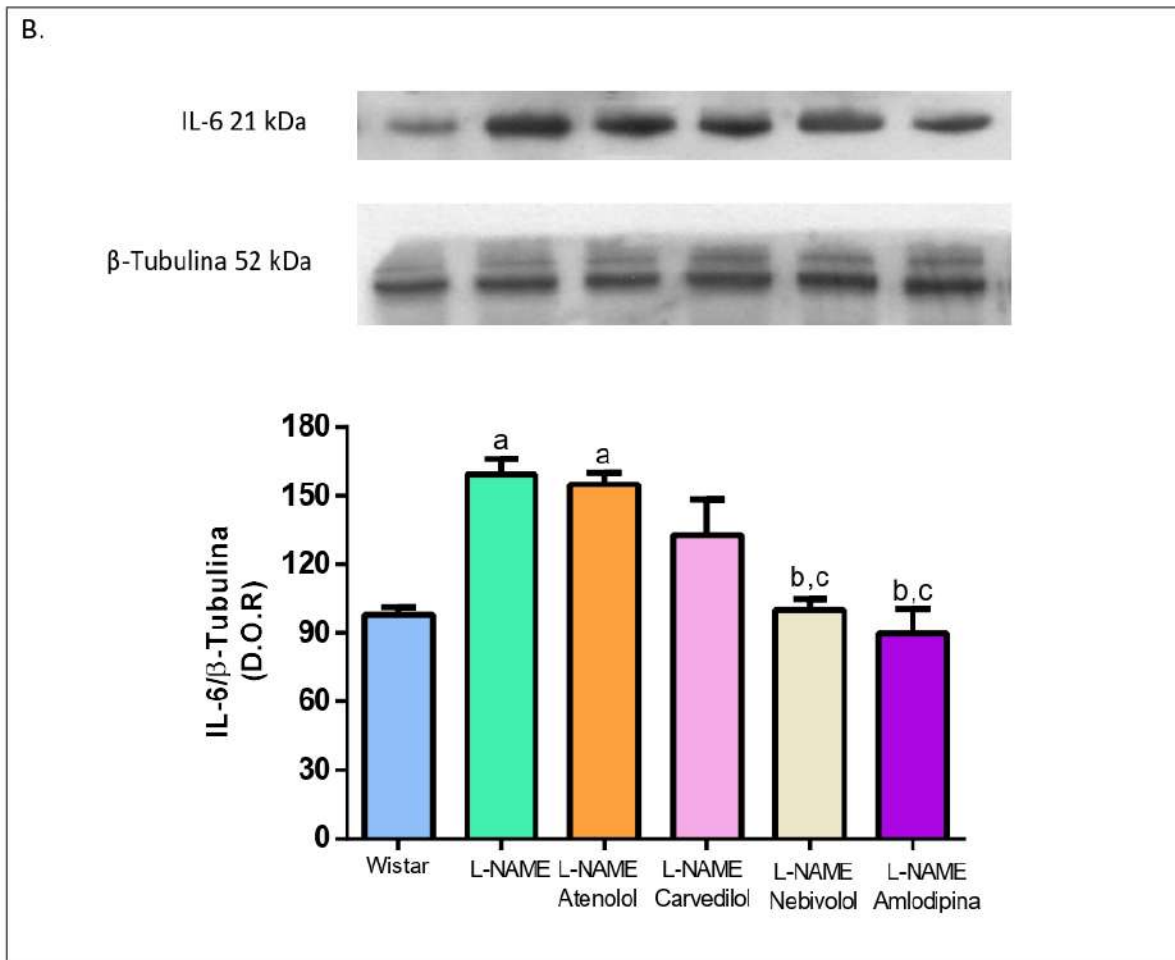
Se observó una elevación significativa de la expresión de IL-6 tanto a nivel del VI como de la aorta torácica (133% y 59%, respectivamente,  $p < 0,05$ ). En el VI, al evaluar el efecto de los tratamientos, se obtuvieron resultados similares al mediador inflamatorio TNF- $\alpha$ ; la administración crónica y oral de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico, pero no de atenolol, redujo significativamente la sobreexpresión de IL-6 en comparación con los animales L-NAME. Sin embargo, el nebivolol y la amlodipina son los fármacos que mostraron una respuesta más pronunciada llegando a normalizar los niveles de este mediador inflamatorio. En la aorta solo el nebivolol y la amlodipina disminuyeron significativamente su sobreexpresión. El carvedilol, aunque evidenció cierta reducción sobre la IL-6, la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa respecto del grupo hipertenso. El atenolol, nuevamente y al igual que para el resto de las citoquinas evaluadas, no presentó respuesta (**Figura 41**).



**Figura 41.** Expresión de IL-6 e imágenes representativas de las placas de revelado de western blot en VI (A) y aorta torácica (B) de ratas Wistar e hipertensas por la administración de L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales Wistar controles. <sup>a</sup>p<0,05 vs. Wistar; <sup>b</sup>p<0,05 vs. L-NAME; <sup>c</sup>p<0,05 vs. L-NAME Atenolol; <sup>e</sup>p<0,05 vs. L-NAME Nebivolol.

A.





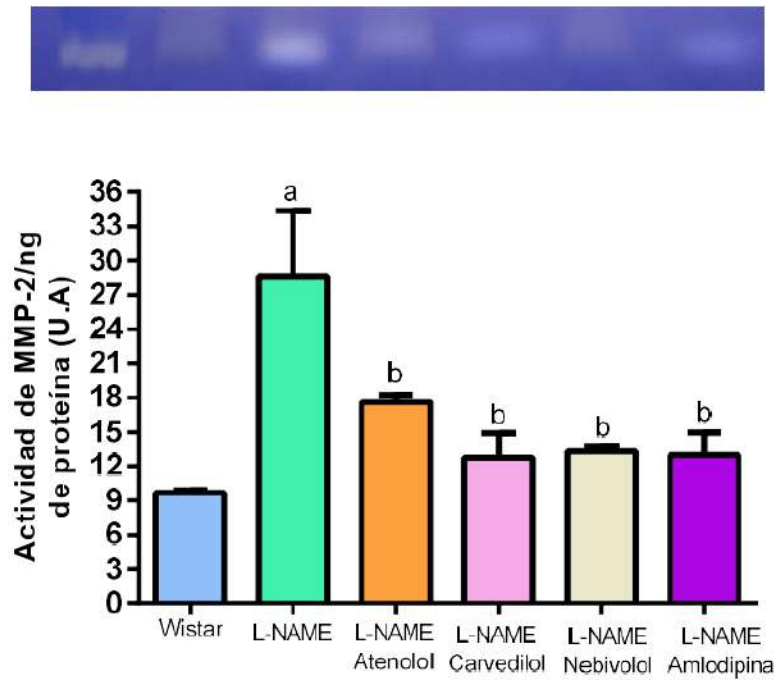
### Actividad de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9

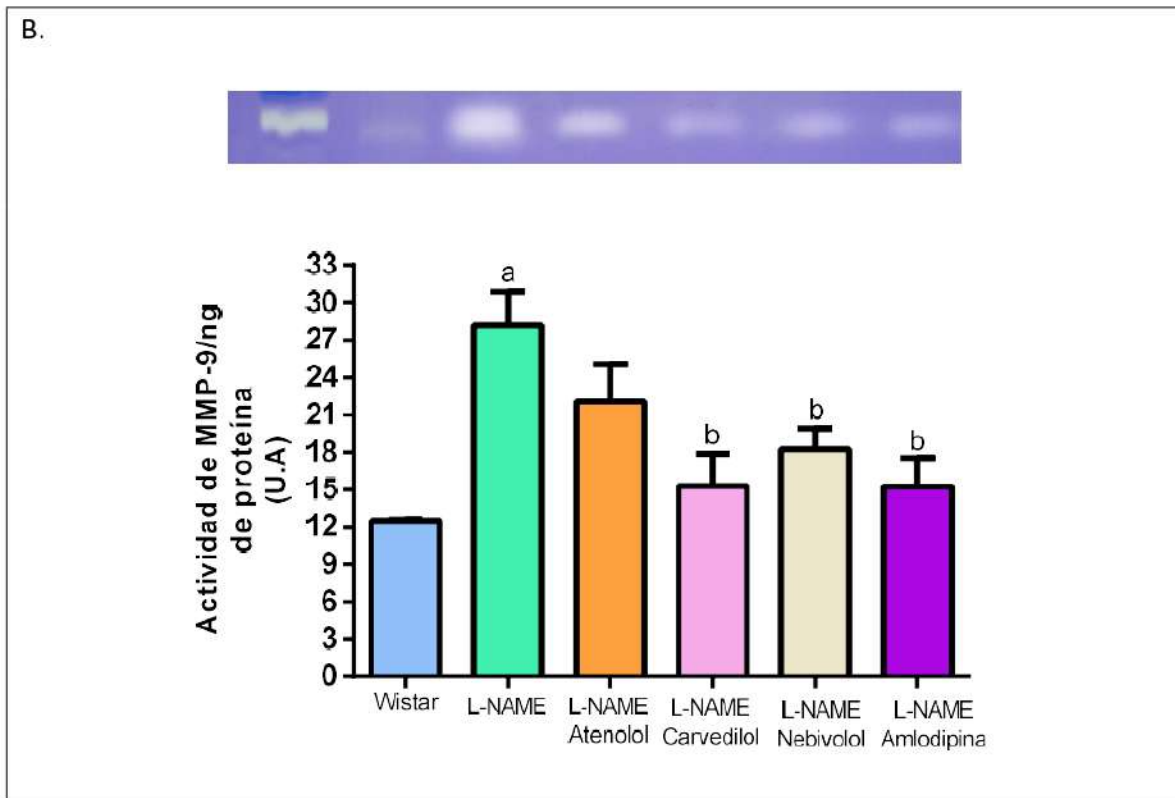
Con el objetivo de determinar el efecto de los tratamientos sobre la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9 se realizó la técnica de zimografía en gel en ambos órganos aislados.

Para el caso de la aorta torácica y en concordancia con los resultados obtenidos con la técnica de western blot para el estudio de citoquinas proinflamatorias y profibrótica, la hipertensión inducida por la administración sostenida de L-NAME aumentó significativamente la actividad de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9 en relación a las ratas Wistar normotensas. El análisis del zimograma estableció que pese a que las cuatro drogas evaluadas atenuaron el incremento de la actividad gelatinolítica de MMP-2 de las ratas hipertensas, únicamente los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico mostraron efecto sobre la isoforma 9 (Figura 42).

**Figura 42.** Actividad de MMP-2 (A) y MMP-9 (B) determinada por zimografía en aorta torácica de ratas Wistar e hipertensas por la administración de L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales Wistar controles. En las imágenes representativas del zimograma, los homogenatos fueron sembrados en el mismo orden que se muestran los resultados en los gráficos más el estándar interno de promielocito que corresponde a la primera calle. <sup>a</sup>p<0,05 vs. Wistar; <sup>b</sup>p<0,05 vs. L-NAME.

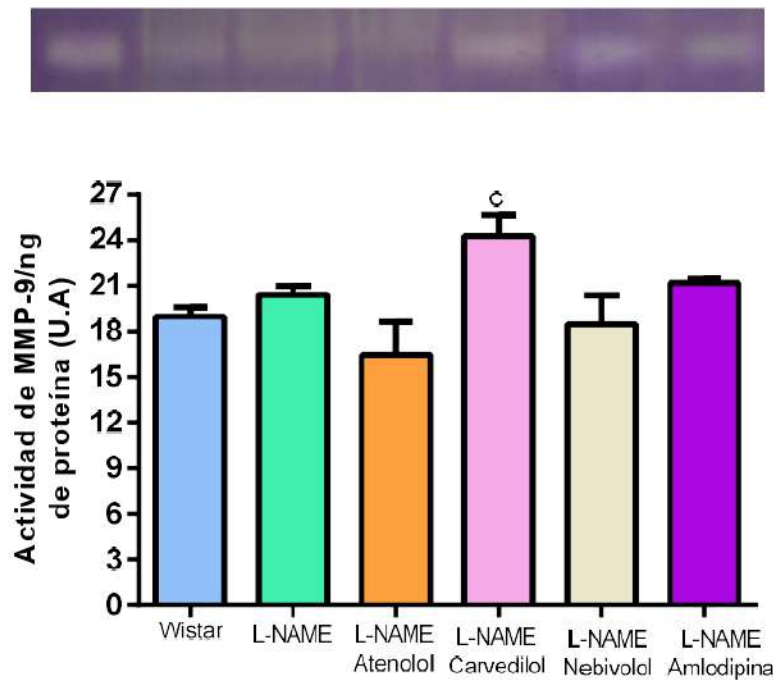
A.





Contrariamente, no se encontraron diferencias entre la actividad enzimática de MMP-9 en el VI de animales normotensos e hipertensos tratados crónicamente con vehículo, nebivolol o amlodipina, aunque se observó una diferencia significativa entre el tratamiento con atenolol y carvedilol ya que el  $\beta$ -bloqueante de segunda generación produjo cierta reducción en la actividad gelatinolítica y el carvedilol aumentó levemente dicha acción. Aunque ninguna de las drogas mostró un efecto significativamente distinto a los animales hipertensos, si se detectaron diferencias entre ambos fármacos (**Figura 43**). La actividad de la isoforma 2 no pudo determinarse en el VI debido a la sensibilidad del método.

**Figura 43.** Actividad de MMP-9 determinada por zimografía en ventrículo izquierdo de ratas Wistar e hipertensas por la administración de L-NAME tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales Wistar controles. En la imagen representativa del zimograma, los homogenatos fueron sembrados en el mismo orden que se muestran los resultados en el gráfico más el estándar interno de promielocito que corresponde a la primera calle. <sup>c</sup>p<0,05 vs. L-NAME Atenolol.



### **Correlación entre parámetros hemodinámicos y de daño de órgano blanco**

Con el objetivo de determinar la contribución relativa de los distintos parámetros hemodinámicos sobre parámetros de daño de órgano blanco se determinó el cociente de relación de Pearson para establecer la existencia de linealidad entre las variables evaluadas. Se determinó la relación existente entre la PA determinada de manera periférica y central, con sus respectivos índices de variabilidad, con algunos parámetros morfológicos de hipertrofia y fibrosis.

La **Tabla 11** muestra las relaciones encontradas entre la PA y la VPA de corto plazo con el daño morfológico o histológico de los órganos evaluados.

**Tabla 11.** Coeficiente de regresión lineal (Pearson r) entre los parámetros de presión arterial y variabilidad de presión arterial con los datos histomorfológicos de daño de órgano blanco en VI y aorta torácica en ratas hipertensas por L-NAME.

	Parámetro morfológico de daño de órgano blanco					
	Índice de hipertrofia ventricular izquierda (mg/g)	Área de cardiomiocitos ( $\mu\text{m}^2$ )	Fibrosis del ventrículo izquierdo (FCI %)	Espesor de la capa media aórtica ( $\mu\text{m}$ )	Espesor de la media/diámetro de la luz ( $\mu\text{m}/\text{mm}$ )	Fibrosis de la arteria aorta (FCI %)
PAS periférica (mmHg)	0,5081*	-0,0707	0,3433	0,5741*	0,7431*	0,2245
DE intradía de la PAS periférica (mmHg)	0,4339*	0,5098*	0,5027*	0,6865*	0,9090*	0,5875*
DE entredía de la PAS periférica (mmHg)	-0,05406	0,3541	0,4497*	0,5519*	0,6210*	0,4104*
PAS central (mmHg)	0,4506*	0,2445	0,4708*	0,5505*	0,7096*	0,4844*
DE de la PA central (mmHg)	0,0090	0,6047*	0,4771*	0,5481*	0,5398*	0,4389*
CV de la PA central (%)	0,4418*	0,5834*	0,4626*	0,4561*	0,4787*	0,5207*

\*p&lt;0,05



El análisis de regresión lineal puso en evidencia la existencia de una correlación positiva entre el IMVI con la PAS determinada directa e indirectamente, con el DE intradía de la PAS periférica y con el CV% de la PA central. Aunque el incremento en el área de cardiomiocitos se asoció positivamente solo con los parámetros de VPA de corto plazo, la fibrosis del VI mostró una relación lineal con los parámetros directos e indirectos de variabilidad y con el valor de PAS central, estableciendo el papel preponderante que desempeñan la PAS central y variabilidad de la PA frente al desarrollo de daño de órgano blanco del VI. La fibrosis de la arteria aorta expuso el mismo patrón de resultados que el contenido de colágeno del VI. Por último, el análisis morfométrico de la aorta torácica se correlacionó positivamente con la totalidad de los parámetros de PA y VPA.

## DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo de tesis fue evaluar y comparar los efectos cardiovasculares, con especial énfasis sobre la VPA, y el impacto sobre el daño de órgano blanco en el VI y la aorta torácica de los  $\beta$ -bloqueantes atenolol, carvedilol y nebivolol y del bloqueante cálcico amlodipina. Para ello se evaluaron en dos modelos experimentales de hipertensión arterial, el efecto del tratamiento oral crónico con carvedilol 30 mg/kg, nebivolol 30 mg/kg, atenolol 90 mg/kg o amlodipina 10 mg/kg sobre variables hemodinámicas y ecocardiográficas, y diferentes parámetros morfológicos, histológicos y bioquímicos de daño de órgano blanco. Los diferentes tratamientos fueron administrados por sonda gástrica o trocar una vez al día. En estudios previos de otros autores, la administración crónica de agentes antihipertensivos en modelos de hipertensión experimental fue realizada mediante la suplementación de la comida o agua de bebida, o de manera similar al trabajo de tesis, mediante la aplicación diaria a través de sonda gástrica. La elección de esta modalidad de administración se basa en la finalidad de emular el esquema posológico utilizado en el tratamiento de la hipertensión arterial en la práctica clínica diaria.

