

# Papel antioxidante de la vitamina E en la aterogénesis inducida por hiperfibrinogenemia

CANDELARIA LLORENS<sup>1-6</sup>, MARÍA DEL CARMEN BÁEZ<sup>1,2</sup>, MARIANA TARÁN<sup>1-3</sup>, VILMA CAMPANA<sup>1-4</sup>, ISMAEL FONSECA<sup>5</sup>, ELSA OYOLA<sup>5</sup>, JOSÉ PALMA<sup>1</sup>, MÓNICA MOYA<sup>1-4</sup>

Recibido: 12/11/2009  
Aceptado: 30/04/2010

**Dirección para separatas:**  
Dra. Mónica Moya  
Los Médanos 3155  
(5009) Alto Verde  
Córdoba, Argentina  
Tel./Fax: 54-351-4812856;  
54-351-4332020  
e-mail: monicamoya@hotmail.com

## RESUMEN

Con el propósito de estudiar el efecto de la vitamina E sobre el estrés oxidativo desencadenado por hiperfibrinogenemia (HF) en un modelo experimental de aterogénesis y la posible normalización de los indicadores de estrés oxidativo, se evaluaron: óxido nítrico (NO), L-citrulina, superóxido dismutasa (SOD) e involución de lesiones histopatológicas en la aorta torácica. El estudio se realizó en 36 ratas, cepa Wistar, que se dividieron en tres grupos (n = 12 cada uno): A, control; B, HF × 90 días; C, HF × 90 días + vitamina E. La HF se indujo mediante inyecciones de adrenalina (0,1 ml/día/rata) por 90 días. La dosis de vitamina E fue de 2 mg/día/rata durante 75 días. Se dosaron en plasma los niveles de fibrinógeno (mg/dl), NO (uM) y L-citrulina (mM) y en lisado de glóbulos rojos, por espectrofotometría, se determinó la actividad de la SOD (U/ml). Se analizaron cortes de la aorta torácica por microscopia óptica (MO). Para el análisis estadístico se emplearon MANOVA y la prueba de Fisher; se estableció un nivel de significación de  $p < 0,05$ . Se observó un aumento significativo de fibrinógeno en el grupo B ( $407 \pm 8,9$  mg/dl) en comparación con los grupos A ( $203 \pm 9$  mg/dl) y C ( $191,58 \pm 17,79$  mg/dl) ( $p < 0,001$ ). El NO disminuyó significativamente en el grupo B ( $13,73 \pm 1,76$  uM) frente a los grupos A ( $23,58 \pm 0,08$  uM) y C ( $26,64 \pm 3,65$  uM) ( $p < 0,001$ ). La L-citrulina aumentó en forma significativa en los grupos B ( $4,99 \pm 0,18$  mM) y C ( $6,60 \pm 0,16$  mM) en comparación con el grupo A ( $3,03 \pm 0,13$  mM) ( $p < 0,001$ ). El SOD incrementó su actividad en los grupos B ( $251,67 \pm 10,34$  U/ml) y C ( $304,75 \pm 10,43$  U/ml) frente al grupo A ( $139,44 \pm 4,74$  U/ml) ( $p < 0,001$ ). La microscopia óptica mostró denudación endotelial, engrosamiento intimal y protrusión de la pared en el grupo B (90%) y recuperación de la denudación endotelial y disminución del 50% del engrosamiento intimal en el grupo C ( $p < 0,001$ ). Niveles aumentados de SOD serían insuficientes para impedir alteraciones en la vía del estrés oxidativo inducido por la HF. La vitamina E actuaría deteniendo la reacción en cadena iniciada por los radicales libres y en consecuencia disminuiría el anión superóxido, estimulando de esta manera un incremento en la biodisponibilidad del NO y normalizando las concentraciones de fibrinógeno plasmático.

REV ARGENT CARDIOL 2010;78:405-410.

## Palabras clave >

Hiperfibrinogenemia - Aterogénesis - Estrés oxidativo - Superóxido dismutasa - Vitamina E

## Abreviaturas >

<b>CMLV</b>	Células musculares lisas vasculares	<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintetasa endotelial
<b>ERN</b>	Especies reactivas del nitrógeno	<b>ERO</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>GC</b>	Guanilato ciclasa	<b>GMPc</b>	Monofosfato de guanidina cíclico
<b>HF</b>	Hiperfibrinogenemia	<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>MO</b>	Microscopia óptica	<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>NO</b>	Óxido nítrico	<b>oxLDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>vit</b>	Vitamina		

## INTRODUCCIÓN

La aterogénesis presenta además del depósito de lípidos un componente inflamatorio en la pared arterial.

