

**Universidad de Granada
Instituto de Biotecnología
Centro de Investigación Biomédica
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud
Grupo de Investigación CTS-01: Comunicación
Inter celular**



**Evaluación del efecto protector de la atorvastatina
y la melatonina frente al daño endotelial en células
HUVEC**

José Carlos Dayoub Ruiz

Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Carlos Dayoub Ruiz
D.L.: GR 1558-2012
ISBN: 978-84-9028-012-6

Certificaciones

Dña. GERMAINE ESCAMES, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE **D. José Carlos Dayoub Ruiz**, Licenciado en Biología por la Universidad de Granada, ha realizado bajo su dirección, en el Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación Biomédica y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **Evaluación del efecto protector de la atorvastatina y la melatonina frente al daño endotelial en células HUVEC**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 18 de Noviembre de 2011

Vº Bº Director

El interesado

Germaine Escames

José Carlos Dayoub Ruiz

D. DARÍO ACUÑA-CASTROVIEJO, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE **D. José Carlos Dayoub Ruiz**, Licenciado en Biología por la Universidad de Granada, ha realizado bajo su dirección, en el Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación Biomédica y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **Evaluación del efecto protector de la atorvastatina y la melatonina frente al daño endotelial en células HUVEC**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 18 de Noviembre de 2011

Vº Bº Director

El interesado

Darío Acuña-Castroviejo

José Carlos Dayoub Ruiz

D. Indalecio Sánchez-Montesinos García, Catedrático de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE **D. José Carlos Dayoub Ruiz**, Licenciado en Biología por la Universidad de Granada, ha realizado bajo su dirección, en el Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación Biomédica y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **Evaluación del efecto protector de la atorvastatina y la melatonina frente al daño endotelial en células HUVEC**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 18 de Noviembre de 2011

Vº Bº Director

El interesado

Indalecio Sánchez Montesinos García

José Carlos Dayoub Ruiz

Financiación
y
Publicaciones

Beca y proyectos de investigación que han financiado este estudio:

Este trabajo se ha realizado en el Laboratorio del Grupo de Investigación CTS-101: Comunicación Intercelular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, en el Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada.

1. Becas disfrutadas

1. Beca predoctoral, Pfizer International. Duración: 2008-2009; 2009-2010.

2. Proyectos de Investigación que han financiado la investigación:

1. Financiado en parte por RD06/0013/0008 (RETICEF, ISCIII), y Grupo de Investigación CTS-101: Comunicación Intercelular (Junta de Andalucía).

2. Financiado por Pfizer International

3. Publicaciones científicas:

Autores: Dayoub JC, Ortiz F, López LC, Venegas C, del Pino-Zumaquero A, Roda O, Sánchez-Montesinos I, Acuña-Castroviejo D, Escames G.

Título: Synergism between melatonin and atorvastatin against endothelial cell damage induced by lipopolysaccharide.

Ref. Revista: J Pineal Res 2011; doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00892.x

Financiación: CTS-101; RD06/0013/0008; Pfizer International

Áreas: Posición/Áreas: Physiology – 5/77

F. Impacto: 5.855

PMDI: 21848991

4. Congresos:

Autores: Dayoub JC, Chahbouni M, Fernández A, Puertas A, del Pino A; Acuña-Castroviejo D, Escames G

Título: Effects of atorvastatin on endothelial nitric oxide synthase expression in huvec cells treated with LPS

Tipo de participación: Comunicación

Congreso: XXXV Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences

Publicación: Official journal of the Federation of European Physiological Societies
Lugar de Celebración: Valencia, España
Fechas de Celebración: 17/02/2009 al 20/02/2009

Autores: Roda O, Garrido JM, Esteban M, Mérida JR, Rodríguez-Vázquez JF, Mérida JA, García-Gómez S, Dayoub JC, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Sánchez-Montesinos I

Título: Effects on endothelial function of atorvastatin at high concentrations.

Tipo de participación: Comunicación

Congreso: XXIV Congress of the Spanish society of anatomy

Publicación: Official journal of the Spanish Societi of Anatomy

Lugar de Celebración: Bilbao, España

Fechas de Celebración: 09/09/2009 al 11/09/2009

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

A la doctora Germaine Escames, quien me ha guiado y ayudado durante todo el proceso de la tesis, haciendo que finalmente esta sea una realidad.

Al doctor Darío Acuña-Castroviejo, quien me acogió en el grupo de investigación, y cuyos consejos e indicaciones siempre han sido de ayuda.

Al doctor Indalecio Sánchez-Nontesinos, gracias a quien este proyecto ha sido posible.

A mis compañeros (Carmen, Ana López, Jose, Francis, Araceli, Mariam, Maribel, Ana Fernández, Laura, Alberto, Luis Carlos, Carolina, Eric, Irina, Miguel, Melquiades, Roberto y Huayqui), que siempre han mostrado una disposición inmejorable a ayudarme en todo.

A mis padres, que me han ayudado económicamente cuando lo he necesitado.

También quiero expresar mi estima a cada uno de los miembros del grupo (tanto a los que siguen en él como a los que ya lo dejaron), con quienes he pasado tantos días y he compartido tantas experiencias dentro y fuera del laboratorio durante los ya más de cuatro años que dura mi estancia en él. A todos les tengo un verdadero aprecio.