En relación a las dosis utilizadas en el presente trabajo de tesis, las mismas fueron seleccionadas en base a estudios previos realizados en roedores, en los cuales se administró un régimen crónico por vía oral utilizando una dosis de carvedilol o nebivolol entre 8 y 30 mg/kg/día, de amlodipina 10-15 mg/kg/día y de atenolol 25-100 mg/kg/día (Andrzejczak y cols., 2006; Ceron y cols., 2013; Chen y cols., 2013; Guerrero y cols., 2006; Guerrero y cols., 2003; Li y cols., 2006; Lu y cols., 2016; Ohlstein y cols., 1994; Toblli y cols., 2010; Varagic y cols., 2012; Wang y cols., 2017; Wang y cols., 2013; Wu y cols., 2007; Cosentino y cols., 2002; Nayler 1988). Por otro lado, se estudió un único nivel de dosis de los diferentes  $\beta$ -bloqueantes y de amlodipina en los modelos de hipertensión experimental. Si bien los estudios farmacológicos se caracterizan por la evaluación de varios niveles de dosis, la amplia mayoría de los estudios preclínicos realizados sobre agentes antihipertensivos han estimado los efectos hemodinámicos y cardioprotectores asociados a la administración crónica de un único nivel de dosis (referencias). Una explicación plausible es que los fármacos antihipertensivos, en las dosis utilizadas en la práctica clínica, presentan una relación dosis respuesta plana al aportar concentraciones plasmáticas y una respuesta

farmacológica en la parte superior en la meseta superior de la curva dosis respuesta (Reid y col., 1990).

La experiencia clínica ha demostrado que los bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos no vasodilatadores, entre ellos el atenolol, se asocian a una menor protección del paciente frente a eventos cardiovasculares y alteraciones metabólicas. Se ha postulado que una de las posibles causas de la escasa cardioprotección de estos agentes constituye su limitada capacidad de reducir la PA central y la VPA de corto y largo plazo. Los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación, además de sus acciones pleiotrópicas, presentan un mejor perfil farmacológico producto de su efecto vasodilatador, motivo por el cual hemos postulado que el carvedilol y el nebivolol resultarían superiores al atenolol en la disminución de aquellos factores que contribuyen al desarrollo de daño de órgano blanco, como la PA central y la VPA de corto plazo. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis se compararon los efectos antihipertensivos, cronotrópicos, de disminución de la VPA de corto plazo y acción sobre la actividad simpática vascular de carvedilol, nebivolol y atenolol en los modelos animales de hipertensión estudiados.

### ***Efecto de los fármacos sobre la presión arterial periférica y central***

El efecto de los diferentes agentes antihipertensivos sobre la presión arterial periférica y central fue evaluado de manera indirecta y directa, respectivamente. Comenzando con el carvedilol, los experimentos de la presente tesis muestran que el efecto antihipertensivo de dicho fármaco resulta similar al atenolol en los animales SHR e incluso la acción antihipertensiva periférica del atenolol es superior al carvedilol en el modelo de hipertensión inducida por el L-NAME, pero no a nivel central. La mayor eficacia del carvedilol en la reducción de la PA central se explicaría por efecto vasodilatador mediado por el antagonismo  $\alpha$ -adrenérgico.

En el caso de nebivolol, aunque mostró, al igual que el atenolol, una escasa respuesta antihipertensiva en el modelo de animales SHR, el  $\beta$ -bloqueante de tercera generación redujo en mayor medida la PA central que el atenolol. De manera similar, en la hipertensión inducida por la ingesta oral de L-NAME, si bien ambos  $\beta$ -bloqueantes redujeron la PA periférica, el efecto antihipertensivo central del nebivolol resultó superior al del atenolol.

Estos resultados serían indicadores del papel importante que cumple el efecto vasodilatador de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación en el control de la PA central.

En concordancia con los hallazgos de esta tesis, nuevos estudios sugieren que los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación presentan la capacidad de disminuir la PA central en mayor medida que los  $\beta$ -bloqueantes más antiguos, pese a reducciones similares de la PA braquial. Diversos autores incluso postulan que la terapia con  $\beta$ -bloqueantes clásicos implicaría un falso control de la PA y de protección cardiovascular. En este sentido, dos pacientes pueden presentar la misma PA braquial con atenolol o carvedilol, pero la presión central sería mayor con atenolol. Así, el subestudio CAFE evidenció que por cada 10 latidos por minuto (lpm) que reduce el atenolol, la PA central aumenta 3 mmHg (Williams y cols., 2006). Por lo tanto, el atenolol podría no presentar la misma eficacia en términos de protección cardiovascular a comparación de los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores. En un estudio retrospectivo que incluyó 328 pacientes pese a alcanzar valores de presiones braquiales equivalentes, el grupo que recibió atenolol presentó mayor presión aórtica central e índice de aumentación y menor amplificación de la onda de pulso a comparación de carvedilol o nebivolol (DiNicolantonio y cols., 2012). En un estudio realizado en 40 individuos con HTA que fueron aleatorizados a recibir atenolol 50 mg/día o nebivolol 5 mg/día durante 4 semanas, aunque ambas terapias redujeron la velocidad de la onda de pulso, el tratamiento con nebivolol redujo la presión aórtica de pulso y el índice de aumentación de manera superior al atenolol. Además, la amplificación de la onda de pulso, inversamente proporcional a la rigidez arterial, resultó significativamente aumentado con el nebivolol, pero se redujo luego de la terapia con atenolol (Fongemie y col., 2015).

La misma tendencia de resultados fue indicada en el estudio llevado a cabo por Polónia y cols (2010) quienes demostraron que, para pacientes de misma edad, sexo, presión braquial y velocidad de onda de pulso, el grupo de individuos tratados con atenolol presentó valores significativamente más elevados de PAS central en comparación con aquellos bajo tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores, carvedilol y nebivolol, o antagonistas del receptor de angiotensina. Más aún, un estudio que comparó los efectos hemodinámicos de la administración de atenolol o nebivolol en pacientes con HTA sistólica aislada y que no habían sido tratados previamente con antihipertensivos, determinó que, pese a lograr el mismo grado de reducción de PAS periférica y velocidad de propagación

aórtica, la terapia con nebivolol se asocia significativamente a menor valor de presión aórtica central e índice de aumentación (Dhakam y cols., 2008).

Hallazgos similares han sido evidenciados a nivel clínico en estudios comparativos entre nebivolol y  $\beta$ -bloqueantes de segunda generación. Gapon y colaboradores (2005) han demostrado que el tratamiento de pacientes hipertensos con nebivolol induce un control de la PA sostenido a lo largo de 24 horas e incluso dicho efecto resulta superior al atenolol porque reduce en mayor medida la variabilidad y previene la elevación matutina de la PA. Igualmente, Kampus y su grupo de investigación (2011) realizaron un ensayo en 80 pacientes hipertensos que recibieron nebivolol o metoprolol a lo largo de un año. Pese a que ambas terapias mostraron una respuesta similar en términos de efecto antihipertensivo periférico y disminución de la FC, el grupo que recibió nebivolol presentó menor PA sistólica y diastólica central, acompañado de una disminución en el espesor de la pared del VI. En su conjunto estos resultados serían indicativos de que el efecto vasodilatador del nebivolol y del carvedilol ofrece un mejor perfil hemodinámico en comparación con  $\beta$ -bloqueantes no vasodilatadores.

### ***Efecto de los fármacos sobre la variabilidad de la presión arterial de corto plazo***

Resulta ampliamente conocido el efecto deletéreo que induce el aumento de la PA sobre los órganos blanco durante la patología hipertensiva y la consecuente protección que genera su disminución. Sin embargo, el nivel de tensión arterial no es el único factor determinante para la aparición de lesión de órgano blanco y, en este contexto, numerosos estudios han establecido la importancia de la VPA en su desarrollo (Parati y col., 2001; Parati 1987; Sleight y cols., 1997; Su y col., 2005; Su y col., 2001; Xie y cols., 2006). Incluso diversas investigaciones han demostrado que la VPA afecta al órgano blanco en mayor medida que la PA misma (Su y col., 2005). Teniendo en cuenta estos antecedentes, la reducción de la VPA podría ser considerada como una nueva meta terapéutica en el tratamiento de la HTA (Schillaci y cols., 2011; Xie y cols., 2006).

En la última década se ha profundizado en el impacto que genera la VPA sobre la morbimortalidad cardiovascular de sujetos normotensos e hipertensos, ya que la fluctuación

excesiva de la PA contribuye de manera independiente en la progresión de daño de órgano blanco y el desencadenamiento de eventos cardiovasculares (Rothwell, 2011).

Para comprender la importancia fisiológica y patológica de la VPA, el estudio en animales de experimentación resulta indispensable debido a que su correcta evaluación requiere un registro intra-arterial y continuo de la PA a partir del empleo de equipos o catéteres invasivos. Por su naturaleza invasiva, resulta dificultoso la implementación de este tipo de estudios en individuos (Su, 2006). Si bien hoy en día se cuenta con numerosos instrumentos no invasivos, estos presentan un elevado costo y, además, realizan una estimación de la VPA y no una medida directa (Parati y cols., 2013). Por lo tanto, a diferencia de los humanos, el estudio en animales de experimentación permite realizar distintas intervenciones con el objetivo de estudiar directamente el nivel de VPA. Por otro lado, a nivel clínico, el daño de órgano blanco únicamente puede evaluarse de manera indirecta a partir del examen clínico o el estudio de marcadores bioquímicos en sangre, orina u otros fluidos corporales siendo la principal desventaja de estas determinaciones la incapacidad de proveer evidencia directa de los cambios ocurridos a nivel tisular o celular. Por el contrario, en los estudios preclínicos, el daño de órgano blanco puede ser valorado de manera directa y precisa a partir de ensayos histopatológicos *post mortem* (Su, 2006).

A nivel preclínico, numerosos trabajos han establecido la importancia de la VPA en el desarrollo de daño de órgano blanco en distintos modelos roedores (Su, 2006; Wang y cols., 2005; Xiey cols., 2006). Así, Miao y colaboradores (2006) demostraron que la VPA es un factor determinante y de mayor importancia que el valor promedio de PA en el desarrollo de lesión cardíaca, renal o aórtica en ratas SAD y SHR-SAD. El tratamiento estadístico de los resultados a partir de un análisis de regresión univariada evidenció coeficientes de correlación más altos y con intervalos de confianza más estrechos para los parámetros de daño de órgano blanco con la VPA que con la PA. Incluso distintos modelos animales empleados para el estudio de la HTA, como las ratas sal sensibles, 2 riñones – 1 clip e hipertensas por la administración de L-NAME, muestran niveles elevados de VPA y baja sensibilidad del barorreflejo. Dichos cambios hemodinámicos se acompañan de alteraciones estructurales a nivel cardíaco, vascular y renal con hipertrofia y fibrosis y modificaciones en la expresión de mediadores químicos tales como endotelina-1, angiotensina II y TNF- $\alpha$  (Wang y cols., 2005). Teniendo en cuenta estos antecedentes, resulta de gran importancia



enfaticar el estudio del efecto de los antihipertensivos sobre la VPA y su impacto en el daño de órgano blanco.

Las ratas SHR han sido utilizadas durante mucho tiempo como modelo para analizar diferentes aspectos de la HTA, principalmente por su similitud con la hipertensión esencial del humano. Estas semejanzas incluyen la predisposición genética al desarrollo de HTA sin etiología específica, la hiperreactividad vascular, el incremento de la resistencia periférica total, la falla cardíaca tanto diastólica como sistólica y el aumento de la fluctuación de la PA (Chan y cols., 2011; Hallbäck y col., 1977; Xie y cols., 2006). La ingesta crónica y oral de L-NAME ha sido establecida como un modelo de hipertensión experimental con disfunción diastólica caracterizado por la elevación de la PA y su variabilidad asociada a desarrollo de daño de órgano blanco (Sadek y cols., 2015; Tsuchiya y cols., 2010; Wang y cols., 2005; Zambrano y cols., 2013). Estudios previos han evidenciado que el bloqueo sostenido de la enzima óxido nítrico sintasa por la ingesta oral de L-NAME aumenta el espesor de la media aórtica, los niveles de citoquinas proinflamatorias, la expresión de TGF- $\beta$  en arterias coronarias y el espesor parietal del VI, un predictor independiente de disfunción sistólica y diastólica (Bartunek y cols., 2000; Li y cols., 2001; Li y cols., 2006; Kataoka y cols., 2004; Paulis y cols., 2008; Sadek y cols., 2015).

En los resultados del presente trabajo de tesis, a comparación de sus controles, los dos modelos experimentales de hipertensión mostraron valores basales de DE intradía de la PAS periférica, DE entredía de la PAS periférica, DE de la PA central y CV% más altos, lo que confirma que la VPA de corto y mediano plazo aumenta conjuntamente con la elevación de la PA. Sin embargo, cabe destacar que el incremento del CV% sugiere que la elevación de la VPA resulta independiente del aumento de la PA (Jiang y cols., 2017). El tratamiento oral crónico con los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores de tercera generación, nebivolol y carvedilol, atenúa de manera marcada la VPA de corto plazo en el modelo experimental SHR e hipertensas por la administración de L-NAME. El análisis en conjunto de los resultados de la medición directa e indirecta de la PA establece que el nebivolol y el carvedilol, en una dosis diaria de 30 mg/kg, son capaces de reducir de manera significativa el DE del registro de PA, un reconocido parámetro de la variabilidad de corto plazo (Parati y cols., 2013), de manera superior al  $\beta$ -bloqueante de segunda generación atenolol y equiparable al bloqueante cálcico amlodipina.

En el modelo de animales con hipertensión genética, en la determinación de la PA indirecta, si bien ninguno de los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores genera una reducción de la PAS, ambos disminuyen su fluctuación a corto plazo en mayor medida que el atenolol y en forma comparable con la amlodipina e incluso son capaces de normalizar completamente su valor. El nebivolol y el carvedilol reducen la variabilidad de la PA en mayor medida que el atenolol, sugiriendo que los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores brindan un beneficio hemodinámico mayor en comparación con los  $\beta$ -bloqueantes de segunda generación. Aunque el atenolol redujo significativamente el DE de la PA central y el CV%, su efecto fue ampliamente sobrepasado por el nebivolol, el carvedilol y la amlodipina. Más aún, el análisis de la VPA a mediano plazo, estimada a partir del DE entre días de la medición de PAS indirecta, establece que tanto el nebivolol como la amlodipina controlan la variabilidad día a día en animales SHR. El carvedilol, en cambio, aunque mostró cierta tendencia en su reducción no alcanza la significancia estadística mientras que el atenolol incrementa la estimación de la VPA de mediano plazo.

En el modelo de ratas hipertensas por la administración de L-NAME, contrariamente con los resultados obtenidos en el modelo de hipertensión genética, el atenolol no generó respuesta sobre la VPA de corto plazo determinada tanto de manera directa como indirecta, mientras que el carvedilol, el nebivolol y la amlodipina mostraron una marcada reducción del DE intradía de la PAS periférica, DE de la PA central y CV% de la PAS central. En el análisis de VPA a mediano plazo, se obtuvo la misma tendencia de resultados que para los animales SHR, en donde tanto el nebivolol como la amlodipina controlan la variabilidad entre días.

Considerando la relación directa existente entre el nivel de PA con la magnitud de la VPA de corto plazo (Wang y cols., 2005), la reducción de la VPA inducida por los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina podría ser una consecuencia indirecta del efecto hipotensor de los fármacos. Sin embargo, varios hallazgos de la presente tesis doctoral y de experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio establecen que la disminución del DE promovida por los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación es, al menos en parte, independiente de la respuesta antihipertensiva. En primer lugar, en ambos modelos experimentales, el hecho de que el nebivolol, el carvedilol y la amlodipina presenten un efecto más pronunciado sobre la VPA de corto plazo que sobre la PA establece, por un lado, que la reducción de cada uno de los parámetros es independiente entre sí y, por el otro, que las drogas resultan más efectivas para controlar la VPA que la PA misma. En segundo lugar,

estudios previos realizados en nuestro laboratorio han establecido que la administración aguda de nebivolol redujo de la PA de manera bifásica, es decir generó un rápido efecto antihipertensivo inicial seguido de la normalización de la presión y el posterior descenso tensional sostenido. Sin embargo, la disminución del DE del registro continuo de PA central resultó constante a lo largo de todo el experimento (Bertera y cols., 2014; Bertera y cols., 2012). Es decir, el efecto del nebivolol sobre la PA y su variabilidad de corto plazo mostró un curso temporal diferente. Estos resultados fueron observados en animales SHR, hipertensos por la administración de L-NAME e hipertensos por sobrecarga oral de fructosa. Finalmente, para establecer la independencia de la reducción de la VPA respecto del efecto hipotensor en ratas SAD, nuestro grupo de investigación también ha evaluado la eficacia de diferentes agentes antihipertensivos a dosis subpresoras (Bertera y cols., 2013). En este estudio, la aplicación aguda e intravenosa de una dosis baja de carvedilol (0,1 mg/kg) o nebivolol (0,3 mg/kg) indujo un marcado descenso de la VPA de corto plazo a pesar de mostrar escasos efectos sobre la PA media.

En igual sentido, en estudios previos hemos demostrado que la administración de nebivolol a bajas dosis (0,3 mg/kg) en animales hipertensos por L-NAME y en ratas normotensas induce una marcada reducción del DE del registro continuo de PA a pesar de los limitados efectos sobre el nivel de la misma. Jiang y colaboradores (2016) demostraron que la infusión continua de angiotensina II aumenta la VPA de corto plazo en ratas Wistar, un efecto en parte independiente de la elevación de la tensión arterial. De manera similar, el mismo grupo de investigación en el año 2017 estableció que, aunque la administración de hidralazina reduce únicamente la PAS sin cambios en su fluctuación, la azelnidipina reduce tanto la PAS como su VPA de corto plazo, indicando que ambos parámetros hemodinámicos constituyen entidades independientes (Jiang y cols., 2017).