En trabajos previos hemos demostrado la relación existente entre la hiperfibrinogenemia y la alteración funcional del endotelio vascular que conduce a una pérdida de las propiedades hemostáticas normales,

Trabajo financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba y la Universidad Nacional de La Rioja - Argentina

<sup>1</sup> Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

<sup>2</sup> Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud Humana (IICSHUM), Universidad Nacional de La Rioja

<sup>3</sup> Becaria SECYT, Universidad Nacional de Córdoba

<sup>4</sup> Cátedra de Física Biomédica, Universidad Nacional de La Rioja

<sup>5</sup> II Cátedra de Anatomía Patológica, Universidad Nacional de Córdoba

<sup>6</sup> Becaria MYNCT

alterando la relajación dependiente del endotelio debido a la disminución de la síntesis y/o de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), lo cual posiblemente sea el fenómeno más temprano e importante de la disfunción endotelial. (1) Otros investigadores confirman que el estrés oxidativo y la disfunción endotelial predicen el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares de tipo isquémico. (2)

Una reducción en la biodisponibilidad endotelial del NO podría promover un fenotipo proinflamatorio y protrombótico a nivel de la pared vascular, (3) ya que este potente vasodilatador vascular, por su bajo peso molecular y su naturaleza lipófila, se difunde fácilmente a través de las membranas celulares atravesando la íntima vascular hasta alcanzar el tejido muscular liso de la pared arterial, donde activa la enzima guanilato ciclasa (GC) soluble y aumenta los niveles de monofosfato de guanidina cíclico (GMPc), que es el mediador de sus efectos fisiológicos, y provoca la relajación de las células musculares lisas vasculares (CMLV). (4) Estos eventos ayudan al endotelio a desempeñar normalmente las funciones de restringir el ingreso no controlado de lipoproteínas de baja densidad (LDL) e inhibir la adhesión, la migración y la acumulación de monocitos y linfocitos T en el espacio subendotelial, acontecimientos que inducirían una alteración del equilibrio homeostático endotelial y consecuentemente llevarían a la disfunción endotelial. (5, 6) Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, la síntesis de NO y L-citrulina seguiría una vía fisiopatológica, debido a la disociación de la eNOS, en estadios subclínicos e incluso cuando aún no se han producido daños estructurales en la pared, razón por la cual podrían utilizarse como indicadores de estrés oxidativo en la aterogénesis subclínica. (7)

Por otra parte, existen mecanismos de defensa antioxidante celulares que son capaces de neutralizar los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y de las especies reactivas del nitrógeno (ERN) que preservan la biodisponibilidad del NO y mantienen así el tono vascular normal; la enzima superóxido dismutasa (SOD) es una de las principales protectoras antioxidantes, cuya función consiste en eliminar el ión superóxido por dismutación en  $H_2O_2$  y  $O_2$  antes de que reaccione con moléculas biológicas susceptibles u origine otros agentes tóxicos. (8, 9)

Estudios epidemiológicos han demostrado una disminución de la incidencia de episodios isquémicos en personas tratadas con antioxidantes exógenos como la vitamina E, que pertenece a un grupo no enzimático de vitaminas liposolubles, cuya mayor actividad biológica es óptima bajo la expresión isomérica conocida como  $\alpha$ -tocoferol. (10-12) La vitamina E funciona como un antioxidante biológico, que previene la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares; debido a su estructura molecular, se comporta como una molécula liposoluble capaz de fijar radicales libres del tipo  $O_2\cdot$  y  $OH\cdot$  y por poseer un hidroxilo fenólico en el anillo de cromano responsable de la reducción antioxidante, interrumpiendo las reacciones en cadena

con radicales libres y en consecuencia disminuyendo el estrés oxidativo. (13-15)

De esta manera, la vitamina E podría ser eficaz en la inhibición de las fases iniciales de la aterosclerosis subclínica. Teniendo en cuenta que la historia natural de la aterosclerosis comienza con una primera fase asintomática, de largo tiempo de duración, seguida por una fase clínica, no cabe duda de que si el desarrollo temprano de las lesiones se previniese con éxito la incidencia de eventos clínicos se reduciría significativamente.