Abreviaturas

¹O₂ : oxígeno singlete	eNOS : óxido nítrico sintasa endotelial
3-OHaMT : 3-hidroximelatonina cíclica	EPCs : células progenitoras endoteliales
ADMA : dimetilarginina asimétrica	ET-1 : endotelina 1
aFGF : factor de crecimiento fibroblástico ácido	FPP : farnesilpirofosfato
AFMK : N ¹ -acetil-N ² -formil-5-metoxikinurenamina	G-6-PD : glucosa-6- fosfato deshidrogenasa
AHA : área hipotalámica anterior	GGPP : geranilgeranilpirofosfato
AMK : N-acetil-5-metoxikinurenamina	GPx : glutatión peroxidasa
aMT : melatonina	GRd : glutatión reductasa
AT1 : receptor de angiotensina subtipo 1	GSH : glutatión reducido
bFGF : factor de crecimiento fibroblástico básico	GSSG : glutatión oxidado
BH₄ : tetrahidrobiopterina	H₂O₂ : peróxido de hidrogeno
CaM : calmodulina	cHDL : colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
CAT : catalasa	HIOMT : hidroxindol-O-metiltransferasa
CIITA : transactivador del complejo principal de histocompatibilidad clase II	HMG-CoA reductasa : 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa
cLDL : colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad	hsp90 : proteína de choque térmico 90
CoQ10 : coenzima Q10	HUVEC : células endoteliales de vena de cordón umbilical humanas
COX-2 : ciclooxigenasa 2	ICAM : moléculas de adhesión intercelular
CTE : cadena de transporte electrónico	IFN-γ : interferón gamma
DDAH : dimetilarginina dimetilaminohidrolasa	IGF-1 : factor de crecimiento insulínico tipo I
EDHF : factor hiperpolarizante derivado del endotelio	IL : interleuquina
	iNOS : óxido nítrico sintasa inducible

LFA-1: antígeno-1 asociado a la función de linfocitos	PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo I
LHA: L-omega-N-hidroxiarginina	PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
LOO•: radical peroxilo	PGI2: prostaciclina
LPS: lipopolisacárido	PI3K: fosfoinositol-3-quinasa
MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1	PKC: proteína quinasa C
MHC II: complejo principal de histocompatibilidad clase II	PTM: poro de transición mitocondrial
mtcNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial constitutiva	RNS: especies reactivas de nitrógeno
mtDNA: DNA mitocondrial	ROS: especies reactivas de oxígeno
mtiNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial inducible	SHR: ratas espontáneamente hipertensas
NAT: N-acetiltransferasa	SOD: superóxido dismutasa
NF-κB: factor nuclear kappa B	TF: factor tisular
NK: natural killer	TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal	TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa
NO•: Óxido nítrico	t-PA: activador tisular del plasminógeno
NOS: óxido nítrico sintasa	VCAM: moléculas de adhesión vascular
O₂^{•-}: anión superóxido	VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
OH•: radical hidroxilo	VSMC: células musculares lisas vasculares
ONOO⁻: radical peroxinitrito	VWF: factor de Von Willebrand
oxLDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas	4-HDA: 4-hidroxi-alquenal
OXPHOS: fosforilación oxidativa	ATV: atorvastatina
PA: presión arterial	DCF: 2', 7' diclorofluoresceína
PAF: factor activador de plaquetas	

DCFH: 2',
7'diclorodihidrofluoresceína

DCFH-DA: diacetato de 2',7'-
diclorodihidrofluoresceína

DPBS: *Tampón* salino fosfatado de
Dulbecco

KRB: *tampón Krebs-Ringer-*
bicarbonato

LPO: peroxidación lipídica

MDA: malonildialdehído

NMFI: N-metil-2-fenilindol

qRT-PCR: PCR en transcripción
inversa cuantitativa

SEM: error estandar de la media

SFB: suero fetal bovino

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. EL ENDOTELIO VASCULAR	3
1.1. Estructura de la pared de los vasos sanguíneos	3
1.2. Características de las células endoteliales	4
1.3. Funciones del endotelio	8
1.3.1. Barrera selectiva	9
1.3.2. Regulación de la hemostasia	10
1.3.3. Regulación de las interacciones de los leucocitos con la pared vascular	10
1.3.4. Regulación del tono vasomotor	11
1.3.5. Regulación de la proliferación de las VSMC	11
2. EL ÓXIDO NÍTRICO EN LA FUNCIÓN ENDOTELIAL	11
2.1. Características generales de la óxido nítrico sintasa	12
2.2. Regulación de la eNOS	15
2.2.1. Expresión y transcripción de la eNOS	15
2.2.2. Localización subcelular: interacciones proteína-proteína y acilación	16
2.2.3. Regulación por Calcio/Calmodulina	17
2.2.4. Fosforilación	17
2.2.5. S-Nitrosilación	18
2.2.6. Papel de la proteína hsp90	18
2.3. Importancia de la eNOS en la función endotelial	19
2.4. Importancia de la iNOS en la función endotelial	20
3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	21
3.1. Estrés oxidativo/nitrosativo y disfunción endotelial	22
3.2. Inflamación y disfunción endotelial	23
3.3. Disfunción endotelial y aterosclerosis	24
4. ESTATINAS	26
4.1. Generalidades	26
4.2. Acción hipocolesterolemizante	27
4.3. Efectos independientes de la reducción del colesterol	29
4.3.1. Efectos de las estatinas sobre la biodisponibilidad del NO•	30
4.3.2. Otros efectos pleiotrópicos de las estatinas	31
4.4.- Efectos adversos de las estatinas y posibles mecanismos	32
4.4.1. Efectos adversos de las estatinas	32
4.4.2. Posibles mecanismos de los efectos adversos de las estatinas	33
5. LA MELATONINA	34
5.1. Generalidades	34
5.2. Metabolismo de la melatonina: Biosíntesis y degradación	35
5.3. Propiedades antioxidantes de la melatonina	39
5.4. Melatonina y sistema inmunológico	4
5.5. Melatonina y mitocondria.	43
5.6. Efectos beneficiosos de la melatonina en la enfermedad Cardiovascular	45
5.6.1. Melatonina e hipertensión	45
5.6.2. Melatonina y daño cardíaco por isquemia/reperfusión	46
5.6.3. Melatonina y aterosclerosis	47