Por lo tanto, teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados de la presente tesis doctoral, para un mismo grupo experimental, las diferencias existentes en los resultados obtenidos para la PA y su variabilidad establece la independencia entre dichos factores de riesgo cardiovascular (Berry y cols., 2016; Parati y cols., 2013). Actualmente, el efecto del tratamiento crónico con  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores sobre la VPA ha sido escasamente reportado en estudios preclínicos. En trabajos previos, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la administración aguda, por vía intravenosa, de nebivolol o carvedilol reduce sustancialmente la VPA de corto plazo en animales SHR, hipertensos por

la administración de L-NAME o ratas SAD (Bertera y cols., 2013; Bertera y cols., 2012; Di verniero y cols., 2010). Por otro lado, la administración crónica de carvedilol en una dosis de 2 mg/kg en animales infartados reduce significativamente la VPA de la PAS determinada de manera directa. Además, dicho efecto hemodinámico se acompañó de una disminución del IMVI (Dantas y cols., 2013).

Aunque al día de hoy no se han publicado estudios clínicos que hayan comparado directamente el efecto del tratamiento a largo plazo con carvedilol, nebivolol o atenolol sobre la VPA, existe evidencia del efecto beneficioso del nebivolol y del carvedilol sobre la VPA en pacientes con hipertensión. Gapon y colaboradores (2005) han demostrado que, aunque tanto el atenolol como el nebivolol exhiben propiedades antihipertensivas similares, el tratamiento con nebivolol previene en mayor medida que el atenolol el incremento matutino de la PA y de su variabilidad a lo largo de 24 horas en pacientes con hipertensión en estadio II. El estudio NEHIS realizado en pacientes ancianos con HTA sistólica aislada quienes recibieron tratamiento combinado con nebivolol/hidroclorotiazida o irbesartán/hidroclorotiazida durante 12 semanas demostró que tanto la PA sistólica y diastólica como la variación de la PA dentro de 24 horas, determinada tanto a partir del DE como del CV del registro indirecto de PA, resultó menor en aquellos individuos que recibieron terapia a base de nebivolol (Grassi y cols., 2017). Por otro lado, el tratamiento con 25 mg de carvedilol dos veces al día durante 3 meses atenúa el CV de la PA en pacientes con HTA moderada, mientras que la administración de 25 mg de carvedilol una vez al día durante 3 semanas reduce la VPA en pacientes ancianos con HTA leve a moderada. (Crippa y cols., 2002; Gel'tser y cols., 2001). Una limitación importante resulta el hecho de que en ninguno de estos estudios se evaluó el daño de órgano blanco y por lo tanto no puede establecerse la relación existente entre la disminución de la VPA y la lesión de órgano blanco.

### ***Efecto de los fármacos sobre la variabilidad de la presión arterial de mediano plazo***

En el trabajo de tesis también se estudió el efecto de los fármacos sobre la VPA entre días. Aunque existe meno información acerca de la relevancia de la VPA a mediano plazo que a corto plazo, su importancia radica en el hecho de que se ha demostrado que su incremento se asocia con una mayor prevalencia y gravedad del daño cardíaco, vascular y

renal, así como mayor riesgo de eventos cardiovasculares (Parati y cols., 2013). La VPA día-a-día se encuentra asociada a factores relacionados con el grado de control de la PA, la adecuada dosificación y titulación del fármaco, el cumplimiento terapéutico por parte del paciente y la vida media de eliminación de la droga (Parati y cols., 2013). Por lo tanto, la mayor capacidad del nebivolol y de la amlodipina para controlar la VPA de mediano plazo puede ser explicada teniendo en cuenta el efecto antihipertensivo sostenido que generan dichos fármacos.

Hallazgos clínicos han demostrado una mayor relación pico-valle para la PAS luego de la administración diaria de amlodipina en comparación del carvedilol y el atenolol (Flack y col., 2011; Hernández y cols., 2001; Moser y col., 1998). Por otro lado, el nebivolol es un fármaco que presenta una respuesta antihipertensiva más duradera que el carvedilol o el atenolol debido a su lenta disociación del receptor  $\beta_1$ -adrenérgico y a la presencia de metabolitos activos (Kuroedov y cols., 2004).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han establecido que la administración aguda de nebivolol en animales SHR, hipertensos por la administración de L-NAME e hipertensos por sobrecarga oral de fructosa ejerce una acción hipotensora más prolongada que el carvedilol o el atenolol. En contraposición a la rápida recuperación de los valores iniciales de PA detectada en los experimentos con carvedilol o atenolol, nebivolol ejerció una respuesta hipotensora sostenida, teniendo en cuenta que la presión arterial no retornó a los valores basales durante las 3 horas de registro continuo de tensión central (Bertera y cols., 2014; Bertera y cols., 2013; Bertera y cols., 2012,). Este tipo de respuesta hipotensora sostenida del nebivolol evidenciada tanto en estudios agudos como crónicos ha sido descrita previamente por otros autores (Van de Water y cols., 1988). Dicho patrón farmacodinámico de nebivolol contrasta con otros  $\beta$ -bloqueantes como carvedilol y atenolol. Incluso distintos estudios indican que el nebivolol presenta una relación pico-valle mayor que el carvedilol o el atenolol (Flack y col., 2011; Stoschitzky y cols., 2006; Van Neuten y col., 1998).

Varios mecanismos pueden contribuir a la eficacia hipotensora sostenida de nebivolol, incluyendo la lenta velocidad de disociación del receptor y la generación de metabolitos activos (Kuroedov y cols., 2004; Meier y cols., 2004). En consonancia con estos hallazgos, estudios clínicos han establecido que la toma oral de nebivolol una vez al día

mantiene un efecto antihipertensivo sostenido a lo largo de 24 horas (Van Bortel y cols., 2008).

### ***Efecto de los fármacos sobre la variabilidad de la presión arterial latido-a-latido***

En el presente trabajo de tesis doctoral, con el objetivo de estudiar el efecto de la administración crónica de los fármacos sobre la respuesta simpática y miogénica vascular se realizó un análisis espectral del registro continuo de la PA. Como ha sido desarrollado previamente, diversos trabajos de investigación revisados por Stauss (2007) han determinado que la identificación de los componentes de frecuencia de la VPA latido-a-latido mediante el análisis espectral del registro continuo de PA puede brindar información acerca de los mecanismos neurohumorales implicados en la regulación del nivel de tensión arterial. Así, en ratas, el NO derivado del endotelio, la función miogénica vascular y los componentes del SRA modulan el dominio VLF de la VPA latido-a-latido mientras que la variabilidad de LF se ve influenciada por la modulación simpática del tono vascular y el NO (Stauss, 2007). La normalización del dominio de VLF y LF a partir de sus respectivos cocientes (VLF/HF y LF/HF) tiende a reducir los cambios derivados de la medida absoluta. Los avances en el análisis espectral de la variabilidad latido-a-latido ha permitido validar a la relación LF/HF como marcador establecido de la actividad simpática vascular tanto en estudios preclínicos como clínicos (Fazan y cols., 2008; Souza y cols., 2008). Por otro lado, la variabilidad en el dominio HF se encontraría afectada principalmente por los cambios en el gasto cardíaco (Janssen y cols., 1995; Salman, 2015).

El análisis de la VPA latido-a-latido estableció que los dos modelos experimentales de hipertensión presentan valores más altos de los cocientes VLF/HF y LF/HF a comparación de sus controles. En concordancia con nuestros resultados, estudios previos han establecido que el bloqueo agudo de la síntesis de NO a partir de la administración de L-NAME produce un aumento de la VPA latido-a-latido al elevar el valor absoluto y normalizado del dominio LF (Gouédard y cols., 1996). De igual manera, el análisis espectral de la PA realizado en ratas SHR pone en evidencia incremento del componente LF (Bouissou-Schurtz y cols., 2015; Chaouche-Teyara 1997; Dabiré y cols., 2002). Los resultados de la presente tesis y los trabajos aquí mencionados indicarían que en los modelos animales estudiados existe un compromiso de la actividad simpática vascular en el desarrollo de la patología hipertensiva.



La investigación publicada por los autores Norman y Dzielak (1986) demostró que en la HTA desarrollada por las ratas SHR se encuentra implicada la sobreactividad simpática vascular. Por otro lado, la hipertensión inducida por el L-NAME es reducida de manera significativa luego del procedimiento de simpatectomía o bloqueo ganglionar, brindando evidencia indirecta de que el bloqueo en la síntesis de NO incrementa la actividad simpática (Augustyniak y cols., 2006; Habler y cols., 1997; Hirai y cols., 1995). De igual manera, ha sido ampliamente establecido que en los animales SHR y L-NAME la respuesta vascular miogénica se encuentra significativamente aumentada (Bertera y cols., 2014; Hughes y col., 2002; Izzard y cols., 1996; Lin y cols., 2012).

Teniendo en cuenta el efecto de las drogas sobre el análisis espectral de VPA, se encontró que tanto los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores como el bloqueante cálcico normalizarían la sobreactividad simpática vascular encontrada en los dos modelos animales de hipertensión. Este efecto probablemente sea consecuencia del antagonismo sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos por parte del carvedilol, de la acción liberadora de NO endotelial que genera el neбиволол o del bloqueo de la vasoconstricción por disminución de la disponibilidad de calcio de la amlodipina. En concordancia con los resultados obtenidos para el neбиволол, trabajos previos han descripto acciones simpaticolíticas del neбиволол las cuales estarían relacionadas con el aumento de la biodisponibilidad del NO (Chiladakis y cols., 2004; Sacco y cols., 2005).

Sacco (2005) ha encontrado que la aplicación aguda y central de neбиволол en el cerebro incrementa la liberación de NO, reduciendo de este modo la actividad del sistema nervioso simpático. Estos datos indicarían que la actividad simpaticolítica del carvedilol y neбиволол constituye un mecanismo de acción implicado en las superiores propiedades farmacodinámicas respecto de  $\beta$ -bloqueantes no vasodilatadores. Además, la reducción en la actividad simpática vascular podría estar relacionada con el mayor efecto sobre la PA central inducida por los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación. Estudios previos han demostrado que la amlodipina afecta indirectamente la variabilidad en el dominio de frecuencia LF debido a que impide la vasoconstricción adrenérgica. El bloqueo de los canales de calcio tipo L conduciría a una baja disponibilidad del ión necesario para la contracción muscular. De esta manera, la amlodipina ejerce indirectamente una disminución de la modulación simpática del tono vascular (Stauss, 2007).

Adicionalmente, la administración crónica de los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores y la amlodipina es capaz de atenuar el cociente VLF/HF, hallazgo que sugeriría una reducción del tono vascular miogénico en ambos modelos de hipertensión. Cabe destacar que en el grupo hipertenso por la administración crónica de L-NAME, el carvedilol y la amlodipina presentaron un efecto superior al nebivolol, probablemente debido a la acción reguladora, más directa, que ambas drogas generan sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  implicados en la contractilidad de las arteriolas. De esta manera, teniendo en cuenta que la función miogénica vascular requiere la libre vasoconstricción o vasodilatación de las arterias, la amlodipina al bloquear los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  implicados en la contracción vascular, afectaría a la VPA latido-a-latido en el rango de frecuencia VLF. Por su parte, el carvedilol al antagonizar a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos periféricos tendría una acción más directa sobre la contractilidad arterial en comparación con el nebivolol, motivo por el cual tendría un mayor efecto sobre el rango VLF (Hughes y col., 2002; Stauss, 2007). En su conjunto, los resultados del análisis espectral establecen que el carvedilol y el nebivolol reducen la VPA latido-a-latido de manera superior al atenolol y equiparable al bloqueante cálcico amlodipina. Por último, el incremento en la relación VLF/HF evidenciada por parte del atenolol podría ocurrir como consecuencia del bloqueo de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (Wiysonge y cols., 2017).

Aunque el efecto del carvedilol o nebivolol sobre la VPA latido-a-latido en la HTA no ha sido ampliamente estudiado, la administración crónica de carvedilol en una dosis de 2 mg/kg por vía oral en animales infartados normaliza el dominio LF (Dantas y cols., 2013). Además, la administración de carvedilol en pacientes con insuficiencia cardíaca mejora la función hemodinámica, la sensibilidad del barorreflejo y reduce la VPA latido-a-latido en el dominio LF determinada de manera no invasiva luego de 3 meses de tratamiento (Piccirillo y cols., 2000). Investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio han establecido que la administración aguda por vía intravenosa de carvedilol o nebivolol genera una reducción de los dominios VLF y LF del análisis espectral de PA en animales espontáneamente hipertensos, hipertensos por la administración de L-NAME y SAD (Bertera y cols., 2014; Bertera y cols., 2013; Bertera y cols., 2012; Di Verniero y cols., 2010). En su trabajo de revisión del año 2007, Stauss ha establecido que las catecolaminas tienen un rol relevante en la función miogénica vascular y su infusión intravenosa aumenta la actividad del dominio VLF de la VPA. De esta manera, el carvedilol y el nebivolol por su actividad simpaticolítica vascular son capaces de disminuir el tono miogénico. Por otro lado, la capacidad de los

bloqueantes cálcicos para atenuar el dominio VLF se encuentra ampliamente establecida. Sin embargo, la habilidad de este grupo de fármacos para reducir el dominio LF ha sido atribuida a la inhibición de la vasoconstricción  $\alpha_1$  mediada debido al bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  necesarios para generar la contracción muscular (Stauss, 2007). Más aún, Nobre y colaboradores (2006) encontraron que el tratamiento oral con amlodipina normaliza la elevación del componente LF de la VPA latido-a-latido en el modelo de hipertensión renal de 2 riñones – 1 clip.

En su conjunto, en términos de efecto sobre la VPA de corto plazo, mediano plazo y latido-a-latido, los bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos de tercera generación muestran propiedades farmacológicas superiores al atenolol y equiparables al bloqueante cálcico amlodipina.

### ***Efecto de los fármacos sobre marcadores bioquímicos de inflamación y fibrosis***

Un segundo objetivo de la presente tesis doctoral fue comparar el efecto del tratamiento crónico con atenolol, nebivolol, carvedilol o amlodipina sobre el daño de órgano blanco en el VI y la aorta torácica de animales SHR e hipertensos por la administración sostenida de L-NAME a partir de determinaciones de tipo ecocardiográficas, morfológicas, histológicas y bioquímicas.

En primer lugar, es bien conocido que las citoquinas inflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y la IL-6, contribuyen al daño de órgano blanco durante la HTA. Más aún, la activación del TNF- $\alpha$  es un indicador independiente del pronóstico de mortalidad en pacientes con falla cardíaca (Morillas y cols., 2012; Valgimigli y cols., 2005). A nivel clínico, el estudio PROSPER determinó que la elevación de la VPA visita-a-visita de la PAS, PAD y presión de pulso de pacientes añosos con HTA y riesgo de eventos cardiovasculares se asocia a mayor concentración sérica de IL-6 (Poortvliet y cols., 2015). Diversos estudios establecen que en los animales SHR los niveles circulantes de TNF- $\alpha$  e IL-6 se encuentran significativamente incrementados (Andrzejczak y cols., 2014; Lataro y cols., 2015). Del mismo modo, la hipertensión inducida por la ingesta de L-NAME produce un aumento de los niveles séricos de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Gonzalez y cols., 2000; Miguel-Carrasco y cols., 2008).

Para los animales hipertensos tanto genéticamente como por la administración de L-NAME el aumento en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ , así como la alteración de aquellos parámetros de remodelado cardíaco y vascular han sido ampliamente descritos por trabajos científicos anteriormente publicados (Barone y cols., 2007; Bartunek y cols., 2000;

Cardinale y cols., 2010; Guerrero y cols., 2006; Guerrero y cols., 2003; Lai y cols., 2002; Lu y cols., 2016; Madden y cols., 2016; Miao y cols., 2006; Mossad y cols., 2017; Ohlstein y cols., 1994; Phungphong y cols., 2017; Sun y cols., 2015; Wang y cols., 2017; Wang y cols., 2013). En nuestro trabajo, las ratas SHR y L-NAME presentaron un incremento significativo de la expresión de las citoquinas proinflamatorias. En ambos modelos experimentales la administración de nebivolol, carvedilol y amlodipina fue capaz de disminuir la respuesta inflamatoria evidenciada por una reducción en los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 en los dos órganos evaluados con la excepción de que en el modelo de hipertensión por L-NAME, el nebivolol no presentó respuesta sobre el TNF- $\alpha$  aórtico y además mostró escaso efecto en la determinación de dicha citoquina y la IL-6 a nivel ventricular. Contrariamente, el nebivolol redujo la expresión de los mediadores proinflamatorios en el modelo de hipertensión genética. Teniendo en cuenta el mecanismo de acción del L-NAME y el nebivolol sobre la enzima óxido nítrico sintasa, estos resultados podrían indicar que existe una posible competencia entre ambos compuestos sobre la vía del NO (Fortepiani y cols., 2002; Wang y cols., 2017).

Por otro lado, en los animales genéticamente hipertensos, aunque el tratamiento con atenolol disminuye los niveles ventriculares de IL-6, no modifica la expresión de dicha citoquina en la aorta torácica ni la de TNF- $\alpha$  en ambos órganos estudiados. Incluso, el atenolol no presentó respuesta sobre los marcadores inflamatorios en las ratas hipertensas por L-NAME. Estos datos establecen que la eficacia del atenolol para normalizar la expresión de factores proinflamatorios resulta menor en relación al resto de las drogas evaluadas. Zhang y colaboradores (2004) han demostrado que la administración durante 12 semanas de atenolol 20 mg/kg/día en ratas SAD reduce los niveles plasmáticos de TXB<sub>2</sub>, IL-1 y TNF- $\alpha$ . No obstante, la falta de eficacia del atenolol en términos de normalización de la expresión de mediadores relacionados con procesos inflamatorios y fibróticos también ha sido ampliamente reportada (Andrzejczak y cols., 2006; Wang y cols., 2017). En este contexto, el tratamiento de ratas L-NAME con atenolol o nebivolol durante 8 semanas evidenció que, aunque ambas terapias reducen la PA, la administración de nebivolol presenta un efecto antihipertensivo superior. Además, el nebivolol redujo las especies reactivas de oxígeno, no así el atenolol (Wang y cols., 2017).