Se estudió el efecto antioxidante de la vitamina E sobre el estrés oxidativo desencadenado por hiperfibrinogenemia en un modelo experimental de aterogénesis y la posible normalización de los indicadores de estrés oxidativo para evitar la instauración de las primeras lesiones aterogénicas; se evaluó, asimismo, la posible reversión parcial o total de la histopatología de la pared vascular.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron 36 ratas macho, cepa Wistar, endocriadas en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNC, de  $280 \pm 20$  g de peso promedio, alimentadas con dieta balanceada para ratas con un mínimo de 17% de contenido proteico. La investigación se realizó de acuerdo con la guía de cuidados y usos de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud, publicación NIH (n° 85-23, revisado 1996).

### Grupos de estudio

Se estudiaron en forma secuencial y encuadrados en diferentes situaciones experimentales tres grupos constituidos por 12 ratas cada uno:

- Grupo A: control (sin inducción de hiperfibrinogenemia).
- Grupo B: hiperfibrinogenemia inducida por 90 días (HF  $\times$  90 días).
- Grupo C: hiperfibrinogenemia inducida por 90 días + tratamiento con vitamina E por 75 días (HF  $\times$  90 días + vit E).

### Inducción del proceso inflamatorio

No se registraron muertes ni se excluyeron animales en ninguno de los lotes estudiados. Teniendo en cuenta trabajos previos de nuestro laboratorio, (6, 16) la inducción de la hiperfibrinogenemia se realizó por inyección subcutánea de adrenalina (0,1 ml/día/rata) durante 90 días.

### Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico se realizó mediante la administración de vitamina E, diluida en agua bidestilada, en dosis de 2 mg/día/rata; esta dosis fue equivalente a la dosis en humanos de 400 mg de vitamina E por día, recomendada para terapias de suplementación. (11, 17, 18) El tratamiento se inició a partir del día 15 de la primera inducción de HF y por un período de 75 días consecutivos. La administración se realizó por vía oral con una jeringa de 1 ml adaptada con una sonda en su extremo, que permitió depositar la dosis justa de vitamina a nivel del esófago para evitar que fuera regurgitada por el animal.

### Preparación del material experimental

#### Obtención del plasma

Los animales fueron sacrificados y se obtuvo la sangre a las 72 horas de la última inducción de HF, en coincidencia con el día

90 de la inducción. La sangre obtenida se recogió en cápsulas de Petri con una mezcla de anticoagulante constituido por oxalato de amonio y de potasio en una proporción de 2:1. Para la determinación de la actividad de la enzima SOD se utilizó EDTA como anticoagulante; posteriormente se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos para obtener el plasma y el lisado de los glóbulos rojos, respectivamente.

#### **Obtención del material para anatomía patológica por microscopía óptica**

En todos los grupos estudiados se seleccionaron cortes de la aorta torácica desde su origen hasta la última porción, debido a que en los modelos experimentales en ratas se ha comprobado que las lesiones se presentan de manera preferente en esta porción aórtica, a diferencia de los seres humanos, en los que las lesiones habitualmente se encuentran en la aorta abdominal. Se realizaron 30 secciones de 4  $\mu$ m cada corte, por cada animal seleccionado por simple ciego. El material procesado para anatomía patológica se conservó en formol bufferizado al 10% y se coloreó con hematoxilina-eosina (HE) y se analizó por microscopía óptica (MO).

#### **Procesamiento del material biológico**

- I. **Fibrinógeno plasmático:** su concentración se determinó por espectrofotometría según el método de Ratnoff y Menzie (19) y los resultados se expresan en mg/dl.
- II. **Óxido nítrico (NO):** se determinó por reacción de Griess mediante espectrofotometría y los resultados se expresan en  $\mu$ M. (20)
- III. **L-citrulina:** se cuantificó por espectrofotometría y los resultados se expresan en mM. (21)
- IV. **SOD:** su actividad se determinó por espectrofotometría en lisado de glóbulos rojos, para lo cual se utilizó un kit de Randox y los resultados se expresan en U/ml. (22)

#### **Análisis estadístico**

Para el análisis de los resultados de las variables independientes (grupos de animales estudiados) con respecto a las covariables (fibrinógeno, NO, L-citrulina y superóxido dismutasa) se utilizó el programa Infostat; las pruebas de normalidad y homogeneidad se realizaron con la prueba de Shapiro-Wilks y luego se estudiaron con MANOVA y la prueba post hoc utilizada fue la de Hotelling. Para la cuantificación de las lesiones anatomopatológicas se empleó el programa Axiovision 4.8; se analizaron los campos de fotografías con una magnificación 400 $\times$  obtenidas de los diferentes cortes estudiados en todos los grupos y se analizaron con la prueba de Fisher para variables cualitativas. Se estableció un nivel de significación de  $p < 0,05$  para todos los casos.