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
1. HIPÓTESIS	51
2. OBJETIVOS	51
MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. CULTIVOS CELULARES	55
1.1. Línea celular HUVEC	55
1.2. Procedimiento para el cultivo	55
1.2.1. Preparación de medios	55
1.2.2. Manipulación de las células congeladas tras su recepción	56
1.2.3. Recuento celular	57
1.2.4. Cultivo	57
1.2.5. Criopreservación de células	58
2. TRATAMIENTOS	59
2.1. Inducción del daño endotelial	59
2.2. Estatinas	60
2.3. Melatonina	60
2.4. Grupos experimentales	60
3. METODOLOGÍA ANALÍTICA	60
3.1. Análisis de la expresión del ARNm de la eNOS mediante qRT-PCR	60
3.2. Análisis de la expresión de proteínas eNOS e iNOS mediante Western blot	62
3.3. Determinación de los niveles intracelulares de IL-6	63
3.4. Determinación de la peroxidación lipídica (LPO)	63
3.5. Cuantificación de los niveles de los ROS	64
3.6. Determinación de concentración de proteínas totales	65
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
RESULTADOS	67
1. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE LA eNOS	69
1.1. Expresión de la proteína eNOS	69
1.2. Expresión del mRNA de la eNOS	70
2. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA	71
2.1. Expresión de la proteína iNOS	
2.2. Niveles de citoquinas proinflamatorias: IL-6	73
3. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO	74
3.1. Niveles de ROS intracelulares	74
3.2. Niveles de peroxidación lipídica	75
DISCUSIÓN	77
1. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE LA eNOS	79
2. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA	81
2.1. Expresión de la proteína iNOS	81
2.2. Niveles de citoquinas proinflamatorias: IL-6	83

3. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO	86
3.1. Niveles de ROS intracelulares	86
3.2. Niveles de peroxidación lipídica	87
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	92
INDICE DE FIGURAS	
Figura 1. Efecto de la melatonina y/o atorvastatina sobre la expresión de la proteína de la eNOS en las células HUVEC incubadas con LPS	70
Figura 2. Efecto de la melatonina y/o atorvastatina sobre la expresión del ARNm de la eNOS en las células HUVEC incubadas con LPS	71
Figura 3. Efecto de la melatonina y/o atorvastatina sobre la expresión del ARNm de la iNOS en las células HUVEC incubadas con LPS	72
Figura 4. Efecto de la melatonina y/o atorvastatina sobre los niveles de IL-6 en las células HUVEC incubadas con LPS	73
Figura 5: Efecto de la melatonina y/o atorvastatina sobre los niveles de ROS en el interior de las células HUVEC incubadas con H ₂ O ₂	75
Figura 6. Efecto de la melatonina y/o atorvastatina sobre los niveles de peroxidación lipídica en las células HUVEC incubadas con LPS	76

Introducción

1. EL ENDOTELIO VASCULAR

El endotelio vascular es un tipo de epitelio plano simple de origen mesodérmico que recubre el interior de todos los vasos sanguíneos. Su localización estratégica entre la pared de los vasos y el torrente sanguíneo, permite a las células endoteliales registrar cambios hemodinámicos de la sangre como la presión o las fuerzas de rozamiento y cizallamiento, cambios en sus interacciones con las plaquetas o los leucocitos, o modificaciones de los mensajeros químicos circulantes o procedentes de células vecinas y, en consecuencia, responder a dichos cambios mediante la liberación de numerosos factores vasoactivos.

1.1. Estructura de la pared de los vasos sanguíneos

La pared de todos los vasos sanguíneos, excepto los más pequeños, presentan tres capas distintas, o tunicas, que circundan al lumen por el que circula la sangre (**Figura 1**).

La túnica mas interna es la íntima. Esta contiene al endotelio, cuyas células aplanadas (las células endoteliales) se ajustan estrechamente entre ellas formando una superficie lisa que minimiza la fricción provocada por el flujo de la sangre a través del lumen. Excepto en los vasos de menor calibre, una capa subendotelial, consistente en una membrana basal y tejido conectivo laxo, sostiene al endotelio (Rhodin y cols., 1980; Silver y cols., 1989).

La capa intermedia, la llamada túnica media, consiste principalmente en células musculares lisas dispuestas circularmente y laminas de elastina. La actividad del músculo liso está regulada por las fibras nerviosas vasomotoras simpáticas y por toda una batería de sustancias químicas. Debido a que pequeños cambios en el diámetro de los vasos influye, en gran medida, en el flujo y en la presión sanguínea, la actividad de la túnica media es crítica en la regulación de la dinámica circulatoria. Generalmente, la túnica media es la capa más gruesa en arterias, las cuales soportan la mayor responsabilidad en el mantenimiento de la presión sanguínea y de la circulación continua de la sangre (Rhodin y cols., 1980; Silver y cols., 1989).

La capa más externa de la pared de un vaso sanguíneo, la túnica externa o túnica adventicia, está compuesta, en gran parte, por fibras de colágeno laxamente dispuestas que protegen y refuerzan el vaso, y lo anclan a las estructuras circundantes. La túnica externa está infiltrada de fibras nerviosas, vasos linfáticos y, en las venas más grandes, de una red de fibras de elastina. En los vasos de mayor calibre, la túnica externa contiene un sistema de vasos sanguíneos diminutos, llamados *vasa vasorum*, que nutre al tejido más externo de la pared del vaso sanguíneo. La porción más interna, o porción luminal del vaso, obtiene sus nutrientes directamente de la sangre del lumen (Rhodin y cols., 1980; Silver y cols., 1989).