Estudios previos han establecido que tanto el nebivolol como el carvedilol presentan una respuesta antiinflamatoria a nivel cardíaco en roedores (Imbaby y cols., 2014;

Li y cols., 2006). En este orden de ideas, se demostró que la activación del receptor  $\beta$ -adrenérgico aumenta la expresión de los genes de la familia de IL-6 en fibroblastos cardíacos y promueve la apoptosis inducida por LPS a través del TNF- $\alpha$  (Wang y cols., 2015; Yin y cols., 2003). Además, la incubación de fibroblastos cardíacos de ratas Sprague-Dawley con una solución de noradrenalina 10 mM aumenta 50 veces la producción cardíaca de IL-6 (Bürger y cols., 2001). Por otro lado, el bloqueo de los canales de calcio con amlodipina reduce el estado proinflamatorio asociado a la patología hipertensiva. De esta manera, la terapia por vía oral con 10 mg de amlodipina durante 4 semanas disminuye la elevación de los niveles circulantes de TNF- $\alpha$  en pacientes hipertensos. La misma tendencia de resultados ha sido observada luego del tratamiento con 15 mg/kg o 25 mg/kg de amlodipina durante 21 días en ratas SHR (Andrzejczak y cols., 2006; Fogari y cols., 2006). De manera similar, Navarro-González y colaboradores (2010) encontraron que el tratamiento de pacientes diabéticos e hipertensos con amlodipina reduce la elevación en los niveles circulantes de ciertas citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-6.

Por otro lado, el TGF- $\beta$  es una citoquina que media una amplia cantidad de procesos fibróticos y participa en el remodelado cardíaco y vascular durante la HTA (Shang y cols., 2016; Sun y cols., 2015). Recientemente diversas investigaciones preclínicas han demostrado que la elevación de la VPA de corto plazo se asocia a mayores niveles de TGF- $\beta$ . En ratas WKY el incremento de la fluctuación de la PA en el modelo SAD induce un aumento moderado del infiltrado perivascular de macrófagos, de manera similar al encontrado en animales SHR. En contraste, las ratas SHR sometidas a SAD exhiben un masivo infiltrado de macrófagos perivascular e intersticial cardíaco (Kai y cols., 2009). Estos cambios en el infiltrado inflamatorio se vieron acompañados por modificaciones en la expresión de citoquinas. Así, aunque los niveles de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y el TGF- $\beta$  resultan similares en animales WKY-sham y SHR-sham, estos se encuentran elevados en las ratas WKY-SAD y más aún en el grupo SHR-SAD, estableciendo la importancia de la VPA sobre la expresión del TGF- $\beta$ . De manera adicional, el incremento de dichos mediadores inflamatorios y fibróticos es, temporalmente, anterior al remodelado cardiovascular (Kai y cols., 2009).

En nuestro trabajo, las ratas SHR y L-NAME presentaron un incremento significativo de la expresión del TGF- $\beta$  en el VI y la aorta torácica. En ambos modelos de hipertensión, la administración de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y del bloqueante cálcico fue



capaz de disminuir la respuesta fibrótica evidenciada por una reducción en los niveles de TGF- $\beta$  de ambos órganos evaluados, nuevamente con la excepción de que en el modelo de hipertensión por L-NAME, el nebivolol no presentó efecto sobre dicha citoquina en el VI y, además, mostró menor respuesta en relación al carvedilol y la amlodipina a nivel aórtico. Contrariamente, el nebivolol redujo la expresión del TGF- $\beta$  en el modelo de hipertensión genética.

En concordancia con nuestros resultados, Ceron y colaboradores (2013) demostraron que en el modelo de hipertensión renal 2 riñones – 1 clip el nebivolol reduce, en mayor medida que el bloqueante  $\beta$ -adrenérgico de segunda generación metoprolol, la expresión del TGF- $\beta$  en la aorta torácica. En un modelo animal de síndrome metabólico, aunque la administración de atenolol y nebivolol produce una reducción equivalente de la PA, solo el nebivolol fue capaz de reducir la hipertrofia cardíaca y la sobreexpresión del TGF- $\beta$ , demostrando la superioridad de los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores por sobre el atenolol en términos de cardioprotección (Toblli y cols., 2010). Por su parte, el tratamiento con carvedilol durante 4 semanas disminuye significativamente los niveles de TGF- $\beta$  en el miocardio infartado y atenúa el contenido de hidroxiprolina, un marcador de la síntesis de colágeno, y la expresión de TGF- $\beta$  de manera superior al metoprolol (Li y cols., 2006; Wei y cols., 2000). La terapia con amlodipina reduce la sobreexpresión de TGF- $\beta$  en la aorta de animales hipertensos por L-NAME (Lai y cols., 2002).

Existe evidencia que demuestra que el aumento de especies reactivas de oxígeno puede estimular la vía del TGF- $\beta$ /Smad (Barcellos-Hoff y col., 1996; Jiang y cols., 2014). Además, la activación de la enzima NADPH oxidasa que ocurre durante el estado hipertensivo y el consecuente aumento en la producción de especies oxidantes, también participa en el efecto profibrótico del TGF- $\beta$ . En fibroblastos el TGF- $\beta$  estimula la expresión de la subunidad catalítica Nox de esta enzima y dicho aumento de la actividad de la NADPH oxidasa promueve la síntesis de distintos componentes de la matriz extracelular (Jiang y cols., 2014). Teniendo en cuenta estos antecedentes resulta importante destacar que la actividad antioxidante directa del carvedilol, del nebivolol y de la amlodipina podría contribuir en el efecto antiinflamatorio y antifibrótico que presentan dichas drogas. Estudios clínicos han demostrado que el carvedilol y el nebivolol presentan acción antiinflamatoria debido a su efecto antioxidante, ya que el aumento de especies reactivas de oxígeno genera la activación de factores de transcripción redox-sensibles que luego inducen citoquinas proinflamatorias



como el TNF- $\alpha$ , la IL-6 y las metaloproteasas (Ceron y cols., 2013; Dandona y cols., 2007). Sin embargo, existe evidencia científica que indica que el nadolol  $\beta$ -bloqueante con acción antioxidante demostrada- carece de efecto sobre mediadores inflamatorios (Dandona y cols., 2007).

### ***Efecto de los fármacos sobre el daño de órgano blanco en el ventrículo izquierdo***

En concordancia con los efectos de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación sobre los intermediarios proinflamatorios y profibrótico, dichos antihipertensivos fueron capaces de revertir el remodelado vascular y cardíaco propio de la patología hipertensiva evidenciado por hallazgos morfológicos, histológicos y ecocardiográficos.

El tratamiento crónico con carvedilol o nebivolol fue capaz de prevenir el daño de órgano en el miocardio de manera similar a la amlodipina. La reducción de la sobreexpresión de TGF- $\beta$  a nivel ventricular para los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico se acompañó de una disminución del contenido de colágeno intersticial, del área promedio de cardiomiocitos y del espesor de las paredes ventriculares. En animales SHR, numerosos estudios preclínicos demostraron el efecto cardioprotector del nebivolol y el carvedilol respecto a la reducción de la hipertrofia ventricular izquierda (Barone y cols., 2007; Guerrero y cols., 2003; Wang y cols., 2013). La administración oral crónica de bajas dosis de carvedilol (20 mg/kg/día) o nebivolol (8 mg/kg/día) disminuye significativamente la relación peso del ventrículo/peso corporal de animales SHR (Barone y cols., 2007; Ohlstein y cols., 1994). Varagic y colaboradores (2012) revelaron que el nebivolol atenúa el remodelado y la disfunción cardíaca a través de un efecto independiente de su acción antihipertensiva, mientras que otros autores sostienen que los efectos beneficiosos del nebivolol sobre el remodelado vascular no depende de la acción bloqueante  $\beta_1$ -adrenérgica (Ceron y cols., 2013). Sin embargo, la acción de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación sobre el IMVI ha sido escasamente reportada en el modelo de hipertensión por L-NAME.

Chen y colaboradores (2013) indicaron que el efecto del carvedilol sobre el remodelado cardíaco esta mediado por el NO endógeno. Así, aunque la administración de carvedilol 20 mg/kg durante 8 semanas reduce el contenido de colágeno intersticial y perivascular del VI en el modelo de hipertensión renal de 2 riñones – 1 clip, el tratamiento concomitante con L-NAME bloquea completamente su efecto. Por otro lado, existe

evidencia que indica que la reducción de la hipertrofia y la fibrosis luego del tratamiento con carvedilol o nebivolol se acompaña de la disminución en los niveles de TGF- $\beta$ . En este sentido, la reducción del IMVI y del contenido de colágeno cardíaco demostrada por el carvedilol en ratas con infarto agudo de miocardio se encuentra acompañada por una disminución en la expresión de la citoquina profibrótica TGF- $\beta$  (Li y cols., 2006). Mientras que la administración de nebivolol o atenolol reduce la PAS de ratas con síndrome metabólico, solo el nebivolol es capaz de reducir la hipertrofia cardíaca y la sobreexpresión del TGF- $\beta$  (Toblli y cols., 2010). Los efectos beneficiosos de la amlodipina sobre las alteraciones ventriculares asociadas a la hipertensión también se describieron en estudios previos. Así, el tratamiento oral crónico con amlodipina en dosis de 10 mg/kg/día fue capaz de prevenir la hipertrofia y la fibrosis cardíaca en ratas SHR (Lu y cols., 2016). Además, la amlodipina demostró su capacidad de reducir la expresión de TGF- $\beta$  en arterias coronarias de ratas tratadas crónicamente con L-NAME (Kataoka y cols., 2004).

La disminución de la hipertrofia ventricular izquierda determinada macroscópicamente y por ecocardiografía no solo es consecuencia de la reducción de la fibrosis sino también de la disminución en el área promedio de cardiomiocitos. Aunque no existe evidencia previa de la determinación del tamaño de las células cardíacas en animales SHR o L-NAME tratados con carvedilol o nebivolol, la terapia de ratones con constricción aórtica transversal con 100 mg/kg/día de celiprolol, otro  $\beta$ -bloqueante vasodilatador, disminuye significativamente el IMVI, el área de cardiomiocitos y la fibrosis intersticial y perivascular del VI. Todos estos efectos fueron bloqueados luego de la administración concomitante de L-NAME, estableciendo que la vía del óxido nítrico estaría implicada en los efectos beneficiosos de este  $\beta$ -bloqueante de tercera generación (Liao y cols., 2004). De manera similar, la terapia durante 12 semanas con amlodipina 10 mg/kg/día redujo la fibrosis intersticial y perivascular del VI y el área de miocitos cardíacos en animales SHR (Lu y cols., 2016).

En correlación con los resultados aquí presentados, el tratamiento con 80 mg/kg/día de atenolol no afecta la relación peso del VI/peso corporal de animales SHR (Wang y cols., 2016). Además, en perros con insuficiencia cardíaca, la terapia con 50 mg/día de atenolol durante 3 meses no redujo el incremento de tamaño de los cardiomiocitos hipertrofiados (Zacá y cols., 2008). Por último, ambos modelos animales presentaron el remodelado cardíaco característico de la HTA esencial e inducida por L-NAME (Doggrell y

col., 1998; Bartunek y cols., 2000). Escudero y colaboradores (2009) encontraron que el modelo de ratas SHR exhibe diferentes patrones de geometría ventricular izquierda, similares a los referidos en humanos, extendiendo las similitudes entre la hipertensión esencial humana y este modelo de HTA.

Como era de esperar, la evaluación de los parámetros morfométricos mediante ecocardiograma que realizamos en animales SHR y L-NAME confirman estos hallazgos descritos en la literatura. La evaluación ecocardiográfica de la hipertrofia del VI mostró la misma tendencia que los resultados del análisis macroscópico, ya que los animales hipertensos presentaron un aumento en el espesor de la pared posterior y anterior de dicho ventrículo tanto durante la sístole como la diástole, coincidente con la elevación del IMVI determinada a través de la relación peso del VI/peso corporal. Aunque el carvedilol fue la única droga que atenuó la totalidad de los espesores ventriculares determinados ecocardiográficamente, los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación fueron los fármacos que evidenciaron una mayor reducción de los espesores ventriculares. Existe evidencia previa que establece el efecto beneficioso de la administración de carvedilol, nebivolol y amlodipina sobre la hipertrofia ventricular determinada por estudios ecocardiográficos (Barone y cols., 2007; Cardinale y cols., 2010; Ohlstein y cols., 1994; Yamazaki y cols., 1998).

Por otro lado, el incremento en el tiempo de relajación isovolumétrica, un marcador de la relajación del VI empleado tanto en estudios preclínicos como clínicos, establece la presencia de disfunción diastólica en ambos modelos de HTA (Brown y cols., 2002). Adicionalmente a estas alteraciones de la estructura y funcionalidad ventricular, las ratas SHR presentaron una reducción de la fracción de acortamiento, indicando la existencia de disfunción sistólica mientras que las ratas L-NAME presentaron inversión del patrón de velocidades E/A, cuyo cociente fue menor a 1 ( $E/A < 1$ ) (Brown y cols., 2002).

Dichas diferencias encontradas entre ambos modelos de hipertensión experimental pueden deberse a que los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de HTA resultan distintos. A pesar de la existencia de disfunción diastólica, en ninguno de los modelos de hipertensión se vio afectado el diámetro de fin de diástole. Resultados similares habían sido obtenidos por Escudero y colaboradores (2009), en donde el análisis ecocardiográfico de animales SHR de 4 meses de edad reveló alteraciones del espesor parietal ventricular y del índice de performance miocárdica, indicador de disfunción diastólica, sin cambios en el diámetro de fin de diástole. En ratas hipertensas por L-NAME,

luego de 8 semanas de tratamiento (1 g/l en el agua de bebida), los animales mostraron reducción del índice E/A sin cambios en el cociente diámetro de fin de diástole/peso corporal (Tsukamoto y cols., 2006). De esta manera, la presencia de disfunción diastólica en los animales L-NAME y disfunción sistólica y diastólica en los animales SHR podría ser causada por el incremento de la rigidez parietal como consecuencia del mayor depósito de colágeno intersticial (Tsukamoto y cols., 2006). Además, la sobrecarga de presión y volumen ventricular producida por la rigidez parietal ocasionaría la elevación del área de cardiomiocitos con la consiguiente hipertrofia celular como mecanismo compensatorio (Carreño y cols., 2006).

En los modelos animales empleados, la hipertrofia de los cardiomiocitos es consecuencia de estímulos tanto mecánicos como neurohumorales (Carreño y cols., 2006). Sin embargo, en este remodelado ventricular no solo estaría activada la hipertrofia de los cardiomiocitos sino también su apoptosis debido a la activación de vías inflamatorias (Tsukamoto y cols., 2006).

Por otro lado, todos los fármacos restablecieron el tiempo de relajación isovolumétrica indicando su efecto positivo sobre la disfunción diastólica. Sin embargo, en los animales genéticamente hipertensos, el tratamiento con atenolol, carvedilol, nebivolol o amlodipina no permitió evidenciar cambios en el estado contráctil del VI mediante ecocardiograma. Por último, en el modelo de hipertensión por la administración sostenida de L-NAME, pese a que las cuatro drogas normalizaron la relación E/A, el carvedilol y el nebivolol presentaron un efecto significativamente superior al atenolol. Esta alteración entre la onda de llenado E y A podría ser causada por el aumento en el depósito de colágeno que conduce a la rigidez ventricular y a la falla cardíaca diastólica. En concordancia con los resultados histopatológicos obtenidos, los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación produjeron una amplia reducción de la fibrosis ventricular, siendo la misma estadísticamente superior al atenolol. Teniendo en cuenta estos datos, la disminución en el contenido de colágeno del VI de los animales hipertensos por L-NAME tratados coincide con el aumento del cociente E/A, situación que demostraría la relación existente entre la fibrosis, la rigidez ventricular y la disfunción diastólica. Cabe destacar, que, en el modelo de hipertensión genética, aunque no se observó una alteración del patrón de llenado ventricular, la administración de los  $\beta$ -bloqueantes cardiosselectivos y la amlodipina elevó aún más la relación E/A.

Los efectos beneficiosos del carvedilol, el nebivolol y la amlodipina sobre la reducción de la PA y su VPA de corto plazo, en combinación con la disminución de las citoquinas inflamatorias y el TGF- $\beta$ , promueven cambios en la estructura del VI que a largo plazo pueden evidenciarse tanto histológicamente (microscópicamente) como ecocardiográficamente (macroscópicamente) y reflejarían una mejora de la función ventricular izquierda.

### ***Efecto de los fármacos sobre el daño de órgano blanco en la aorta***

En el presente trabajo de tesis doctoral, con el objetivo de estudiar el efecto de la administración crónica de los fármacos sobre marcadores de daño de órgano blanco en la aorta torácica, se determinó la expresión de los mediadores inflamatorios TNF- $\alpha$  e IL-6, de la citoquina profibrótica TGF- $\beta$ , como así también se evaluó la actividad de las metaloproteasas de matriz y se estudió la morfometría aórtica. El tratamiento crónico con carvedilol o nebivolol fue capaz de prevenir el daño de órgano en la aorta torácica de manera similar a la amlodipina. Para los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico, la reducción de la sobreexpresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 y TGF- $\beta$  se acompañó de una disminución en la actividad de las enzimas metaloproteasas, de la fibrosis y del engrosamiento de la túnica media.