### **RESULTADOS**

Los resultados de las variaciones plasmáticas de fibrinógeno, NO y L-citrulina y de la actividad enzimática de la SOD se detallan en la Tabla 1.

Se observó un incremento significativo del fibrinógeno plasmático en el grupo B (aterogénesis inducida por 90 días) cuando se comparó con el grupo A (control) ( $p < 0,001$ ). El grupo C (HF  $\times$  90 días + vit E) mostró una disminución de la hiperfibrinogenemia con respecto al grupo B (HF  $\times$  90 días) ( $p < 0,001$ ) y presentó una concentración similar a la del grupo A (control), por lo que la administración de la vitamina estabilizó las concentraciones de fibrinógeno.

En el grupo B (HF  $\times$  90 días) se observó una disminución significativa del NO con respecto al grupo A

(control) ( $p < 0,001$ ). En el grupo C (HF  $\times$  90 días + vit E), el nivel de NO plasmático se incrementó incluso más que en el grupo A (control) respecto del cual presentó una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) y también fue estadísticamente significativa la diferencia con el grupo de animales no tratados (B) ( $p < 0,001$ ).

En cuanto a las variaciones plasmáticas de L-citrulina, ésta se mostró incrementada en el grupo B (HF  $\times$  90 días) con respecto al grupo A (control) ( $p < 0,001$ ). El grupo C (HF  $\times$  90 días + vit E) presentó un aumento en las concentraciones plasmáticas de L-citrulina con respecto al grupo A (control) ( $p < 0,001$ ) e incluso frente al grupo B (HF  $\times$  90 días) ( $p < 0,001$ ).

La actividad de la SOD aumentó en el grupo con aterogénesis inducida por HF por 90 días (B) con respecto a los animales sanos no tratados (A) ( $p < 0,001$ ). Se observó un comportamiento similar en el grupo tratado con vitamina E, que mostró un aumento significativo de la actividad SOD al compararlo con el grupo A (control) e incluso con los animales con aterogénesis inducida por HF por 90 días ( $p < 0,001$ ).

En los estudios histopatológicos no se observaron cambios en el grupo control (Figura 1); el 100% de los cortes mostraron indemnidad en las diferentes capas de la pared aórtica. Se estudiaron 300 cortes anatomopatológicos en el grupo B, con hiperfibrinogenemia por 90 días; se observaron áreas extensas de denudación endotelial, protrusiones de la capa endotelial hacia la luz y cambios mixoides subendoteliales en 295 de los 300 cortes estudiados (Figura 2), lo cual representa el 98,33% del total de lesiones ( $p < 0,001$ ). La administración de vitamina E en el grupo C (HF  $\times$  90 días + vit E) (Figura 3) evidenció una evolución de los cambios anatomopatológicos hacia la normalidad de las diferentes capas en 219 (73%) de los 300 cortes estudiados, con una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) frente al grupo B y sin diferencias respecto del grupo A.

### **DISCUSIÓN**

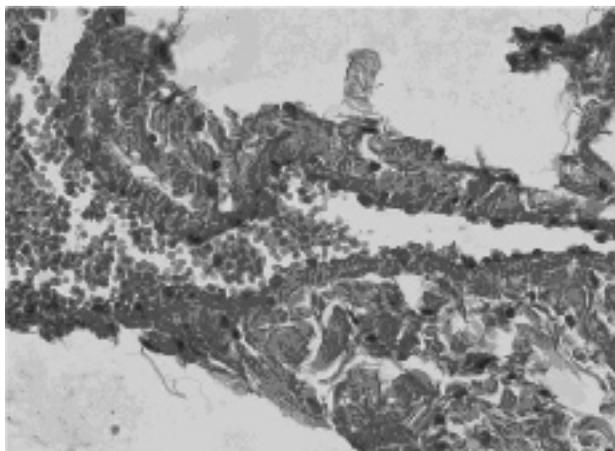
En nuestros resultados observamos que en este modelo aterogénico el estado de hiperfibrinogenemia refleja y mantiene el proceso inflamatorio desencadenando un incremento del estrés oxidativo en el microambiente vascular, situación que disminuye las concentraciones de NO, lo cual altera la reacción vasodilatadora como consecuencia de la disfunción endotelial y con probable repercusión en el flujo vascular. (23) Asimismo, en trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que en condiciones de HF los niveles de TNF- $\alpha$  se encuentran incrementados, indicando la existencia de activación endotelial. (6, 24) Considerando que el componente epiinflamatorio está presente desde el inicio del proceso aterogénico y el estrés oxidativo resultante se propaga y agrava la lesión a nivel vascular, es probable que los antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol atenúen las primeras etapas de la aterosclerosis.