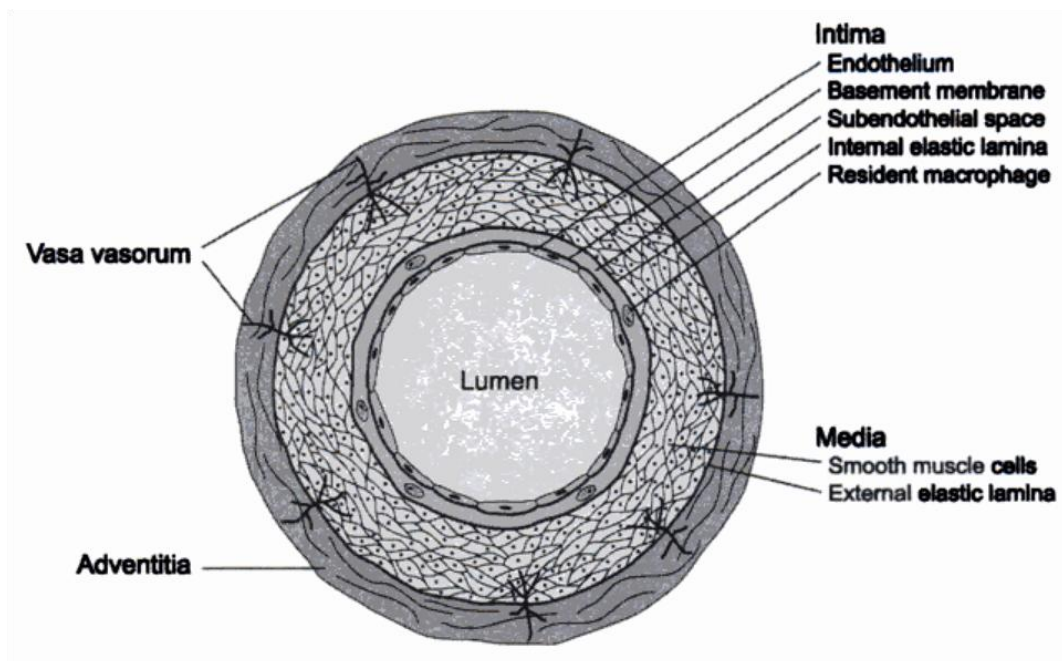


Figura 1: Sección transversal de una arteria humana (tomado del libro: *Atherosclerosis risk factors*. James j. Maciesjco. 2004)

1.2. Características de las células endoteliales

En general, las células endoteliales son poligonales, aplanadas y alargadas en la dirección del flujo sanguíneo. Su grosor no suele superar 1 μm , excepto en la región del núcleo, mientras que su diámetro oscila entre las 10 y las 50 μm (Florey, 1966).

Superficialmente, en las células endoteliales podemos distinguir tres caras: la apical o luminal, la lateral y la basal o abluminal. En su cara luminal, las células endoteliales están en contacto directo con el torrente sanguíneo y, por tanto, expuestas a fuerzas biomecánicas (fuerzas de cizallamiento y tensiones mecánicas) y a diversas células y moléculas presentes en la circulación. Esta superficie está cubierta por el glicocálix. Esta matriz rica en carbohidratos es la verdadera interfaz entre el endotelio y el flujo sanguíneo y juega un importante papel en la homeostasis vascular (Reitsma y cols., 2007). Lateralmente, las células endoteliales están en estrecho contacto entre sí mediante distintos tipos de uniones intercelulares, que comprenden las uniones oclusivas, las uniones adherentes y las uniones comunicantes. Mientras que los dos primeros tipos de uniones establecen y mantienen la adhesión entre las células y proporcionan hermeticidad al endotelio, las uniones comunicantes forman canales transmembrana que conectan el compartimento citoplasmático de células vecinas, permitiendo el intercambio directo de iones y segundos mensajeros y facilitando, por tanto, la comunicación entre las células endoteliales (Dejana y cols., 2009). Abluminalmente, la capa de células endoteliales está en contacto con una matriz extracelular, la cual es específica según el calibre del vaso y el órgano en que se encuentre, y es producida tanto por las propias células endoteliales como por las células vecinas. En su cara basal, las células endoteliales también entran en contacto con las células del músculo liso subyacentes (o con los pericitos en el caso de vasos de pequeño calibre) mediante pequeños procesos que se extienden desde estas últimas, y que atraviesan la matriz extracelular para formar las llamadas uniones mioendoteliales (Heberlein y cols., 2009).

El citoesqueleto de las células endoteliales está formado por tres tipos de filamentos proteicos: microfilamentos (o filamentos de actina), microtúbulos y filamentos intermedios. Estos proveen a las células de su forma, resistencia mecánica, organización espacial/polaridad y movimiento. También sirven para conectar complejos proteicos y orgánulos en distintas partes de la célula, y pueden proporcionar vías para el transporte entre ellas. Podemos destacar dos estructuras básicas formadas por los microfilamentos, que son: la red cortical de actina y las fibras de estrés.

La red cortical de actina se encuentra en la periferia de la célula, subyaciendo a la membrana plasmática, donde contribuye a la forma y a la estabilidad mecánica de la célula. Las fibras de estrés son haces de filamentos, del tipo de las miofibrillas, compuestos por filamentos de actina entremezclados con filamentos de miosina. Como en todos los tejidos contráctiles, su contracción y relajación depende de la concentración de Ca^{2+} intracelular y de la presencia de ATP. Su principal función es adaptar la forma de las células endoteliales a las fuerzas mecánicas ocasionadas por el flujo sanguíneo y la distensión de la pared vascular (Esper y cols., 2006).

En el citoplasma de las células endoteliales destaca la presencia de los llamados cuerpos de Weibel-Palade (Weibel y Palade, 1964), unos gránulos de almacenamiento alargados exclusivos de estas células que almacenan proteínas involucradas en la regulación de la trombosis y la inflamación. Su contenido predominante es el factor de Von Willebrand (VWF) (Wagner y cols., 1982), aunque también contienen otras proteínas como la P-selectina o la interleuquina-8 (IL-8) (**Tabla 1**). Distintos agonistas inducen la exocitosis de estos gránulos, que liberan su contenido al torrente sanguíneo (Datta y Ewenstein, 2001; Van Mourik y cols., 2002).

Otro rasgo característico de las células endoteliales son las caveolas, unos microdominios especializados de la membrana plasmática ricos en lípidos que generalmente se presentan como invaginaciones con forma de letra omega (Ω) de 50 - 100 nm de diámetro, aunque también pueden encontrarse con formas tubulares o incluso libres en el citoplasma, ya sea como vesículas individuales o como agregados (**Figura 2**). Las caveolas están consideradas como un subtipo de raft lipídico que forma invaginaciones y que tienen capacidad endocítica, con la particularidad de que presentan caveolina-1 como marcador (Stan, 2005). Aunque pueden encontrarse en diversos tipos celulares, en las células endoteliales son particularmente abundantes, donde están involucradas en el tráfico vesicular y en la transducción de señales (Frank y cols., 2003). La organización y las funciones de la caveola están mediadas por proteínas de revestimiento, llamadas caveolinas, y proteínas adaptadoras o de soporte, llamadas cavinas. Las caveolinas son los principales componentes estructurales de las caveolas, además de estar altamente integradas en la función de las mismas. Las cavinas, descubiertas recientemente,

actúan como reguladores de la función y la organización de las caveolinas. La familia de los genes de las caveolinas comprende tres miembros: Cav-1, Cav-2 y Cav-3. Cav-1 y Cav-2 se expresan predominantemente en células endoteliales, adipocitos y fibroblastos, mientras que Cav-3 se expresa principalmente en células musculares (del músculo liso, esquelético y cardíaco). En el endotelio, la caveolina 1 es el principal componente estructural de la caveola (Chidlow y Sessa, 2010).