En concordancia con otros estudios científicos, la elevación de la tensión arterial en los dos modelos experimentales evaluados indujo la sobreactivación de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9 en la aorta torácica (Castro y col., 2013; Ceron y cols., 2013; Guimarães y cols., 2015; Wang y cols., 2017). El aumento sostenido de la PA sobre la pared arterial ocasiona el remodelo vascular a partir de diversos mecanismos tales como proliferación celular, migración y síntesis anormal de la MEC con cambios en su disposición espacial. En este proceso, las gelatinasas ocupan un papel esencial ya que contribuyen a la degradación y reorganización de los componentes de la MEC (Castro y col., 2013; Ceron y cols., 2013). Aunque no existen trabajos que estudien de manera simultánea la VPA y la actividad de las metaloproteasas, existe numerosa evidencia que demuestra su desbalance durante el estado hipertensivo (Castro y col., 2013; Ceron y cols., 2013; Ceron y cols., 2012; Guimarães y cols., 2015; Wang y cols., 2017). Recientemente se ha establecido que la MMP-2 desempeña un rol preponderante en el remodelado vascular que sufren las arteriolas de resistencia luego de la exposición *in vitro* a noradrenalina. Mecanísticamente, la MMP-2

degrada componentes de la MEC alrededor de las células musculares lisas de la vasculatura permitiendo su relocalización. Incluso se ha establecido que la MMP-2 puede degradar el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico en arterias mesentéricas de ratas hipertensas, esta destrucción impediría vasodilatación y favorecería la vasoconstricción asociada a la hipertensión (Castro y col., 2013).

Se encontraron discrepancias en el efecto de los fármacos sobre la actividad gelatinolítica en los distintos modelos animales estudiados. Por un lado, en la aorta torácica de los animales genéticamente hipertensos, el  $\beta$ -bloqueante de segunda generación, atenolol, no evidenció respuesta mientras que los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico disminuyeron la gelatinólisis de las metaloproteasas. En la aorta torácica de las ratas hipertensas por la administración de L-NAME, aunque el tratamiento con la totalidad de los fármacos evaluados redujo la actividad de MMP-2, solo la terapia con carvedilol, nebivolol o amlodipina afectó además a la MMP-9.

Diferentes trabajos previos han demostrado la capacidad para reducir el remodelado vascular y cardíaco del nebivolol y carvedilol a través de su efecto antioxidante e inhibidor de la actividad gelatinolítica. Teniendo en cuenta estos resultados, se encuentra demostrado que los antioxidantes pueden reducir el remodelado vascular debido a una menor activación de las metaloproteasas de matriz (Ceron y cols., 2013). Así, la terapia con nebivolol 10 mg/kg/día durante 4 semanas normaliza la sobreactividad de las gelatinasas vasculares A y B en el modelo de hipertensión renal 2 riñones – 1 clip, mientras que la administración oral y sostenida de carvedilol 20 mg/kg/día disminuye la expresión y la actividad de pro-MMP-2, MMP-2 y MMP-9 en la aorta abdominal de ratas con aterosclerosis (Ceron y cols., 2013; Wu y cols., 2007). Asimismo, experimentos *in vitro* establecieron que la aplicación de propranolol en cultivo de células musculares lisas humanas no bloquea ni la expresión ni la actividad de las gelatinasas A y B luego de la estimulación con TNF- $\alpha$ , indicando que la actividad antioxidante de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación sería responsable de su efecto inhibitorio sobre las metaloproteasas (Wu y cols., 2007). No obstante, el tratamiento a largo plazo con bloqueantes  $\beta_1$ -adrenérgicos como metoprolol y nebivolol en el modelo de hipertensión renal 2 riñones – 1 clip logró reducir la hipertrofia ventricular y la fibrosis, así como las especies reactivas de oxígeno y la actividad de MMP-2 a nivel cardíaco (Rizzi y cols., 2014). Aunque el nebivolol resultó superior al metoprolol en algunos parámetros relacionados con la protección de daño cardíaco, estos resultados



establecerían que el receptor  $\beta_1$ -adrenérgico participa en el procedimiento de fibrosis y activación de la MMP-2 durante el remodelado cardíaco (Rizzi y cols., 2014).

Por otro lado, en un estudio previo, el tratamiento oral crónico con amlodipina fue capaz de atenuar el incremento de la actividad aórtica de MMP-2 en el modelo de hipertensión renal 2 riñones – 1 clip (Marçal y cols., 2011).

Siguiendo la misma tendencia que las determinaciones bioquímicas de daño de órgano blanco en la aorta torácica, estudios previos realizados en animales SHR y L-NAME evidenciaron la capacidad del nebivolol, el carvedilol y la amlodipina de reducir el espesor y el contenido de colágeno en la túnica media mientras que el atenolol no logró reproducir los resultados beneficiosos de los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores o el bloqueante cálcico en términos de remodelado vascular (Guerrero y cols., 2006; Kataika y cols., 2004; Madden y cols., 2016; Miao y cols., 2006; Wang y cols., 2017). En concordancia con estos resultados, únicamente la administración de carvedilol, nebivolol o amlodipina logró disminuir el espesor de la capa media y de la relación espesor de la media/diámetro de la luz en ambos modelos animales estudiados. Cabe destacar que el nebivolol fue la única droga de tercera generación que no mejoró el cociente espesor de la media/diámetro de la luz de los animales hipertensos por L-NAME. De esta manera, se puede inferir que el nebivolol resultó levemente inferior que el carvedilol o la amlodipina en términos de remodelado vascular.

Los hallazgos obtenidos para el nebivolol coinciden con los resultados de la determinación de TGF- $\beta$  aórtico por western blot, en donde se evidenció una menor respuesta en relación al carvedilol y la amlodipina. No obstante, el nebivolol redujo el contenido de colágeno de la túnica media de la aorta torácica.

Teniendo en cuenta estos resultados, el aumento del estado inflamatorio inducido por la elevación de la tensión arterial y la VPA, evidenciado por la determinación de la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6, induciría la sobreactivación de las gelatinasas A y B. A su vez, estas enzimas estimularían al TGF- $\beta$  con la consiguiente hipertrofia y fibrosis de la aorta de los animales hipertensos (Guimarães y cols., 2015). Así, la reducción de la inflamación evidenciada principalmente por parte de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina evitaría la sobreactividad de las metaloproteasas y por ende del TGF- $\beta$  disminuyendo la hipertrofia y el depósito de colágeno. A nivel vascular, el tratamiento crónico con nebivolol y carvedilol fue capaz de revertir el remodelado aórtico y la sobreexpresión de TGF- $\beta$  de manera equiparable a la amlodipina y superior al atenolol. Por

último, la ausencia de respuesta de los antihipertensivos evaluados sobre la actividad gelatinolítica ventricular podría ser consecuencia de la falta de sensibilidad en la técnica zimográfica empleada. Más aún, la diferencia en la actividad enzimática observada en tejido aórtico podría ser consecuencia de su mayor concentración de metaloproteasas en relación al VI.

Al igual que lo observado en el análisis de daño de órgano blanco ventricular, los efectos beneficiosos del carvedilol, el nebivolol y la amlodipina sobre la disminución de la VPA de corto plazo en combinación con la normalización de la expresión de las citoquinas inflamatorias y el TGF- $\beta$  promueven cambios beneficiosos en la microestructura vascular los cuales pueden ser evidenciados a partir de la implementación de técnicas histológicas.

### ***Contribución relativa de la VPA y la PA periférica y central en el daño de órgano blanco***

Con el objetivo de establecer la contribución relativa de la PA y de la VPA sobre la lesión en el VI y la aorta torácica de animales SHR y L-NAME se analizó la correlación existente entre los parámetros histológicos de daño de órgano con los datos hemodinámicos de los distintos grupos animales. El análisis de regresión establece una relación positiva y estadísticamente significativa de la morfometría aórtica con la PA y su variabilidad de corto plazo.

A nivel ventricular la PAS central y periférica no se correlacionó con algunos de los parámetros evaluados. En ambos modelos animales, la hipertrofia de los cardiomiocitos resultó independiente del valor de tensión central. El índice de hipertrofia ventricular izquierda se asoció con todos los datos de PA y VPA a excepción del DE de la PA central en animales L-NAME y la PAS en la hipertensión genética. Además, en el modelo de hipertensión por la administración de L-NAME, el área de los miocitos cardíacos únicamente se correlacionó con los datos de VPA de corto plazo, mientras que en los animales SHR también existió una relación positiva con el nivel de PAS periférica y su DE de mediano plazo, indicando que para el grupo genéticamente hipertenso existe mayor grado de correlación con la PA, probablemente debido a que el valor tensional alcanzado por este grupo de animales resulta más elevado y por lo tanto influiría en mayor medida sobre el daño de

órgano. Cabe destacar que la aorta constituye una de las grandes arterias, o de capacitancia, que exhibe una amplia posibilidad de *compliance* teniendo en cuenta que debe adaptarse a

los cambios de presión para amortiguar el flujo sanguíneo pulsátil proveniente del corazón, motivo por el cual en el proceso de desarrollo de lesión resulta razonable que no solo esté implicado el valor de VPA sino también la tensión arterial misma.

Sin embargo, los datos histológicos del VI mostraron, en comparación con la aorta torácica, un menor grado de correlación con la PAS indirecta y su VPA a mediano plazo. En su conjunto, estos resultados demostrarían la importancia de la reducción no sólo de la PA sino también de la VPA de corto plazo para disminuir el daño de órgano blanco. En este contexto y con el objetivo de determinar la importancia de la VPA sobre el desarrollo de lesión de órgano, un ensayo preclínico evaluó el daño renal, cardíaco y aórtico a partir de determinaciones histológicas en animales WKY normotensos, WKY-SAD, SHR y SHR-SAD. El análisis de correlación univariado y multivariado entre los parámetros hemodinámicos y de remodelado cardiovascular estableció que la VPA resulta más importante que el valor de tensión arterial misma en la determinación de daño de órgano blanco ya que el coeficiente de correlación fue mayor y el intervalo de confianza fue menor a comparación del obtenido para la PA (Miao y cols., 2006). Xie y colaboradores (2006) describieron que el tratamiento a largo plazo con nifedipina, irbesartán o hidroclorotiazida reduce marcadamente la PA e incrementa la sensibilidad del barorreflejo, logrando una protección significativa del daño de órgano blanco en animales SHR. El grado de la VPA y de la sensibilidad del barorreflejo muestran una relación mucho más cercana al daño de órgano blanco a comparación de la PA (Xie y cols., 2006). Más aún, a nivel clínico, un meta-análisis recientemente publicado demostró una correlación positiva entre la VPA a corto plazo y el índice de masa ventricular izquierda (Madden y cols., 2016).

Estudios recientes han establecido que existen al menos cuatro mecanismos que contribuyen a la inducción del daño de órgano blanco a partir de la elevación de la VPA, incluyendo la lesión del endotelio arterial, la elevación tisular de angiotensina II, la respuesta inflamatoria y la apoptosis de cardiomiocitos (Xie y cols, 2006). Por lo tanto, la inhibición total o parcial de alguno de ellos por parte de la terapia antihipertensiva podría proteger frente a la lesión inducida por la elevación de la VPA.

La fluctuación excesiva de la tensión arterial produce cambios en la perfusión que lesiona directamente a las células endoteliales ya que su metabolismo se ve afectado negativamente. Se ha encontrado que luego de 4 semanas de ocurrida la operación de desnervación sinoaórtica, las ratas presentan daño endotelial, con signos de hinchazón,

alteraciones de la membrana plasmática, condensación de la cromatina, vacuolización citoplasmática y cambios en la expresión de la enzima NO sintasa (Su, 2006). Por otro lado, el aumento de la VPA en ratas SAD genera la elevación plasmática de angiotensina II, implicada en la lesión de órgano blanco debido al desarrollo de vasoconstricción, crecimiento y proliferación celular, hipertrofia cardiovascular, angiogénesis y aumento de la actividad simpática (Su, 2006). Distintos trabajos han establecido que la inflamación constituye otro mecanismo relacionado a la aparición de daño de órgano blanco inducido por la fluctuación de la PA (Katori 2003; Miao y cols., 2001; Shan y cols., 2001). En este contexto, el estudio en ratas sometidas SAD llevado a cabo por el grupo de investigación de Zhang determinó que la elevación de la VPA produce infiltrado inflamatorio y fibrosis en el tejido miocárdico y vascular. Además, los niveles plasmáticos de los mediadores tromboxano B<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  e IL-1 se encontraban significativamente aumentados en los animales SAD respecto a sus controles (Zhang y cols., 2003).

Aunque los mecanismos implicados en los efectos beneficiosos de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación en la reducción de la VPA de corto plazo son desconocidos, la mejora de la función endotelial y el efecto antiinflamatorio mediado por el carvedilol y el nebivolol podría contribuir en su capacidad para reducir el daño de órgano blanco asociado a la fluctuación de la PA (Bertera y cols., 2013). Sin embargo, resulta difícil dissociar el mecanismo de acción antihipertensivo de aquel responsable de la disminución de la VPA. De acuerdo con estos antecedentes, en el presente trabajo de investigación, la atenuación de la oscilación de la tensión arterial por parte de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico se vio acompañada por una disminución de los mediadores inflamatorios TNF- $\alpha$  e IL-6, lo cual se asoció a nivel aórtico, con la reducción de la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas de matriz y atenuación del TGF- $\beta$ . Todos estos cambios se sumaron a la reducción del remodelado vascular con normalización del engrosamiento de la túnica media y de la fibrosis. Por su parte el efecto antiinflamatorio y antifibrótico cardíaco también fue capaz de prevenir el remodelado ventricular evidenciado por reducción del área promedio de cardiomiocitos, de la fibrosis y mejora de la función cardíaca determinada por ecocardiografía.

Teniendo en cuenta estos datos, podemos inferir que parte de los efectos beneficiosos de los fármacos en cuestión sobre la lesión de órgano blanco se debe a su acción sobre la VPA y no sobre la PA misma ya que por un lado, los resultados obtenidos en

el análisis de regresión lineal establecen la correlación entre el daño de órgano y el nivel de VPA y por el otro los grupos de animales hipertensos tratados con atenolol, pese a que se observó una leve reducción de los valores de tensión arterial directa e indirecta, dicha acción no se acompañó de mejoras en el remodelado vascular y cardíaco propios de la hipertensión. En relación con estos resultados, diversos estudios sugieren que los antihipertensivos más efectivos en términos de control de la fluctuación de la tensión arterial son aquellos que modulan el barorreflejo y los canales de calcio.

Hoy, resulta ampliamente conocido que la acción principal del barorreflejo arterial es mantener estabilizada la PA. Durante la hipertensión, su función se afecta negativamente originando aumento de la VPA y, por lo tanto, todas aquellas drogas que modulen su respuesta reducirán la fluctuación tensional. Por otro lado, una amplia diversidad de estudios ha establecido que los bloqueantes cálcicos resultan de elevada efectividad en el control de la VPA (Su, 2006).

### ***Implicancias clínicas***

En cuanto a las implicancias clínicas de los resultados de la presente tesis, los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación, carvedilol y nebivolol, serían igualmente de efectivos que la amlodipina en la hipertensión esencial y en pacientes con disfunción endotelial. Nuestros resultados indicarían que la menor protección de daño de órgano blanco inducida por el atenolol no debe ser extrapolada a otros  $\beta$ -bloqueantes con propiedades farmacológicas adicionales. En este contexto, tres meta-análisis han demostrado que el atenolol aumenta significativamente el riesgo de ACV hemorrágico (26-30%), muerte por cualquier causa (8-13%) y muerte cardiovascular (13-26%) en comparación con otros tratamiento antihipertensivos. Cuando los  $\beta$ -bloqueantes, excluyendo al atenolol, se comparan con el resto de las terapias, este aumento de los eventos no se evidencia. Por lo tanto, el atenolol no es un fármaco capaz de representar a los bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos y no debería utilizarse para comparar la respuesta de esta clase de drogas con otros agentes antihipertensivos (Aursnes y cols., 2007; DiNicolantonio y cols., 2012). En un meta-análisis reciente, el tratamiento de pacientes con falla cardíaca con metoprolol, carvedilol o bisoprolol, mostró reducir significativamente la muerte por cualquier causa a comparación del grupo placebo (DiNicolantonio y cols., 2012). Aunque el atenolol continúa siendo el  $\beta$ -bloqueante más estudiado en términos de eficacia clínica y seguridad, existe evidencia

creciente a favor de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación, entre ellos un estudio clínico comparativo determinó que el tratamiento con nebivolol promueve una mayor reducción del IMVI en comparación con ramipril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (Cağlar y col., 2011). Teniendo en cuenta la importancia documentada que presenta la reducción de la VPA en términos de disminución de daño de órgano blanco, tanto el carvedilol como el nebivolol se presentan como una alternativa, por demás atractiva, para el tratamiento de la HTA en el humano.

### **Limitaciones**

Es importante reconocer algunas limitaciones del presente trabajo de tesis. En primer lugar, tanto la determinación directa como indirecta de la PA, se encuentra afectada por el estrés e incluso el método de tail-cuff no resulta adecuado para la cuantificación de la VPA de corto plazo (Kurtz y cols., 2005). Sin embargo, los efectos sobre este parámetro hemodinámico fueron similares a los obtenidos en el análisis directo y continuo de PA en animales canulados. Además, para reducir la influencia del estrés en la determinación periférica, los animales fueron sometidos a un entrenamiento previo durante 2 semanas. En segundo lugar, no se determinó el grado de inhibición de la enzima NOS. Estudios anteriores han demostrado la capacidad de los  $\beta$ -bloqueantes vasodilatadores para elevar la actividad de la enzima NOS. Así, el carvedilol estimula la producción de NO a través de su agonismo parcial y el nebivolol mediante la activación de los receptores  $\beta_3$  adrenérgicos (Afonso y cols., 2006; Andresen, 2011; Vanhoutte y col., 2013). Otra limitación constituye la reducida cantidad de citoquinas estudiadas con lo cual resulta dificultoso establecer los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y prevención del daño de órgano blanco. Además, tampoco se evaluaron parámetros de daño de órgano blanco a nivel cerebral o renal. Por último, teniendo en cuenta que diversos estudios farmacológicos se caracterizan por la evaluación de varios niveles de dosis, en el presente trabajo se estudiaron los efectos de los diferentes  $\beta$ -bloqueantes y de la amlodipina en un único nivel.