La vitamina E por su hidrofobicidad y su efecto antioxidante estabilizaría las membranas, equilibrando

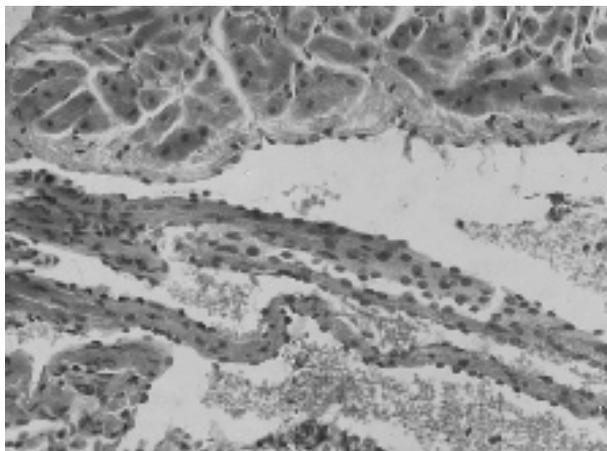
	Grupo A (Control)	Grupo B (HF x 90 días)	Grupo C (HF x 90 días + vit E)
Fibrinógeno (mg/dl)	203 ± 9	407 ± 8,9	191,58 ± 17,79
L-citrulina (mM)	3,03 ± 0,13	4,99 ± 0,18	6,60 ± 0,16
NO (uM)	23,58 ± 0,08	13,73 ± 1,76	26,64 ± 3,65
SOD (U/ml)	139,44 ± 4,74	251,67 ± 10,34	304,75 ± 10,43

Media ± EE: FP: AvsB: p < 0,001; AvsC: p < ns; BvsC: p < 0,001. NO: Avs B: p < 0,001; AvsC: ns; BvsC: p < 0,001; L-citrulina: AvsB: p < 0,001; AvsC: p < 0,001; BvsC: p < 0,001 SOD: AvsB: p < 0,001; AvsC: p < 0,001; BvsC: p < 0,01.

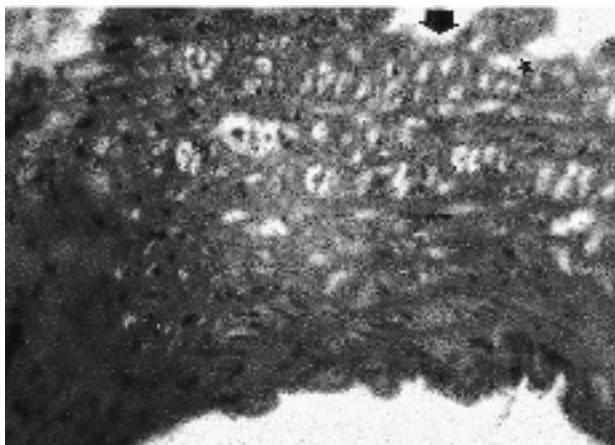
**Tabla 1.** Efecto de la vitamina E sobre biomarcadores de aterogénesis inducida por hiperfibrinogenemia



**Fig. 1.** Control. Corte histológico de la aorta torácica. Vista panorámica donde se observan el endotelio y la adventicia indemnes y la pared con varias capas limitantes elásticas (HE 400x).



**Fig. 3.** Corte histológico de la aorta torácica correspondiente al lote HF x 90 días tratadas con vitamina E. Se observan el endotelio y las demás capas aórticas indemnes (HE 400x).