WPB contents	Vascular function	Mechanism
VWF	Thrombosis	Links platelets to injured vessel wall
Factor XIIIa	Thrombosis	Transglutaminase cross-links fibrin
Tissue plasminogen factor	Fibrinolysis	Proenzyme that degrades fibrin
P-Selectin	Inflammation	Supports leukocyte and platelet rolling
IL-8	Inflammation	Attracts and activates neutrophils
Eotaxin	Inflammation	Recruits and activates eosinophils
α 1,3-fucosyltransferase VI	Inflammation	Synthesis of selectin ligands
CD63 (Lamp3)	Unknown	Unknown
Endothelin 1	Vasoconstriction	Interacts with endothelin receptor B
Endothelin-converting enzyme	Vasoconstriction	Cleaves big endothelin 1 into endothelin 1
Calcitonin-gene-related peptide	Vasodilation	Increases NO synthesis
Angiopoietin 2	Angiogenesis	Blocks angiopoietin 1-induced angiogenesis

Tabla 1: Contenido de los cuerpos de Weibel-Palade (Tomado de Lowenstein y cols., 2005)

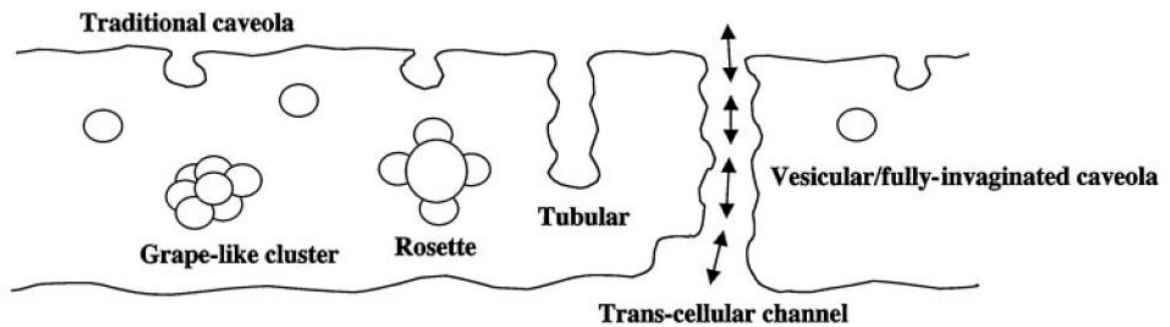


Figura 2: Caveolas de las células endoteliales

Es importante resaltar que el endotelio es un tejido con una alta heterogeneidad. Así, en primer lugar, los endotelios difieren en base a sus uniones intercelulares y, en consecuencia, pueden ser clasificados como ‘continuos’, ‘fenestrados’ o ‘discontinuos’ (Benett y cols. 1959). Además, las células endoteliales pueden diferir en términos de morfología, liberación de mediadores, presentación de antígenos o respuesta al estrés. El fenotipo del endotelio, no solo difiere entre distintas especies y órganos, sino también entre secciones vasculares consecutivas, (Risau, 1995) e incluso, entre células endoteliales adyacentes (Ying y cols., 1996).

1.3. Funciones del endotelio

En contra del concepto tradicional del endotelio como una simple barrera física selectiva que contiene la sangre y permite el intercambio de nutrientes y desechos, actualmente, el endotelio se considera un importante órgano dinámico de secreción autocrina y paracrina. El endotelio tiene, por tanto, un papel central en el mantenimiento de la homeostasia, que regula mediante la producción de múltiples sustancias activas de principal acción local (**Figura 3**).