Por otro lado, resulta importante destacar que en el presente trabajo de investigación se estudió la VPA a partir de distintos parámetros hemodinámicos evaluados tanto de manera indirecta como directa. Además, el análisis de daño de órgano blanco se realizó a partir de su estimación por métodos histológicos, bioquímicos y ecocardiográficos permitiendo evaluar múltiples parámetros con el objetivo de visualizar alteraciones



patológicas a distintos niveles. Por último, la existencia de cuatro grupos de animales tratados por cada modelo de hipertensión permitió confrontar los hallazgos obtenidos para los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación, carvedilol y nebivolol, con sus comparadores atenolol y amlodipina.

Este trabajo de tesis doctoral deja abiertos nuevos interrogantes como, por ejemplo, cuál es el efecto de los tratamientos sobre la VPA y el daño de órgano blanco con dosis baja versus dosis alta y con un período de seguimiento más prolongado, por ejemplo, de 20 semanas. Además, sería interesante evaluar el efecto de los  $\beta$ -bloqueantes sobre un modelo combinado de hipertensión y VPA utilizando ratas SHR-SAD y también cuál sería su relación con otros marcadores de daño de órgano blanco, como por ejemplo la rigidez arterial, un factor de riesgo independiente para el desarrollo de eventos cardiovasculares. Otro aspecto importante resulta el esclarecimiento del mecanismo molecular que lleva al aumento de fibrosis de los órganos blanco de la hipertensión, puesto que su entendimiento podría dar paso a nuevas líneas terapéuticas para prevenir las complicaciones producto de la HTA y de la VPA.

## CONCLUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se propuso evaluar y comparar los efectos cardiovasculares, con especial énfasis sobre la VPA, y su posible impacto sobre el daño de órgano blanco en el VI y la aorta torácica de los  $\beta$ -bloqueantes atenolol, carvedilol y nebivolol y el bloqueante cálcico amlodipina. Los resultados obtenidos revelaron que el tratamiento oral crónico con nebivolol y carvedilol presenta efectos hemodinámicos superiores al atenolol y equiparables a la amlodipina, evidenciado por una mayor reducción de la de la VPA de corto plazo. Dicho efecto se asocia a una atenuación del daño ventricular y vascular asociado a la HTA experimental (**Tabla 12** y **Tabla 13**). Estos resultados sugieren que la menor protección cardiovascular del bloqueante  $\beta$ -adrenérgico de segunda generación atenolol en comparación a otros agentes antihipertensivos evidenciada en ensayos clínicos no debería extrapolarse a  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación, con propiedades farmacológicas adicionales como el nebivolol y el carvedilol.

**Tabla 12.** Comparación cualitativa de los resultados finales obtenidos en animales SHR luego del tratamiento crónico y oral con atenolol, nebivolol, carvedilol o amlodipina.

	$\beta$ -bloqueantes			Bloqueante cálcico
	2da. Generación	3ra. Generación		3ra. Generación
	Atenolol	Nebivolol	Carvedilol	Amlodipina
PAS Periférica	↓	↔	↔	↓↓
PAS Central	↓	↓↓	↓	↓↓
VPA Periférica	↓	↓↓	↓↓	↓↓
VPA Central	↓	↓↓	↓↓	↓↓
Hipertrofia ventricular	↔	↓↓	↓↓	↓
Área de cardiomiocitos	↔	↓↓	↓↓	↓↓
Fibrosis ventricular	↓	↓↓	↓↓	↓
Espesor aórtico	↔	↓↓	↓↓	↓↓
Fibrosis aórtica	↓	↓↓	↓↓	↓↓
Expresión de TGF- $\beta$ en VI y Aorta	↔	↓↓	↓↓	↓↓
Expresión de citoquinas proinflamatorias en VI y Aorta (TNF- $\alpha$ e IL-6)	↔	↓↓	↓	↓↓

↓ = disminución leve; ↓↓ = disminución amplia; ↔ = sin modificación

**Tabla 13.** Comparación cualitativa de los resultados finales obtenidos en animales L-NAME luego del tratamiento crónico y oral con atenolol, nebivolol, carvedilol o amlodipina.

	$\beta$ -bloqueantes			Bloqueante cálcico
	2da. Generación	3ra. Generación		3ra. Generación
	Atenolol	Nebivolol	Carvedilol	Amlodipina
PAS Periférica	↓↓	↓↓	↓	↓
PAS Central	↓	↓↓	↓	↓
VPA Periférica	↔	↓↓	↓↓	↓↓
VPA Central	↔	↓↓	↓↓	↓↓
Hipertrofia ventricular	↓	↓	↓	↓
Área de cardiomiocitos	↔	↓	↓↓	↓↓
Fibrosis ventricular	↔	↓↓	↓↓	↓
Espesor aórtico	↔	↓	↓	↓
Fibrosis aórtica	↔	↓↓	↓↓	↓↓
Expresión de TGF- $\beta$ en VI y Aorta	↔	↔	↓↓	↓↓
Expresión de citoquinas proinflamatorias en VI y Aorta (TNF- $\alpha$ e IL- 6)	↔	↓	↓↓	↓↓

↓ = disminución leve; ↓↓ = disminución amplia; ↔ = sin modificación

### PERSPECTIVAS

Los hallazgos de la presente tesis doctoral, en combinación con numerosa evidencia clínica, sugiere la importancia de un cambio en el papel de los bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos en el tratamiento de la HTA. Debido a sus acciones antihipertensivas, antiisquémicas, antiarrítmicas y cardioprotectoras, los  $\beta$ -bloqueantes representan un grupo farmacológico de gran importancia en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. No obstante, a partir de la evidencia científica que concluyó una menor eficacia en la prevención de eventos

cardiovasculares en pacientes con HTA sin complicaciones asociadas respecto de otros antihipertensivos de primera línea, los  $\beta$ -bloqueantes han sido relegados en esta indicación. Gran parte del problema de la exclusión de los  $\beta$ -bloqueantes se debe a que las revisiones sistemáticas que compararon la eficacia de este grupo respecto de otras clases de antihipertensivos incluyeron en mayor proporción ensayos clínicos realizados con el atenolol. Teniendo en cuenta estos antecedentes, la evidencia clínica y los resultados de la presente tesis doctoral sugieren que la consideración de los  $\beta$ -bloqueantes como grupo farmacológico homogéneo representa un error. Los experimentos aquí presentados han demostrado que tanto carvedilol como nebivolol son marcadamente superiores al atenolol en cuanto a la reducción de la presión arterial carotídea y la VPA de corto plazo en los modelos experimentales de hipertensión esencial y disfunción endotelial. Estas mejoras hemodinámicas están acompañadas por una reducción en el remodelado vascular y cardíaco. Además, el análisis de regresión indicaría que la reducción del daño de órgano blanco por parte de carvedilol y nebivolol se debe su efecto sobre la PA y la VPA. Considerando el panorama actual de los  $\beta$ -bloqueantes de tercera generación, resulta de gran importancia la realización de estudios clínicos que comparen directamente la eficacia y seguridad de carvedilol y nebivolol respecto de otros antihipertensivos de primera línea en la prevención de eventos cardiovasculares en pacientes con HTA no complicada.

## BIBLIOGRAFÍA

- Afonso RA, Patarrao RS, Macedo MP, Carmo MM. Carvedilol action is dependent on endogenous production of nitric oxide. *Am J Hypertens* 2006; 19: 419-25.
- Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 1981; 213: 220-2.
- Ameriso S, Aparicio L, Arnolt M, Baglivo H, Barochiner J, Barontini M y cols. Guías de la sociedad argentina de hipertensión para el diagnóstico, estudio, tratamiento y seguimiento de la hipertensión arterial. Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial 2011.
- Andresen BT. A pharmacological primer of biased agonism. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2011; 11: 92-8.
- Andrzejczak D, Górska D. The effects of celiprolol on serum concentrations of proinflammatory cytokines in hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Pharmacol Rep.* 2014; 66: 68-73.
- Andrzejczak D, Górska D, Czarnecka E. Influence of amlodipine and atenolol on lipopolysaccharide (LPS)-induced serum concentrations of TNF-alpha, IL-1, IL-6 in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Pharmacol Rep.* 2006; 58: 711-9.
- Augustyniak RA, Victor RG, Morgan DA, Zhang W. L-NAME- and ADMA-induced sympathetic neural activation in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290:R726-3.
- Aursnes I, Osnes JB, Tvette IF, Gåsemyr J, Natvig B. Does atenolol differ from other beta-adrenergic blockers? *BMC Clin Pharmacol.* 2007; 7: 4.
- Ayers K, Byrne LM, DeMatteo A, Brown NJ. Differential effects of nebivolol and metoprolol on insulin sensitivity and plasminogen activator inhibitor in the metabolic syndrome. *Hypertension.* 2012; 59: 893-8.
- Barcellos-Hoff MH, Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor beta 1. *Mol Endocrinol.* 1996; 10: 1077-1083.
- Barone FC, Willette RN, Nelson AH, Ohlstein EH, Brooks DP, Coatney RW. Carvedilol prevents and reverses hypertrophy-induced cardiac dysfunction. *Pharmacology.* 2007; 80: 166-76.
- Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S, Katz SE, Douglas PS y cols. Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation* 2000; 101:423-429.
- Berry M, Lairez O, Fourcade J, Roncalli J, Carrié D, Pathak A y cols. Prognostic value of systolic short-term blood pressure variability in systolic heart failure. *Clin Hypertens.* 2016; 12: 22-16.
- Bertera FM, Del Mauro JS, Lovera V, Chiappetta D, Polizio AH, Taira CA, Höcht C. Enantioselective pharmacokinetics and cardiovascular effects of nebivolol in L-NAME hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2014; 37: 194-201.



Bertera FM, Del Mauro JS, Lovera V, Chiappetta D, Polizio AH, Taira CA, Höcht C. Acute effects of third generation  $\beta$ -blockers on short-term and beat-to-beat blood pressure variability in sinoaortic-denervated rats. *Hypertens Res* 2013;36:349-55.

Bertera FM, Del Mauro JS, Polizio AH, Chiappetta D, Taira CA, Höcht C. Effect of nebivolol on beat-to-beat and short-term blood pressure variability in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012; 385: 833-43.

Bertera FM, Del Mauro JS, Chiappetta D, Polizio AH, Buontempo F, Taira CA y cols. Enantioselective pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of carvedilol in spontaneously hypertensive rats: focus on blood pressure variability. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012; 385:325-35.

Boggia J, Luzardo L, Lujambio I, Sottolano M y Noboa O. Hipertensión Arterial. Tomo I, Cap 6, pp: 255-324. En *Fisiopatología, Mecanismos de las disfunciones Orgánicas*. Edición 2017. FEFMUR, Montevideo, Uruguay.

Bouissou-Schurtz C, Lindesay G, Regnault V, Renet S, Safar ME, Molinie V y cols. Development of an Experimental Model to Study the Relationship Between Day-to-Day Variability in Blood Pressure and Aortic Stiffness. *Front Physiol.* 2015; 6:368.

Bravo C y Pachón R. Efecto del carvedilol sobre la variabilidad de la presión arterial. *Rev Argent Cardiol* 2015; 83: 181-182.

Brown L, Fenning A, Chan V y cols. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. *Heart Lung Circ* 2002; 11: 167-73.

Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981; 112: 195-203.

Bürger A, Benicke M, Deten A, Zimmer HG. Catecholamines stimulate interleukin-6 synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H14-21.

Cağlar N, Dincer I. Comparison between nebivolol and ramipril in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy: a randomized open blinded end-point (PROBE) trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15: 1359-68.

Cannavo A, Koch WJ. Targeting  $\beta$ 3-Adrenergic Receptors in the Heart: Selective Agonism and  $\beta$ -Blockade. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017; 69: 71-78.

Cardinale JP, Sriramula S, Pariaut R, Guggilam A, Mariappan N, Elks CM. HDAC inhibition attenuates inflammatory, hypertrophic, and hypertensive responses in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2010; 56: 437-44.

Carreño JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE. Hipertrofia cardiaca: eventos moleculares y celulares. *Rev Esp Cardiol.* 2006; 59: 473-86.

Castro, Tanus-Santos. Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. *Curr Drug Targets.* 2013; 14: 335-43.

Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol D y cols. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis*. 2008; 198: 320–331.

Ceron, Rizzi, Guimarães, Martins-Oliveira, Gerlach, Tanus-Santos. Nebivolol attenuates prooxidant and profibrotic mechanisms involving TGF- $\beta$  and MMPs, and decreases vascular remodeling in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 47-56.

Ceron CS, Rizzi E, Guimaraes DA, Martins-Oliveira A, Cau SB, Ramos J, Gerlach RF, y cols. Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. *Matrix Biol*. 2012; 31: 261-70.

Chan V, Fenning A, Hoey A, Brown L. Chronic  $\beta$ -adrenoceptor antagonist treatment controls cardiovascular remodeling in heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 58: 424-31.

Chaouche-Teyara K, Lacolley P, Challande P, Fournier B, Laurent S, Safar M y cols. Effects of clonidine and flesinoxan on blood pressure variability in conscious spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997; 30: 241-4.

Chen J, Huang C, Zhang B, Huang Q, Chen J, Xu L. The effects of carvedilol on cardiac structural remodeling: the role of endogenous nitric oxide in the activity of carvedilol. *Mol Med Rep*. 2013; 7: 1155-8.

Chiladakis JA, Georgiopoulou E, Alexopoulos D. Autonomic effects of nebivolol versus atenolol in healthy subjects. *Cardiovasc Drugs Ther* 2004; 18:469-73.

Cosentino F, Bonetti S, Rehorik R, Eto M, Werner-Felmayer G, Volpe M y cols. Nitric-oxide-mediated relaxations in salt-induced hypertension: effect of chronic beta1 -selective receptor blockade. *J Hypertens*. 2002; 20: 421-8.

Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adele S. Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol*. 1997; 29: 55-65.

Crippa G, Venturi C, Carrara G. Effect of antihypertensive treatment with carvedilol or lercanidipine on ambulatory blood pressure variability. *Am J Hypertens* 2002; 15: 50A.

Dabiré H, Lacolley P, Chaouche-Teyara K, Fournier B, Safar ME. Relationship between arterial distensibility and low-frequency power spectrum of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002; 39: 98-106.

Dahlöf B, Sever PS, Poulter NR, Wedel H, Beevers DG, Caulfield M y cols; ASCOT Investigators. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2005; 366: 895-906.

Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U y cols. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002 23; 359:995-1003.

Dantas EM, Pimentel EB, Andreão RV, Cichoni BS, Gonçalves CP, Zaniqueli Ddos A y cols. Carvedilol recovers normal blood pressure variability in rats with myocardial infarction. *Auton Neurosci*. 2013; 177: 231-6.

Delucchi A, Majul C, Vicario A, Cerezo G, Fábregue, Alcalá G y cols. Registro Nacional de Hipertensión Arterial. Características epidemiológicas de la hipertensión arterial en Argentina. Estudio RENATA 2. Sociedad Argentina de Cardiología (SAC) y Federación Argentina de Cardiología (FAC). *Revista de la Federación Argentina de Cardiología* 2017; 2, Abril/Junio.

Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I y cols. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: Comparison to necropsy findings. *The American Journal of Cardiology* 1986; 57: 450–458.

Dhakam Z, Yasmin, McEniery CM, Burton T, Brown MJ, Wilkinson IB. A comparison of atenolol and nebivolol in isolated systolic hypertension. *J Hypertens* 2008; 26: 351-6.

DiNicolantonio JJ, Lavie CJ, Fares H, Menezes AR, O'Keefe JH. Meta-analysis of carvedilol versus beta 1 selective beta-blockers (atenolol, bisoprolol, metoprolol, and nebivolol). *Am J Cardiol*. 2013; 111: 765-9.

DiNicolantonio JJ, Hackam DG. Carvedilol: a third-generation  $\beta$ -blocker should be a first-choice  $\beta$ -blocker. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2012; 10: 13-25.

Di Verniero CA, Bertera F, Buontempo F, Bernabeu E, Chiappetta D, Mayer MA y cols. Enantioselective pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of carvedilol in a N-nitro-l-arginine methyl ester rat model of secondary hypertension. *J Pharm Pharmacol*. 2010; 62:890-900.

Doggrell SA y Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovas Res*. 1998; 39: 89–105.

Dornas WC, Silva ME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci* 2011; 36: 731-7.

Elliott WJ, Childers WK. Should  $\beta$  blockers no longer be considered first-line therapy for the treatment of essential hypertension without comorbidities? *Curr Cardiol Rep*. 2011; 13: 507-16.

Erdoğan O, Ertem B, Altun A. Comparison of antihypertensive efficacy of carvedilol and nebivolol in mild-to-moderate primary hypertension: a randomized trial. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2011; 11: 310-3.

Escudero EM, Pinilla OA, Carranza VB. Análisis ecocardiográfico de la geometría ventricular izquierda en ratas espontáneamente hipertensas. *Medicina* 2009; 69: 335-340.

Eto M, Toba K, Akishita M, Kozaki K, Watanabe T, Kim S, Hashimoto M, Ako J, Iijima K, Sudoh N, Yoshizumi M, Ouchi Y. Impact of blood pressure variability on cardiovascular events in elderly patients with hypertension. *Hypertens Res*. 2005; 28: 1-7.

Fares H, Lavie CJ, Ventura HO. Vasodilating versus first-generation  $\beta$ -blockers for cardiovascular protection. *Postgrad Med.* 2012; 124: 7-15.