**Fig. 2.** Corte histológico de la aorta torácica correspondiente al lote con HF x 90 días. Se observan desnudación endotelial y desorganización de capas limitantes internas (HE 400x).

la permeabilidad y disminuyendo la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales que serían estimuladas por desencadenantes proaterogénicos como la hiperfibrinogenemia; en consecuencia, reduciría el contacto y la inclusión de células inflamatorias, disminuyendo la reactividad inflamatoria y también, consecuentemente, la hiperfibrinogenemia.

Esto puede deberse a que la activación de células endoteliales por las citocinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , es inhibida por el  $\alpha$ -tocoferol. (25)

Numerosos estudios experimentales sugieren que las terapias con  $\alpha$ -tocoferol, especialmente en dosis altas, llevarían a la reducción de la liberación de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1b, IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ , por parte de los monocitos a través de la inhibición de la actividad de 5-lipooxigenasa. (11, 26, 27) Otros investigadores han propuesto que la vitamina E podría controlar la expresión de varios genes involucrados en la respuesta inflamatoria y la progresión de la aterogénesis, como el TNF- $\alpha$ , proteínas y moléculas de adhesión, ejerciendo un efecto antiinflamatorio. (28)

De esta manera, el primer blanco de acción de la vitamina E sería el endotelio como consecuencia de la captación selectiva de HDL por los receptores *scavengers*, que interviene en la entrega de la vitamina E, la cual se transporta por vía plasmática unida a HDL y LDL, a través de la capa de células endoteliales; luego, la vitamina E ingresa al espacio subendotelial, en donde impediría la oxidación de proteínas y lípidos causada por el estrés oxidativo, ya que la vitamina E actúa deteniendo la reacción en cadena iniciada por los radicales libres debido a que se considera que es “una captora de electrones” y en consecuencia disminuiría el anión superóxido, estimulando de esta manera un incremento en la biodisponibilidad del NO y, por lo tan-

to, disminuiría la peroxidación lipídica, lo que se refleja en la involución de las lesiones histopatológicas y en la inhibición de la formación de células espumosas.

En consecuencia, mejora la respuesta vasomotora dependiente del endotelio debido a que es capaz de modular la producción de NO, que en aterogénesis contribuye al mantenimiento de la homeostasis vascular normal reduciendo la incidencia clínica.

De la misma manera, se observó que el comportamiento de la L-citrulina fue similar al del NO, ya que el tratamiento con vitamina E por 75 días incrementó los valores de L-citrulina, lo que estaría indicando que el NO no estaría sufriendo una inactivación secundaria en su vía fisiopatológica, sino que por el contrario se encontraría disponible en el ambiente vascular para llevar a cabo sus funciones fisiológicas y protectoras.

El incremento de la actividad enzimática de la SOD por encima de los valores normales en los animales tratados con vitamina E indicaría, además de su propio efecto antioxidante, que acentuaría el efecto antioxidante endógeno ejercido por la SOD. Probablemente, en una primera instancia, la actividad de la SOD se incrementa por el aumento del sustrato como consecuencia del desequilibrio oxidativo y ésta podría ser la causa del aumento de la actividad de la SOD en el grupo con lesiones aterogénicas, mientras que el mayor incremento de su actividad en los animales tratados con vitamina E podría deberse, por un lado, al aumento de la síntesis de la enzima superóxido dismutasa y, por otro, a un aumento de la activación de la enzima.

En concordancia con los resultados encontrados en este modelo, otros investigadores sostienen que la vitamina E incrementaría la actividad de la SOD y el nivel de mRNA de la SOD en células musculares lisas vasculares de la aorta de rata. (11, 26, 28)

La administración de vitamina E normaliza los biomarcadores plasmáticos. Esto sugiere que en primera instancia la vitamina E detiene los dos primeros acontecimientos que dan lugar al desarrollo de la aterogénesis, que son la inflamación y el estrés oxidativo. Una vez que se detienen estos dos procesos fisiopatológicos, el próximo blanco de la vitamina es la reversión de las lesiones histopatológicas vasculares generadas por el estado prooxidativo y proinflamatorio, tal como muestran nuestros resultados dado que el estudio anatomopatológico mostró en el tratamiento con vitamina E una reversión pronunciada de las lesiones aterogénicas con recuperación del endotelio y de las demás capas aórticas.