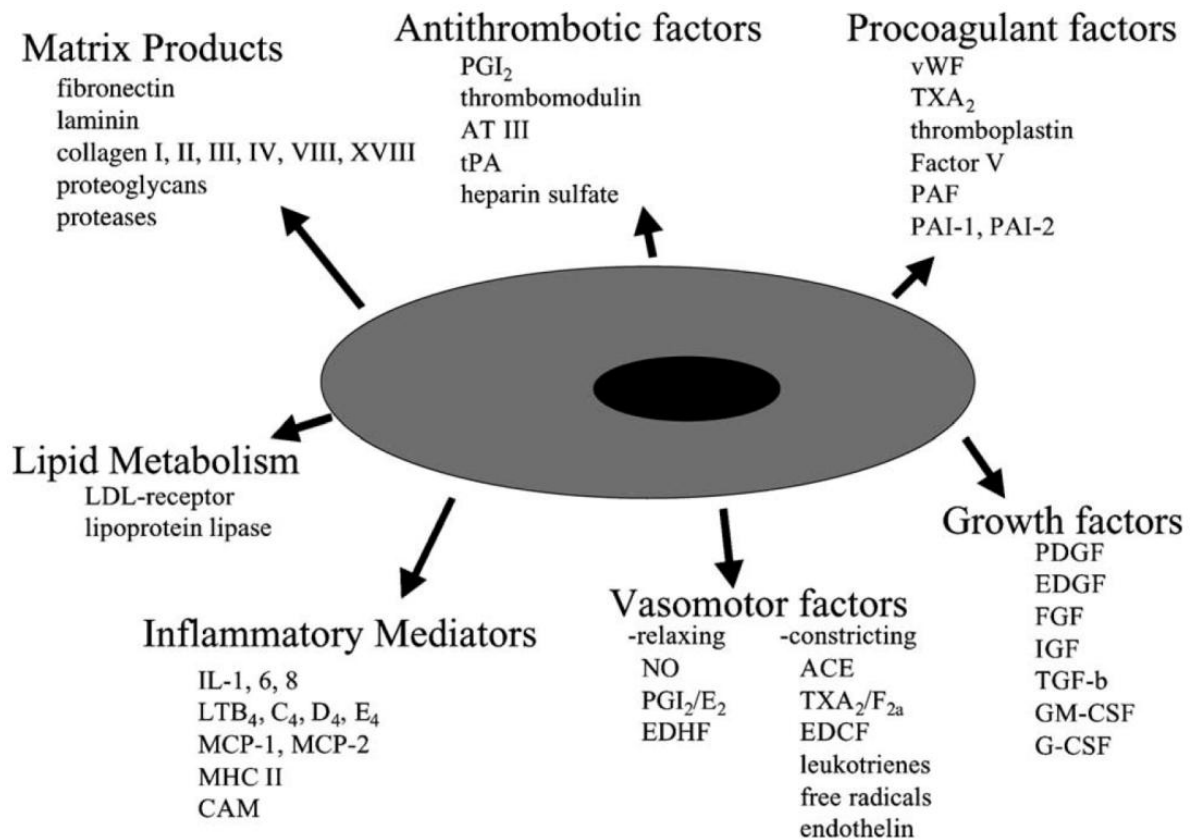


Figura 3: Productos de expresión/secreción conocidos de las células endoteliales relacionados con la fisiología vascular (Tomado de Sumpio y cols., 2002)

Las principales funciones que ejerce el endotelio son las siguientes:

1.3.1. Barrera selectiva

El endotelio normal se presenta como una monocapa compacta con escasos espacios intercelulares, formando así una barrera activa entre la sangre y los tejidos subyacentes. Varios elementos, incluyendo uniones intercelulares, proteínas de unión célula-superficie, las cargas electrostáticas de las membranas endoteliales y la composición de la membrana basal, regulan la integridad y la permeabilidad endotelial. La permeabilidad del endotelio puede ser modificada en respuesta a diferentes estímulos que provocan la apertura de las uniones intercelulares y cambios en la forma de las células endoteliales (Lum y Malik, 1996).

1.3.2. Regulación de la hemostasia

El endotelio juega un importante papel en el control de la hemostasia, ejerciendo efectos sobre las plaquetas, el sistema de coagulación y la fibrinólisis. En condiciones fisiológicas normales, muestra propiedades antiplaquetarias, anticoagulantes y fibrinolíticas, pero en el endotelio disfuncional promueve un estado protrombótico y antifibrinolítico. Los principales agentes antiplaquetarios secretados por las células endoteliales son la prostaciclina (PGI₂) y el óxido nítrico (NO[•]). Ambos aumentan el contenido de AMP cíclico (AMPc) en las plaquetas previniendo, por tanto, su agregación. Las células endoteliales también mantienen la fluidez de la sangre promoviendo numerosas vías anticoagulantes. Así, las células endoteliales sintetizan la proteína S, que es necesaria para la activación de la proteína C. Esta última inactiva a dos cofactores esenciales para la coagulación: los factores VIIIa y Va. Otro agente anticoagulante sintetizado por las células endoteliales es el inhibidor de la vía del factor tisular. Además, la superficie luminal de las células endoteliales es rica en glucosaminoglicanos tipo heparina, proporcionando así una rica fuente de antitrombina, la cual se une a esos glucosaminoglicanos. El endotelio también participa en la fibrinólisis mediante la liberación del activador tisular del plasminógeno y la uroquinasa. Entre los mediadores endoteliales que promueven la coagulación se incluyen: el inhibidor del activador del plasminógeno tipo I (PAI-1), el factor activador plaquetario (PAF), el factor de Von Willebrand (vWF) y el factor tisular (TF) (Michiels, 2003).

1.3.3. Regulación de las interacciones de los leucocitos con la pared vascular

El endotelio juega un papel importante en la regulación de los procesos inflamatorios mediante la producción de numerosas moléculas: moléculas de adhesión como la E-selectina, moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y moléculas de adhesión vascular (VCAM)). También genera quimioquinas e interleucinas como la IL-8, así como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) o el PAF. Estas moléculas median las interacciones de los leucocitos con la pared vascular y están relacionadas con la migración de los mismos al espacio

extravasular (Ait-Oufella y cols., 2010). Por su parte, el NO• inhibe la expresión de distintas moléculas de adhesión y quimiotácticas, siendo el factor endotelial con mayor capacidad antiadherente para leucocitos (Kubes y cols., 1991).

1.3.4. Regulación del tono vasomotor

El endotelio vascular juega un papel principal en la modulación del tono de la pared vascular. En respuesta a estímulos biomecánicos y químicos, las células endoteliales pueden producir y secretar distintos agentes vasodilatadores y vasoconstrictores, el balance de los cuales regula el estatus contráctil de la capa subyacente de células musculares lisas vasculares (VSMC). Los principales mediadores endoteliales con acción vasodilatadora son el NO•, la PGI₂ y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF); mientras que entre los vasoconstrictores se incluyen la endotelina-1 (ET-1), la angiotensina II, el PAF y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mass, 2009).

1.3.5. Regulación de la proliferación de las VSMC

El endotelio vascular sintetiza distintos factores de crecimiento y mitogénicos que regulan el crecimiento de las VSMC. Entre los mediadores endoteliales que estimulan el crecimiento de las VSMC se incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1), el factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), la ET-1 y la angiotensina II (Berk, 2001). Entre los inhibidores del crecimiento destaca el NO•. Este es el principal agente antiproliferativo ya que inhibe, no sólo la proliferación de las VSMC, sino también la migración de las mismas (Jeremy y cols., 1999).

2. EL OXIDO NÍTRICO EN LA FUNCIÓN ENDOTELIAL

Entre los mediadores endoteliales destaca el NO• por su importancia y diversidad de acciones. El NO•, un gas con una vida media de varios segundos, es sintetizado por la enzima oxido nítrico sintasa (NOS).