Fazan R Jr, Huber DA, Silva CA, Dias da Silva VJ, Salgado MC, Salgado HC. Sildenafil acts on the central nervous system increasing sympathetic activity. *J Appl Physiol* 2008; 104:1683-9.

Fergus IV, Connell KL, Ferdinand KC. A Comparison of Vasodilating and Non-vasodilating Beta-Blockers and Their Effects on Cardiometabolic Risk. *Curr Cardiol Rep.* 2015; 17: 38.

Flack JM, Nasser SA. Benefits of once-daily therapies in the treatment of hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2011; 7: 777-87.

Fogari R, Preti P, Zoppi A, Lazzari P, Corradi L, Fogari E y cols. Effects of amlodipine-atorvastatin combination on inflammation markers and insulin sensitivity in normocholesterolemic obese hypertensive patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006; 62: 817-22.

Fongemie J, Felix-Getzik E. A Review of Nebivolol Pharmacology and Clinical Evidence. *Drugs.* 2015; 75: 1349-71.

Fortepiani LA, Ortíz MC, Atucha NM, García-Estañ J. Nebivolol ameliorates nitric oxide deficient hypertension. *Scientific World Journal.* 2002; 2: 1676-84.

Frattola A, Parati G, Cuspidi C, Albini F, Mancia G. Prognostic value of 24-hour blood pressure variability. *J Hypertens.* 1993; 11: 1133-7.

Freitas FF, Araujo G, Porto ML, Freitas FP, Graceli JB, Balarini CM y cols. Increased Blood Pressure Variability Prior to Chronic Kidney Disease Exacerbates Renal Dysfunction in Rats. *Front Physiol.* 2016; 7: 428.

Gapon L, Prilepova AA, Tsygol'nik MD. Effect of nebivolol on parameters of cerebral haemodynamics and 24-hour blood pressure profile in patients with arterial hypertension. *Kardiologiya.* 2005; 45:18-22.

Gel'tser BI, Kotel'nikov VN, Volkonskaia OG, Bobyleva MV, Khitrina VV, Khludeeva EA. Clinico-functional evaluation of hypotensive effect of carvedilol in elderly patients with mild and moderate arterial hypertension. *Ter Arkh.* 2001; 73: 13-7.

Giugliano D, Acampora R, Marfella R, De Rosa N, Ziccardi P, Ragone R y cols. Metabolic and cardiovascular effects of carvedilol and atenolol in non-insulindependent diabetes mellitus and hypertension. A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 1997; 126: 955-959.

González GE, Cassaglia P, Noli Truant S, Fernández MM, Wilensky L, Volberg V y cols. Galectin-3 is essential for early wound healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Int J Cardiol* 2014; 176:1423-5.

Gonzalez W, Fontaine V, Pueyo ME, Laquay N, Messika-Zeitoun D, Philippe M y cols. Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals. *Hypertension.* 2000; 36: 103-9.

Gouédard O, Blanc J, Gaudet E, Ponchon P, Elghozi JL. Contribution of the renin-angiotensin system to short-term blood pressure variability during blockade of nitric oxide synthesis in the rat. *British Journal of Pharmacology* 1996; 119: 1085-1092.

Grassi G, Seravalle G, Brambilla G, Dell'Oro R, Trevano FQ, Fici F, van Bortel L, Mancia G. Multicenter Randomized Double-Blind Comparison of Nebivolol plus HCTZ and Irbesartan plus HCTZ in the Treatment of Isolated Systolic Hypertension in Elderly Patients: Results of the NEHIS Study. *Adv Ther.* 2017; 33: 2173-2187.

Grassi G, Bombelli M, Brambilla G, Trevano FQ, Dell'oro R, Mancia G. Total cardiovascular risk, blood pressure variability and adrenergic overdrive in hypertension: evidence, mechanisms and clinical implications. *Curr Hypertens Rep* 2012; 14: 333-338.

Guerrero E, Ardanaz N, Sevilla MA, Arévalo MA, Montero MJ. Cardiovascular effects of nebivolol in spontaneously hypertensive rats persist after treatment withdrawal. *J Hypertens.* 2006; 24: 151-8.

Guerrero E, Voces F, Ardanaz N, Montero MJ, Arévalo M, Sevilla MA. Long-term treatment with nebivolol improves arterial reactivity and reduces ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 42:348-55.

Guimarães DA, Rizzi E, Ceron CS, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Shiva S y col. Atorvastatin and sildenafil decrease vascular TGF- $\beta$  levels and MMP-2 activity and ameliorate arterial remodeling in a model of renovascular hypertension. *Redox Biol.* 2015; 6: 386-95.

Habler HJ, Wasner G, Bartsch T, Janig W. Responses of rat postganglionic sympathetic vasoconstrictor neurons following blockade of nitric oxide synthesis in vivo. *Neuroscience* 1997; 77: 899-909.

Hallböck M, Weiss L. Mechanisms of spontaneous hypertension in rats. *Med Clin North Am* 1977; 61: 593-9.

Hernández RH, Armas-Hernández MJ, Chourio JA, Armas-Padilla MC, López L, Alvarez M y cols. Comparative effects of amlodipine and nifedipine GITS during treatment and after missing two doses. *Blood Press Monit* 2001; 6:47-57.

Hirai T, Musch TI, Morgan DA, Kregel KC, Claassen DE, Pickar JG y cols. Differential sympathetic nerve responses to nitric oxide synthase inhibition in anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1995; 269: R807-R813.

Höcht C, Bertera FM, Del Mauro JS, Taira CA. Models for evaluating the pharmacokinetics and pharmacodynamics for  $\beta$ -blockers. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014; 10: 525-41.

Höcht C. Blood Pressure Variability: Prognostic Value and Therapeutic Implications. *ISRN Hypertension* 2013, ID 398485.

Hughes JM, Bund SJ. Arterial myogenic properties of the spontaneously hypertensive rat. *Exp Physiol.* 2002; 87: 527-34.

Hypertension in adults: diagnosis and management. NICE Guideline 2013.

Hypertension in adults: diagnosis and management. NICE Guideline 2006.

Ibañez, Torales. Farmacología de la hipertensión arterial: Introducción, fisiopatología, clasificación de hipertensión arterial, agentes antihipertensivos, clasificación, terapéutica



antihipertensiva, emergencias y urgencias hipertensivas. Capítulo 13 del libro Farmacología Medica de Malgor y Valsecia. Universidad Nacional del Noereste (UNNE).

Imbaby S, Ewais M, Essawy S, Farag N. Cardioprotective effects of curcumin and nebivolol against doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2014; 33: 800-13.

Iriuchijima J. Sympathetic discharge rate in spontaneously hypertensive rats. *Jpn Heart J* 14: 350, 1973.

Izzard AS, Bund SJ, Heagerty AM. Myogenic tone in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1996; 270: H1-6.

James GD. Understanding Blood Pressure Variation and Variability: Biological Importance and Clinical Significance. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 956: 3-19.

James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J y cols. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014; 311: 507-20.

Janssen BJ, Oosting J, Slaaf DW, Persson PB, Struijker-Boudier HA. Hemodynamic basis of oscillations in systemic arterial pressure in conscious rats. *Am J Physiol* 1995; 269: H62-H71.

Jensen EC. The basics of western blotting. *Anat Rec (Hoboken)* 2012; 295: 369-71.

Jiang D, Kawagoe Y, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J. Inhibitory effects of losartan and azelnidipine on augmentation of blood pressure variability induced by angiotensin II in rats. *European Journal of Pharmacology* 2017; 806: 91-95.

Jiang D, Tokashiki M, Hayashi H, Kawagoe Y, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J. Augmented blood pressure variability in hypertension induced by angiotensin II in rats. *Am J Hypertens*. 2016; 29: 163-9.

Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- $\beta$  mediated fibrotic responses. *Redox Biology*. 2014; 2: 267-272.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical J*. 1979; 11: 447-455.

Kai H, Kudo H, Takayama N, Yasuoka S, Kajimoto H, Imaizumi T. Large blood pressure variability and hypertensive cardiac remodeling--role of cardiac inflammation. *Circ J*. 2009; 73: 2198-203.

Kampus P, Serg M, Kals J, Zagura M, Muda P, Karu K, Zilmer M, Eha J. Differential effects of nebivolol and metoprolol on central aortic pressure and left ventricular wall thickness. *Hypertension* 2011 ;57 :1122-8.

Kataoka C, Egashira K, Ishibashi M, Inoue S, Ni W, Hiasa K y cols. Novel anti-inflammatory actions of amlodipine in a rat model of arteriosclerosis induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:H768-774.



Katori M. Do studies on a sinoaortic denervation model give a clue to the mechanisms of cardiovascular and renal damage in hypertension? *J Hypertens.* 2003; 21: 2019-21.

Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005; 365: 217-223.

Khan NA, McAlister FA, Rabkin SW, Padwal R, Feldman RD, Campbell NR; Canadian Hypertension Education Program. The 2006 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: Part II - Therapy. *Can J Cardiol.* 2006; 22: 583-93.

Kostapanos M, McEniery CM, Wilkinson IB. Clinical relevance of central blood pressure - a critical review. *Vasa.* 2016; 45: 451-460.

Kolb B, Rotella DL, Stauss HM. Frequency response characteristics of cerebral blood flow autoregulation in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H432-8.

Houle SK, Padwal R, Poirier L, Tsuyuki RT. The 2015 Canadian Hypertension Education Program (CHEP) guidelines for pharmacists: An update. *Can Pharm J (Ott).* 2015; 148: 180-6.

Krause T, Lovibond K, Caulfield M, McCormack T, Williams B; Guideline Development Group. Management of hypertension: summary of NICE guidance. *BMJ.* 2011; 343: d4891.

Kudo H, Kai H, Kajimoto H, Koga M, Takayama N, Mori T y cols. Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II system-mediated chronic inflammation. *Hypertension.* 2009; 54: 832-8.

Kuroedov A, Cosentino F, Lüscher TF. Pharmacological mechanisms of clinically favorable properties of a selective beta1-adrenoceptor antagonist, nebivolol. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22:155-68.

Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE; Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 2: Blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the American Heart Association council on high blood pressure research. *Hypertension* 2005; 45:299-310.

Kuyper LM, Khan NA. Atenolol vs non atenolol  $\beta$ -blockers for the treatment of hypertension: a meta-analysis. *Can J Cardiol.* 2014; 30: S47-53.

Lai YM, Fukuda N, Su JZ, Suzuki R, Ikeda Y, Takagi H y cols. Novel mechanisms of the antiproliferative effects of amlodipine in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2002; 25: 109-15.

Lataro RM, Silva CA, Tefé-Silva C, Prado CM, Salgado HC. Acetylcholinesterase Inhibition Attenuates the Development of Hypertension and Inflammation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens.* 2015; 28:1201-8.

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet.* 2002; 360: 1903-13.

Li B, Yang Z, Lei S, Su J, Pang M, Yin C y cols. Beneficial Effects of Paeoniflorin Enriched Extract on Blood Pressure Variability and Target Organ Damage in Spontaneously Hypertensive Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017; 2017: 5816960.

Li B, Liao YH, Cheng X, Ge H, Guo H, Wang M. Effects of carvedilol on cardiac cytokines expression and remodeling in rat with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2006; 111:247-255.

Li L, Shigematsu Y, Hamada M, Hiwada K. Relative wall thickness is an independent predictor of left ventricular systolic and diastolic dysfunctions in essential hypertension. *Hypertens Res* 2001; 24:493-499.

Liao Y, Asakura M, Takashima S, Ogai A, Asano Y, Shintani Y y cols. Celiprolol, a vasodilatory beta-blocker, inhibits pressure overload-induced cardiac hypertrophy and prevents the transition to heart failure via nitric oxide-dependent mechanisms in mice. *Circulation*. 2004; 110: 692-9.

Lin LJ, Tang FK, Hua N, Lu H, Di CX, Tang XZ y col. Time-course changes of myogenic tone of mesenteric small artery in spontaneously hypertensive rat. *Sheng Li Xue Bao*. 2012; 64: 62-8.

Lindholm LH, Carlberg B, Samuelsson O. Should beta blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. *Lancet*. 2005; 366: 1545-53.

Lowe MD, Lynham JA, Grace AA, Kaumann AJ. Comparison of the affinity of beta-blockers for two states of the beta 1-adrenoceptor in ferret ventricular myocardium. *Br J Pharmacol*. 2002; 135: 451-61.

Lowry Oh, Rosebrough Nj, Farr Al, Randall Rj. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

Lu J, Liu F, Liu D, Du H, Hao J, Yang X y cols. Amlodipine and atorvastatin improved hypertensive cardiac hypertrophy through regulation of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/receptor activator of nuclear factor kappa B/osteoprotegerin system in spontaneous hypertension rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016; 241 :1237-49.

Maack C, Tyroller S, Schnabel P, Cremers B, Dabew E, Südkamp M y cols. Characterization of  $\beta$ 1-selectivity, adrenoceptor-Gs-protein interaction and inverse agonism of nebivolol in human myocardium. *Br J Pharmacol*. 2001; 132: 1817–1826.

Madden JM, O'Flynn AM, Fitzgerald AP, Kearney PM. Correlation between short-term blood pressure variability and left-ventricular mass index: a meta-analysis. *Hypertens Res* 2016; 39: 171-177.

Majul C, Marin M, Bendersky M, Rodríguez P, Díaz M, Orías M y cols. Consenso Argentino sobre Hipertensión Arterial. *Revista argentina de Cardiología*, 2013; 81.

Mann SJ. Redefining beta-blocker use in hypertension: selecting the right beta-blocker and the right patient. *J Am Soc Hypertens*. 2017; 11: 54-65.

Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M y cols. Guía de práctica clínica de la ESH/ESC 2013 para el manejo de la hipertensión arterial. *Rev Esp Cardiol*. 2013; 66: e1-e64.

Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Burnier M, Caulfield MJ y cols. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *Blood Press*. 2009; 18: 308-347

Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G y cols. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2007; 28: 1462-536.

Mancia G, Ferrari A, Gregorini L, Parati G, Pomidossi G, Bertinieri G, Grassi G, di Rienzo M, Pedotti A, Zanchetti A. Blood pressure and heart rate variabilities in normotensive and hypertensive human beings. *Circ Res*. 1983; 53: 96-104.

Marçal DM, Rizzi E, Martins-Oliveira A, Ceron CS, Guimaraes DA, Gerlach RF, y cols. Comparative study on antioxidant effects and vascular matrix metalloproteinase-2 downregulation by dihydropyridines in renovascular hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2011; 383:35-44.

Marin MJ, Fábregues G, Rodríguez PD, Díaz M, Paez O, Alfie J, Caruso G, Pantalena PS, Schiavi B, González M. Registro Nacional de Hipertensión Arterial. Conocimiento, tratamiento y control de la hipertensión arterial. Estudio RENATA. *Rev Argent Cardiol*. 2012; 80: 121-9.

Meier K, Gorbey S, Lemmer B. Effects of nebivolol and metoprolol on nitric oxide urinary excretion, on expression of eNOS and on blood pressure in SH-rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369: R42.

Messerli FH, Grossman E. Beta-Blockers in hypertension: is carvedilol different? *Am J Cardiol*. 2004; 93: 7B-12B.

Miao CY, Xie HH, Zhan LS, Su DF. Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats. *J Hypertens* 2006; 24: 1125-35.

Miao CY, Tao X, Gong K, Zhang SH, Chu ZX, Su DF. Arterial remodeling in chronic sinoaortic denervated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 37:6–15.

Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vázquez CM. The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2008; 21: 1231-7.

Mitsuhashi H, Tamura K, Yamauchi J, Ozawa M, Yanagi M, Dejima T y cols. Effect of losartan on ambulatory short-term blood pressure variability and cardiovascular remodeling in hypertensive patients on hemodialysis. *Atherosclerosis* 2009; 207: 186-90.

Moncada S, Palmer R, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev*. 1991; 43: 109-142.

Morillas P, de Andrade H, Castillo J, Quiles J, Bertomeu-González V, Cordero A y cols. Inflammation and apoptosis in hypertension. Relevance of the extent of target organ damage. *Rev Esp Cardiol* 2012; 65: 819-825.

Moser M, Frishman W. Results of therapy with carvedilol, a beta-blocker vasodilator with antioxidant properties, in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1998; 11:155-225.

Mosaad SM, Zaitone SA, Ibrahim A, El-Baz AA, Abo-Elmatty DM, Moustafa YM. Celecoxib aggravates cardiac apoptosis in L-NAME-induced pressure overload model in rats: Immunohistochemical determination of cardiac caspase-3, Mcl-1, Bax and Bcl-2. *Chem Biol Interact.* 2017; 272: 92-106.

Navarro-Gonzalez J, Mora-Fernandez C, Gomez-Chinchon M, Muros M, Herrera H, Garcia J. Serum and gene expression profile of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in hypertensive diabetic patients: effect of amlodipine administration. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23:51-59.

Nayler WG. The effect of amlodipine on hypertension-induced cardiac hypertrophy and reperfusion-induced calcium overload. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988; 12: S42-44.

Negrea S, Latea L, Bolboaca S. Effects of Valsartan and Nebivolol Treatment on Blood Pressure Variability in Hypertensive Patients. *AMJ* 2010; 4: 248-252.

Nerenberg KA, Zarnke KB, Leung AA, Dasgupta K, Butalia S, McBrien K; Hypertension Canada. Hypertension Canada's 2018 Guidelines for Diagnosis, Risk Assessment, Prevention, and Treatment of Hypertension in Adults and Children. *Can J Cardiol.* 2018; 34: 506-525.

Nobre F, da Silva CA, Coelho EB, Salgado HC, Fazan R. Antihypertensive agents have different ability to modulate arterial pressure and heart rate variability in 2K1C rats. *Am J Hypertens* 2006; 19:1079-1083.

Norman RA Jr, Dzielak DJ. Spontaneous hypertension is primarily the result of sympathetic overactivity and immunologic dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986; 182: 448-53.