En estos cambios estaría implicada la capacidad de la vitamina E para estimular la proliferación de las células endoteliales y así reparar la denudación endotelial progresiva producida en aterogénesis inducida por hiperfibrinogenemia. (28, 29)

Estudios experimentales de otros autores demuestran que la vitamina E previene el daño endotelial resultante de ERO, ERN y LDL oxidadas (oxLDL), ya que la suplementación oral de la vitamina incrementa el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en las LDL y de esta

manera aumenta la resistencia a la oxidación de LDL y disminuye la citotoxicidad a las oxLDL en células endoteliales y que el  $\alpha$ -tocoferol bloquea los primeros acontecimientos intracelulares, como el incremento de calcio, provocados por oxLDL en cultivos de células endoteliales. (28)

Mientras que la disminución del engrosamiento intimal podría estar asociado con la inhibición de la proliferación y el crecimiento de las células musculares lisas vasculares, que es el efecto más importante que tiene la vitamina E a este nivel, dicho acontecimiento también estaría relacionado con la reversión de la protrusión de la pared vascular hacia la luz y el estrechamiento de la luz arterial.

A pesar de los múltiples estudios epidemiológicos acerca de la vitamina E, son meramente observacionales y en ninguno queda claro cuál sería el mecanismo por el cual la vitamina E produce efectos beneficiosos en pacientes con patologías cardiovasculares.

Los resultados de este trabajo demostrarían que, para ejercer su mecanismo antioxidante, la vitamina E necesita un fenómeno epiinflamatorio asociado con estrés oxidativo en la pared vascular, por lo cual debería indicarse como prevención primaria en la aterosclerosis subclínica.

---

## SUMMARY

### Antioxidant Role of Vitamin E in Atherogenesis Induced by Hyperfibrinogenemia

We used an experimental model of atherogenesis to evaluate the effect of vitamin E on oxidative stress induced by hyperfibrinogenemia (HF) and the possible normalization of oxidative stress markers. The following variables were studied: nitric oxide (NO), L-citrulline, superoxide dismutase (SOD) activity and regression of histopathological lesions in the thoracic aorta. The study was performed in 36 Wistar rats that were divided into three groups of 12 rats each: A, control group; B, HF for 90 days; C, HF for 90 days + vitamin E. Hyperfibrinogenemia was induced by the injection of epinephrine (0.1 ml/day/rat) during 90 days. The dose of vitamin E was 2 mg/day/rat during 75 days. We measured the plasma levels of fibrinogen (mg/dl), NO ( $\mu$ M) and L-citrulline (mM); SOD activity (U/ml) was assayed in red cell lysates using spectrophotometry. The histopathological sections of the thoracic aorta were examined using light microscopy (LM). Statistical analysis was performed using MANOVA and Fisher's test; a p value <0.05 was considered statistically significant. Rats in group B had a significant increase in fibrinogen levels B ( $407 \pm 8.9$  mg/dl) compared to groups A ( $203 \pm 9$  mg/dl) and C ( $191.58 \pm 17.79$  mg/dl) ( $p < 0.001$ ). We observed a significant decrease in NO in group B ( $13.73 \pm 1.76$   $\mu$ M) versus groups A ( $23.58 \pm 0.08$   $\mu$ M) and C ( $26.64 \pm 3.65$   $\mu$ M) ( $p < 0.001$ ). L-citrulline increased significantly in groups B ( $4.99 \pm 0.18$  mM) and C ( $6.60 \pm 0.16$  mM) compared to group A ( $3.03 \pm 0.13$  mM) ( $p < 0.001$ ). SOD activity was greater in groups B ( $251.67 \pm 10.34$  U/ml) and C ( $304.75 \pm 10.43$  U/ml) versus group A ( $139.44 \pm 4.74$  U/ml) ( $p < 0.001$ ). Light microscopic examination revealed the presence of endothelial denudation, intimal thickening and vessel wall protrusion in group B (90%), while recovery of endothelial denudation and a 50% reduction in intimal thickening was observed in group C ( $p < 0.001$ ).

High SOD activity might be insufficient to prevent abnormalities in the oxidative stress pathway induced by HF. Vitamin E would stop the chain reaction initiated by free radicals and thus decrease the superoxide anion, stimulating the bioavailability of NO with normalization of fibrinogen plasma levels.