2.1. Características generales de la óxido nítrico sintasa

La NOS cataliza la oxidación estequiométrica de cinco electrones del grupo guanidina terminal de la L-arginina para producir NO^\bullet y L-citrulina. Esta enzima funciona como un dímero, consistente en dos monómeros idénticos, los cuales pueden ser divididos funcionalmente y estructuralmente en dos dominios principales: un dominio reductasa C-terminal, y un dominio oxigenasa N-terminal (**Figura 4**). El dominio C-terminal contiene sitios de unión para el NADPH, FAD y FMN (uno por cada una de estas moléculas), en estrecha homología con el citocromo P-450, mientras que el dominio oxigenasa une el grupo hemo y la tetrahydrobiopterina (BH_4), así como el sustrato L-arginina. Entre estas dos regiones se encuentra el dominio de unión a la calmodulina (CaM), que desempeña un papel clave tanto en la estructura como en la función de la enzima. La unión del grupo hemo y de la BH_4 también podría ser crucial, promoviendo la dimerización y la actividad catalítica de la enzima (Stuehr, 1997).

La NOS tiene la capacidad de sintetizar otras moléculas además del NO^\bullet , siendo la más notable de estas el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Por ejemplo, si la reducción enzimática del oxígeno se desacopla de otra función catalítica en el dominio oxigenasa, el producto de la NOS sería generalmente $\text{O}_2^{\bullet-}$. Este desacoplamiento de la enzima puede ocurrir cuando los niveles de BH_4 o de arginina son insuficientes (Berka y cols., 2004).

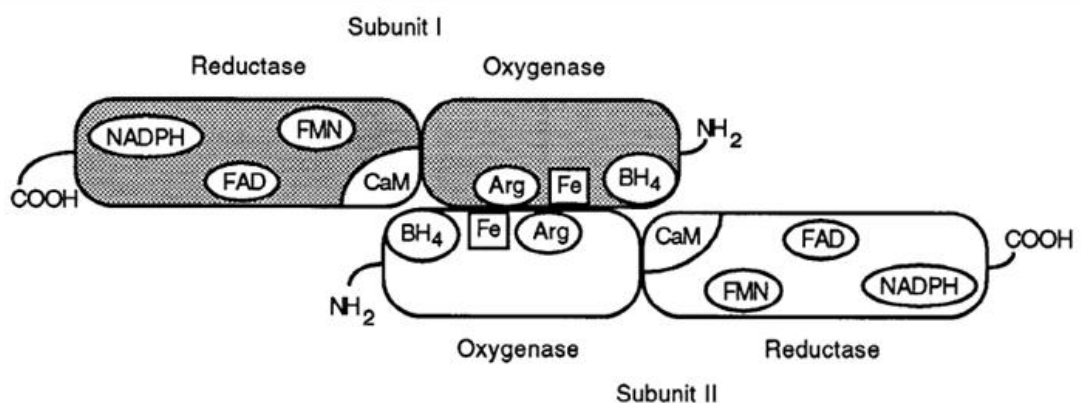


Figura 4: Esquema de la estructura del dímero de NOS, mostrando los sitios de unión de los cofactores y sustratos. (Tomado de Andrew y Mayer, 1999)

En todas las reacciones de catálisis de la NOS, los electrones son transportados dentro del dominio reductasa secuencialmente desde el NADPH al FAD y, finalmente, al FMN. La CaM parece funcionar facilitando el flujo de electrones desde el dominio reductasa al dominio oxigenasa, así como desde el FAD al FMN (Abu-Soud y cols., 1994). Ya que los electrones parecen fluir desde el dominio reductasa de un monómero de la NOS al dominio oxigenasa de otro monómero de la NOS, la dimerización de la enzima es requerida para la plena actividad enzimática (Siddhanta y cols., 1998).

La síntesis del NO• utiliza este esquema básico, pero se cree que tiene lugar a través de dos etapas (**Figura 5**). En la primera etapa, una molécula de NADPH proporciona electrones al oxígeno molecular, el cual reacciona con la L-arginina unida al enzima para liberar una molécula de agua y formar L-omega-N-hidroxiarginina (LHA) (Stuehr y cols., 2004). El LHA es el sustrato para la segunda etapa de catálisis de la NOS. En esta segunda etapa, un electrón (o 0.5 equivalentes de NADPH) es requerido para formar un segundo equivalente de oxígeno molecular reducido (Abu-Soud y cols., 1997), el cual ataca el carbono guanidino del LHA para formar un intermediario tetraedral. Este intermediario genera el grupo carboxilo de la citrulina con la concomitante expulsión de NO•. Por tanto, la estequiometría global de la catálisis del NO consume una molécula de L-arginina, 1.5 moléculas de NADPH y 2 moléculas de oxígeno molecular para generar 1 molécula de NO•, una molécula de L-citrulina y dos moléculas de agua.

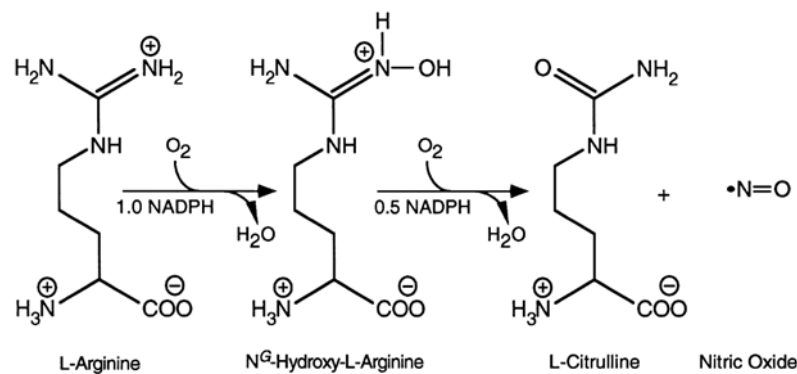


Figura 5: Reacción catalizada por la NOS.

En humanos, así como en otros animales, han sido identificadas tres isoformas principales de la NOS que pueden ser divididas en dos clases funcionales. Por una parte tenemos la NOS neuronal (nNOS o NOS-1) y la NOS endotelial (eNOS o NOS-3), ambas constitutivas y calcio-calmodulina dependientes, y que producen NO• a bajas concentraciones (nM) con fines reguladores. Por otra parte, tenemos la NOS inducible (iNOS o NOS-2), de carácter inducible y cuya actividad es independiente de la concentración de calcio. Cuando la iNOS es inducida, principalmente por estímulos proinflamatorios, produce NO• en grandes cantidades (µM) que tiene efectos citotóxicos (Albrecht y cols., 2003). Además, se sabe que en la mitocondria se encuentran dos isoformas de la NOS, una de carácter constitutivo (mtcNOS) y otra de carácter inducible (mtiNOS), que son la fuente del NO• intramitocondrial. El NO• juega un papel central en la bioenergética mitocondrial a través de la modulación del consumo de oxígeno ya que es un inhibidor reversible de la citocromo c oxidasa, y compite con el oxígeno por el mismo sitio de unión a la enzima (Brown, 2001). En condiciones fisiológicas, la mitocondria tiene un ratio [O₂]/[NO•] de 500/1000, que inhibe competitivamente a la citocromo c oxidasa en un 16-26 % (Boveris y cols., 2000).