O'Brien E. Stabilizing blood pressure variability: a new therapeutic target in hypertension. *Medicographia* 2012; 34: 25-31.

Ohlstein EH, Vickery L, Arleth A, Barone F, Sung CP, Camden A y cols. Carvedilol, a novel cardiovascular agent, inhibits development of vascular and ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 1994; 16: 163-77.

Okamoto K y Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circulation J.* 1963; 27: 282-293.

Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cífková R, Dominiczak AF, Grassi G, Jordan J, Poulter NR, Rodgers A, Whelton PK. Hypertension. *Nature Reviews Disease Primers* 2018; volume 4, Article number: 18014.

Ozyıldız AG, Eroglu S, Bal U, Atar I, Okyay K, Muderrisoglu H. Effects of Carvedilol Compared to Nebivolol on Insulin Resistance and Lipid Profile in Patients With -Essential Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2016. Epub ahead of print.

Parati G, Ochoa JE, Lombardi C, Bilo G. Assessment and management of blood-pressure variability. *Nat Rev Cardiol.* 2013; 10: 143-55.

Parati G. Blood pressure variability: its measurement and significance in hypertension. *J Hypertens Suppl* 2005; 23: S19-25.

Parati G, Bilo G pressure variability and its different components. *Blood Press Monit.* 2003; 8: 155-9.

Parati G, Mancia G. Blood pressure variability as a risk factor. *Blood Press. Monit.* 2001; 6: 341–347.

Parati G, Pomidossi G, Albini F, Malaspina D, Mancia G. Relationship of 24-hour blood pressure mean and variability to severity of target-organ damage in hypertension. *J Hypertens.* 1987; 5: 93-8.

Paulis L, Matuskova J, Adamcova M, Pelouch V, Simko J, Krajcirovicova K y cols. Regression of left ventricular hypertrophy and aortic remodelling in NO-deficient hypertensive rats: effect of L-arginine and spironolactone. *Acta Physiol* 2008; 194:45-55.

Pereira LM, Bezerra DG, Mandarim-de-Lacerda CA. Aortic wall remodeling in rats with nitric oxide deficiency treated by enalapril or verapamil. *Pathol Res Pract.* 2004; 200: 211-7.

Persson PB. Modulation of cardiovascular control mechanisms and their interaction. *Physiol Rev* 1996; 76: 193-244.

Persson PB, Baumann JE, Ehmke H, Nafz B, Wittmann U, Kirchheim HR. Phasic and 24-h blood pressure control by endothelium-derived relaxing factor in conscious dogs. *Am. J. Physiol* 1992, (*Heart Circ. Physiol.*, 31); 262: H1395-H1400.

Phungphong S, Kijawornrat A, Chaiduang S, Saengsirisuwan V, Bupha-Intr T. 20-Hydroxyecdysone attenuates cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Steroids.* 2017; 126:79-84.

Piccirillo G, Luparini RL, Celli V, Moisè A, Lionetti M, Marigliano V y col. Effects of carvedilol on heart rate and blood pressure variability in subjects with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2000; 86: 1392-5.

Pierdomenico SD, Di Nicola M, Esposito AL, Di Mascio R, Ballone E, Lapenna D, Cuccurullo F. Prognostic value of different indices of blood pressure variability in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2009; 22: 842-7.

Pini R, Cavallini MC, Palmieri V, Marchionni N, Di Bari M, Devereux RB y cols. Central but not brachial blood pressure predicts cardiovascular events in an unselected geriatric population: the ICARe Dicomano Study. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51: 2432-9.

Pires de Abreu LR, de Castro SA, Pedrazzoli J Jr. Atenolol quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to bioequivalence study. *AAPS PharmSci* 2003; 5: E21.

Pladys P, Lahaie I, Cambonie G, Thibault G, Lê NL, Abran D, Nuyt AM. Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat. *Pediatr Res* 2004; 55: 1042–9.



Polónia J, Barbosa L, Silva JA, Bertoquini S. Different patterns of peripheral versus central blood pressure in hypertensive patients treated with  $\beta$ -blockers either with or without vasodilator properties or with angiotensin receptor blockers. *Blood Press Monit.* 2010; 15: 235-9.

Poortvliet RK, Lloyd SM, Ford I, Sattar N, de Craen AJ, Wijsman LW y cols. Biological correlates of blood pressure variability in elderly at high risk of cardiovascular disease. *Am J Hypertens.* 2015; 28: 469-79.

Pringle E, Phillips C, Thijs L, Davidson C, Staessen JA, de Leeuw PW, Jaaskivi M; Syst-Eur investigators. Systolic blood pressure variability as a risk factor for stroke and cardiovascular mortality in the elderly hypertensive population. *J Hypertens.* 2003; 21: 2251-7.

Reid JL, Meredith PA. Concentration-effect analysis of antihypertensive drug responses. *Hypertension.* 1990; 16: 12-8.

Ricci S, D'Esposito V, Oriente F, Formisano P, Di Carlo A. Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. *Clin Chem Lab Med.* 2016; 54: 1281-90.

Ripley TL, Saseen JJ.  $\beta$ -blockers: a review of their pharmacological and physiological diversity in hypertension. *Ann Pharmacother* 2014; 48: 723-33.

Rizzi E, Guimaraes DA, Ceron CS, Prado CM, Pinheiro LC, Martins-Oliveira A y cols.  $\beta_1$ -Adrenergic blockers exert antioxidant effects, reduce matrix metalloproteinase activity, and improve renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. *Free Radic Biol Med.* 2014; 73: 308-17.

Roman MJ, Devereux RB. Association of central and peripheral blood pressures with intermediate cardiovascular phenotypes. *Hypertension* 2014; 63: 1148-53.

Rothwell PM. Does blood pressure variability modulate cardiovascular risk? *Curr Hypertens Rep* 2011; 13:177-86.

Rothwell PM, Howard SC, Dolan E, O'Brien E, Dobson JE, Dahlöf B y cols. Effects of beta-blockers and calcium channel blockers on within-individual variability in blood pressure and risk of stroke. *Lancet Neurol* 2010; 9: 469–80.

Sacco G, Evangelista S, Criscuoli M, Goso C, Bigioni M, Binaschi M, Manzini S, Maggi CA. Involvement of nitric oxide in both central and peripheral haemodynamic effect of D/L-nebivolol and its enantiomers in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 511:167-74.

Sadek SA, Rashed LA, Bassam AM, Said ES. Effect of aliskiren, telmisartan and torsemide on cardiac dysfunction in l-nitro arginine methyl ester (l-NAME) induced hypertension in rats. *J Adv Res* 2015; 6:967-974.

Salman IM. Current Approaches to Quantifying Tonic and Reflex Autonomic Outflows Controlling Cardiovascular Function in Humans and Experimental Animals. *Curr Hypertens Rep* 2015;17:84.



Samson R, Lee A, Lawless S, Hsu R, Sander G. Novel Pathophysiological Mechanisms in Hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 956: 21-35.

Schillaci G, Pucci G, Parati G. Blood pressure variability: an additional target for antihypertensive treatment? *Hypertension* 2011; 58:133-5

Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H y cols. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989; 2: 358–67.

Sega R, Corrao G, Bombelli M, Beltrame L, Facchetti R, Grassi G, Ferrario M, Mancia G. Blood pressure variability and organ damage in a general population: results from the PAMELA study (Pressioni Arteriose Monitorate E Loro Associazioni). *Hypertension.* 2002; 39: 710-4.

Sega R, Corrao G, Bombelli M, Beltrame L, Facchetti R, Grassi G, Ferrario M, Mancia G. Blood pressure variability and organ damage in a general population: results from the PAMELA study (Pressioni Arteriose Monitorate E Loro Associazioni). *Hypertension.* 2002; 39: 710-4.

Shan ZZ, Dai SM, Su DF. Arterial baroreflex deficit induced organ damage in sinoaortic denervated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38:427–437.

Shang P, Liu W, Liu T, Zhang Y, Mu F, Zhu Z y cols. Acetyl-11-Keto- $\beta$ -Boswellic Acid Attenuates Prooxidant and Profibrotic Mechanisms Involving Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, and Improves Vascular Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats. *Sci Rep.* 2016; 6: 39809.

Shimamoto K, Ando K, Fujita T, Hasebe N, Higaki J, Horiuchi M, y cols; Japanese Society of Hypertension Committee for Guidelines for the Management of Hypertension. The Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension (JSH 2014). *Hypertens Res.* 2014; 37: 253-390.

Sleight, P. The importance of autonomic nervous system in health and disease. *Aust. N.Z. J. Med.* 1997; 27: 467–473.

Souza HC, Martins-Pinge MC, Dias da Silva VJ, Borghi-Silva A, Gastaldi AC, Blanco JH, Tezini GC. Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. *AutonNeurosci* 2008; 139: 38–45.

Stafylas PC, Sarafidis PA. Carvedilol in hypertension treatment. *Vasc Health Risk Manag.* 2008; 4: 23-30.

Stauss HM. Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34:362–88.

Stoschitzky K, Stoschitzky G, Brussee H, Bonelli C, Dobnig H. Comparing beta-blocking effects of bisoprolol, carvedilol and nebivolol. *Cardiology.* 2006; 106: 199-206.

Su DF. Treatment of hypertension based on measurement of blood pressure variability: lessons from animal studies. *Curr Opin Cardiol.* 2006; 21: 486-91.

Su DF, Miao CY. Reduction of blood pressure variability: a new strategy for the treatment of hypertension. *Trends. Pharmacol. Sci.* 2005; 26: 388–390.

Su DF, Miao CY. Blood pressure variability and organ damage. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2001; 28: 709–715.

Sun L, Jin H, Sun L, Chen S, Huang Y, Liu J y cols. Hydrogen sulfide alleviates myocardial collagen remodeling in association with inhibition of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in spontaneously hypertensive rats. *Mol Med.* 2015; 20:503-15.

Taira CA, Celuch SM, Enero MA. Effects of acute and short-term treatment with antihypertensive drugs in sinoaortic denervated rats. *Gen Pharmacol* 1983; 14: 657-61.

Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A. Effects of blood pressure-lowering on outcome incidence in hypertension: 5. Head-to-head comparisons of various classes of antihypertensive drugs - overview and meta-analyses. *J Hypertens.* 2015 Jul; 33: 1321-41.

Toblli J, Cao G, Rivas C, Munoz M, Giani J, Dominici F y cols. Cardiovascular protective effects of nebivolol in Zucker diabetic fatty rats. *J Hypertens.* 2010; 28: 1007-19.

Torres Gómez FJ, Martínez Moyano A, Fernández Machín P, González Rodríguez R. Metodología y técnicas de trabajo en el laboratorio de anatomía patológica. Errores frecuentes y su solución. Editorial Fesitess Andalucía, 2011.

Trudeau L. Central blood pressure as an index of antihypertensive control: determinants and potential value. *Can J Cardiol* 2014; 30: S23-8.

Tsuchiya K, Tomita S, Ishizawa K, Abe S, Ikeda Y, Kihira Y y cols. Dietary nitrite ameliorates renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Nitric Oxide* 2010; 22:98-103.

Tsukamoto O, Minamino T, Sanada S, Okada K, Hirata A, Fujita M y cols. The antagonism of aldosterone receptor prevents the development of hypertensive heart failure induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2006; 20: 93-102.

Turnbull F, Neal B, Ninomiya T, Algert C, Arima H, Barzi F, Bulpitt C, Chalmers J, Fagard R, Gleason A, Heritier S, Li N, Perkovic V, Woodward M, MacMahon S. Effects of different regimens to lower blood pressure on major cardiovascular events in older and younger adults: meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 2008; 336: 1121- 1123.

Valgimigli M, Ceconi C, Malagutti P, Merli E, Soukhomovskaia O, Francolini G y cols. Tumor necrosis factor-alpha receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the Cytokine-Activation and Long-Term Prognosis in Myocardial Infarction (CALPHA) study. *Circulation.* 2005; 111: 863–70.

Van Bortel LM, Fici F, Mascagni F. Efficacy and tolerability of nebivolol compared with other antihypertensive drugs: a meta-analysis. *Am J Cardiovasc Drugs* 2008; 8:35-44.

Van Nueten L, De Créé J. Nebivolol: comparison of the effects of dl-nebivolol, d-nebivolol, l-nebivolol, atenolol, and placebo on exercise-induced increases in heart rate and systolic blood pressure. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1998; 12: 339-44.

Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods*. 2013 Mar; 10: 211-20.

Vanhoutte, Gao. Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13: 265-73

Varagic J, Ahmad S, Voncannon JL, Moniwa N, Simington SW Jr, Brosnihan BK y cols. Nebivolol reduces cardiac angiotensin II, associated oxidative stress and fibrosis but not arterial pressure in salt-loaded spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2012; 30: 1766-74.

Wang Y, Zhang F, Liu Y, Yin S, Pang X, Li Z, Wei Z. Nebivolol alleviates aortic remodeling through eNOS upregulation and inhibition of oxidative stress in l-NAME-induced hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 2017; 39: 628-639.

Wang Y, Wang Y, Yang D, Yu X, Li H, Lv X y cols.  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation promotes LPS-induced cardiomyocyte apoptosis through activating PKA and enhancing CaMKII and I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation. *Crit Care* 2015; 19: 76.

Wang Y, Zhang MS, Liu Y. Nebivolol treatment improves resistant arterial function and reduces ventricular hypertrophy and angiotensin II in spontaneously hypertension rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2013; 14:146-55.

Wang DS, Xie HH, Shen FM, Cai GJ, Su DF. Blood pressure variability, cardiac baroreflex sensitivity and organ damage in experimentally hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32:545-552.

Webb AJS, Fisher U, Mehta Z, Rothwell PM. Effects of antihypertensive-drug class on interindividual variation in blood pressure and risk of stroke: A systematic review and metaanalysis. *Lancet*. 2010; 375: 906 –15.

Wei S, Chow LT, Sanderson JE. Effect of carvedilol in comparison with metoprolol on myocardial collagen postinfarction. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36: 276-81.

Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M y cols. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal* 2018; 00: 1-98.

Williams B, Lacy PS; CAFE and the ASCOT (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial) Investigators. Impact of heart rate on central aortic pressures and hemodynamics: analysis from the CAFE (Conduit Artery Function Evaluation) study: CAFE-Heart Rate. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54: 705-13.

Williams B, Lacy PS, Thom SM, Cruickshank K, Stanton A, Collier D y cols. Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation*. 2006; 113: 1213-25.

Wiysonge CS, Bradley HA, Volmink J, Mayosi BM, Opie LH. Beta-blockers for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017; 1: CD002003

Wiysonge CS, Opie LH.  $\beta$ -Blockers as initial therapy for hypertension. *JAMA*. 2013; 310: 1851-2.

Wiysonge CS, Bradley HA, Volmink J, Mayosi BM, Mbewu A, Opie LH. Beta-blockers for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012; (8): CD002003.

Wu HY, Huang JW, Lin HJ, Liao WC, Peng YS, Hung KY. Comparative effectiveness of renin-angiotensin system blockers and other antihypertensive drugs in patients with diabetes: systematic review and bayesian network meta-analysis. *BMJ* 2013; 347: f6008.

Wu TC, Chen YH, Leu HB, Chen YL, Lin FY, Lin SJ y col. Carvedilol, a pharmacological antioxidant, inhibits neointimal matrix metalloproteinase-2 and -9 in experimental atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43: 1508-22.

Xie HH, Shen FM, Zhang XF, Jiang YY, Su DF. Blood pressure variability, baroreflex sensitivity and organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with various antihypertensive drugs. *Eur J Pharmacol*. 2006; 543: 77-82.

Xu XL, Zang WJ, Lu J, Kang XQ, Li M, Yu XJ. Effects of carvedilol on M2 receptors and cholinesterase-positive nerves in adriamycin-induced rat failing heart. *Auton Neurosci*. 2006; 130: 6-16.

Xue C, Zhou C, Dai B, Yu S, Xu C, Mao Z, Ye C, Chen D, Zhao X, Wu J, Chen W, Mei C. Antihypertensive treatments in adult autosomal dominant polycystic kidney disease: network meta-analysis of the randomized controlled trials. *Oncotarget*. 2015; 6: 42515-29.

Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, Kudoh S, Shiojima I, Mizuno T y cols. Efficient inhibition of the development of cardiac remodeling by a long-acting calcium antagonist amlodipine. *Hypertension*. 1998; 31: 32-8.

Yin F, Li P, Zheng M, Chen L, Xu Q, Chen K y cols. Interleukin-6 family of cytokines mediates isoproterenol-induced delayed STAT3 activation in mouse heart. *J Biol Chem* 2003; 278: 21070-5.

Zacà V, Rastogi S, Mishra S, Wang M, Sharov VG, Gupta RC y cols. Atenolol is inferior to metoprolol in improving left ventricular function and preventing ventricular remodeling in dogs with heart failure. *Cardiology*. 2009; 112: 294-302.

Zambrano S, Blanca AJ, Ruiz-Armenta MV, Miguel-Carrasco JL, Revilla E, Santa-María C y cols. The renoprotective effect of L-carnitine in hypertensive rats is mediated by modulation of oxidative stress-related gene expression. *Eur J Nutr* 2013; 52:1649-1659.

Zicha J y Kunes J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol. Rev*. 1999; 79: 1227-1282.

Zhang Y, Zhang X, Liu L, Zanchetti A; FEVER Study Group. Is a systolic blood pressure target <140 mmHg indicated in all hypertensives? Subgroup analyses of findings from the randomized FEVER trial. *Eur Heart J*. 2011; 32: 1500-1508.

Zhang C, Xie HH, Lu ZA, Zhu MJ, Su DF. Inhibition of inflammation contributes to organ protection of atenolol in sinoaortic-denervated rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 43: 66 3-8.

Zhang C, Chen H, Xie HH y cols. Inflammation is involved in the organ damages induced by sinoaortic denervation in rats. *J Hypertens* 2003; 21:2141–2148.