**Key words >** Hyperfibrinogenemia - Atherogenesis - Oxidative stress - Superoxide dismutase - Vitamin E

## BIBLIOGRAFÍA

1. Baez MC, Taran MD, Campana V, Simes JC, Pons P, Moya M. Hyperfibrinogenemia role upon oxidative stress in an experimental atherogenic model. *Revista Científica UNLaR Ciencia* 2007;1:26-33.
2. Kals J, Kampus P, Kals M, Pulges A, Teesalu R, Zilmer K, et al. Inflammation and oxidative stress are associated differently with endothelial function and arterial stiffness in healthy subjects and in patients with atherosclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;9:1-8.
3. Giannotti G, Landmesser U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz* 2007;32:568-72.
4. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 2009;73:411-8.
5. Moya M, Campana V, Gavotto A, Spitale L, Simes J, Palma JA. Lesiones en aorta de ratas producidas por hiperfibrinogenemia compatibles con aterogénesis. *Medicina* 2002;5:507.
6. Báez MC, Taran MD, Campana V, Simes JC, Pons P, Atilio-Palma J, et al. Oxidative stress markers in atherogenesis induced by hyperfibrinogenemia. *Arch Cardiol Mex* 2009;79:85-90.
7. Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol* 2008;23:381-90.
8. Lin SJ, Shyue SK, Shih MC, Chu TH, Chen YH, Ku HH, et al. Superoxide dismutase and catalase inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced human aortic smooth muscle cell proliferation: role of cell-cycle regulation, mitogen-activated protein kinases, and transcription factors. *Atherosclerosis* 2007;190:124-34.
9. Heistad DD, Wakisaka Y, Miller J, Chu Y, Pena-Silva R. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 2009;73:201-7.
10. Wu JH, Ward NC, Indrawan AP, Almeida CA, Hodgson JM, Proudfoot JM, et al. Effects of alpha-tocopherol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes. *Clin Chem* 2007;53:511-9.
11. Blé-Castillo JL, Díaz-Zagoya JC, Méndez JD. Is vitamin-E supplementation beneficial or harmful? *Gac Med Mex* 2008;144:147-54.
12. McCord JM. Superoxide dismutase, lipid peroxidation, and bell-shaped dose response curves. *Dose Response* 2008;6:223-38.
13. Robinson I, de Serna DG, Gutierrez A, Schade DS. Vitamin E in humans: an explanation of clinical trial failure. *Endocr Pract* 2006;12:576-82.
14. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine* 2007;43:4-15.
15. Honarbakhsh S, Schachter M. Vitamins and cardiovascular disease. *Br J Nutr* 2009;101:1113-31.
16. Palma JA, Enders J, de Oliva PP. Effects of epinephrine on plasma fibrinogen levels in rats submitted to tissue injury. *Experientia* 1981;7:780-2.
17. Berk BC. Novel approaches to treat oxidative stress and cardiovascular diseases. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007;118:209-14.
18. Singh U, Devaraj S. Vitamin E: inflammation and atherosclerosis. *Vitam Horm* 2007;76:519-49.
19. Ratnoff OD, Menzie AC. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J Lab Clin Med* 1957;37:316-20.
20. Schulz K, Kerber S, Kelm M. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO<sub>2</sub>- in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide* 1999;3:225-34.
21. Boyde TR, Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem* 1980;107:424-31.
22. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983;34:253-6.
23. Best LG, North KE, Li X, Palmieri V, Umans JG, MacCluer J, et al. Linkage study of fibrinogen levels: the Strong Heart Family Study. *BMC Med Genet* 2008;9:77.
24. Moya M, Campana V, Gavotto A, Spitale L, Simes J, Palma J. Simvastatin: pharmacological response in experimental hyperfibrinogenemia. *Acta Cardiol* 2005;60:159-64.
25. Devaraj S, Tang R, Adams-Huet B, Harris A, Seenivasan T, de Lemos JA, et al. Effect of high-dose alpha-tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation and carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1392-8.
26. Villacorta L, Azzi A, Zingg JM. Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. *Mol Aspects Med* 2007;28:507-37.
27. Yam ML, Abdul Hafid SR, Cheng HM, Nesaretnam K. Tocotrienols suppress proinflammatory markers and cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 macrophages. *Lipids* 2009;44:787-97.
28. Munteanu A, Zingg JM. Cellular, molecular and clinical aspects of vitamin E on atherosclerosis prevention. *Mol Aspects Med* 2007;28:538-90.
29. Behrendt D, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Kinlay S, Selwyn AP, et al. Impact of coronary endothelial function on the progression of cardiac transplant-associated arteriosclerosis: effect of anti-oxidant vitamins C and E. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:426-33.