Aunque al principio hubo controversia en torno a la naturaleza de la mtcNOS, estudios posteriores confirman que se trata de una variante de la nNOS citosólica, con la que comparte el mismo gen codificador (Kanai y cols., 2001; Elfering y cols., 2002). En cuanto a la mtiNOS, nuestro grupo de investigación demostró que proviene del mismo gen que la iNOS citosólica y, que al igual que esta, es inducida en respuesta a estímulos inflamatorios como ocurre en la sepsis (Escames y cols., 2003; López y cols., 2006). La inducción de la mtiNOS en la sepsis produce un exceso de NO• intramitocondrial, que inhibe a la citocromo c oxidasa y a la NADH-coenzima Q oxidoreductasa (Cadenas y cols., 2000), con el consecuente aumento de los ROS y de las especies reactivas de nitrógeno (RNS), produciendo daño mitocondrial y muerte celular (Alvarez y Boveris, 2004; Lizasoain y cols., 1996; Poderoso y cols., 1996).

2.2. Regulación de la eNOS

La eNOS, con un importante papel regulador a nivel endotelial, se expresa de forma constitutiva en el endotelio, si bien está sujeta a un complejo patrón de regulación, que se da a distintos niveles (**Figura 6**).

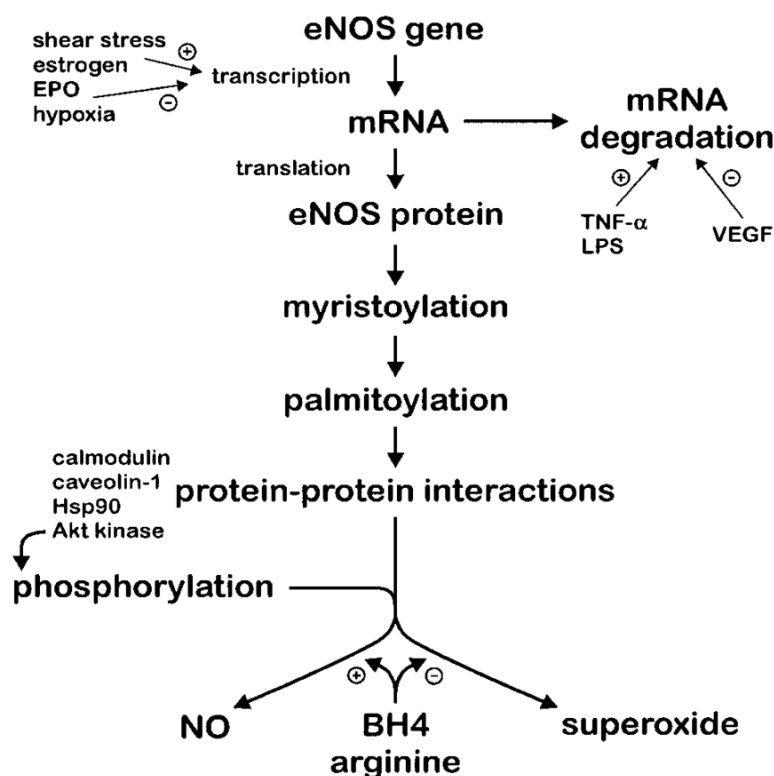


Figura 6: Eventos celulares involucrados en la regulación de la actividad de la eNOS (Tomado de Govers y Rabelink, 2001)

2.2.1. Expresión y transcripción de la eNOS

Se conocen numerosos factores que afectan a los niveles basales de transcripción del gen de la eNOS. Así, existen distintos factores que aumentan esta expresión como, por ejemplo, las fuerzas mecánicas de cizallamiento (Nishida y cols., 1992; Noris y cols., 1995), agentes que inhiben a la proteína quinasa C (PKC) (Ohara y cols., 1995), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Drummond y cols., 2000), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Bouloumie y cols., 1999), la insulina (Kuboki y cols., 2000) y el factor de crecimiento fibroblástico básico

(bFGF) (Zheng y cols., 1999). Entre los agentes que inhiben la expresión de la eNOS se encuentra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Nishida y cols., 1992), la heritropoyetina (Wang y Vaziri, 1999) y la hipoxia (McQuillan y cols., 1994).

Junto a esta regulación a nivel transcripcional, existen estímulos que afectan a la estabilidad del propio ARNm. Así, se ha visto que el TNF- α (Alonso y cols., 1997), la hipoxia (McQuillan y cols., 1994) y los lipopolisacáridos (Lu y cols., 1996) disminuyen la estabilidad del ARNm de la eNOS, mientras que ciertas condiciones de fuerzas de cizallamiento (Ziegler y cols., 1998), el VEGF y el H₂O₂ la aumentan (Bouloumie y cols., 1999; Drummond y cols., 2000).

2.2.2. Localización subcelular: interacciones proteína-proteína y acilación

En las células endoteliales, la eNOS se localiza principalmente en las caveolas, y se ha visto que esta localización es necesaria para su correcta actividad. Estos microdominios especializados de la membrana plasmática están enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, lo que les confiere una fluidez disminuida (Brown y London, 1997). Estas propiedades de fluidez distintiva de las caveolas parecen ayudar a reunir proteínas involucradas en una variedad de vías de señalización pudiendo funcionar, por tanto, facilitando las interacciones proteína-proteína y proteína-membrana necesarias para la transducción de señales celulares (Shaul y cols., 1998). La eNOS está específicamente fijada a la caveola, lo cual parece ser clave en la modulación de su actividad mediante su localización en la proximidad de moléculas señalizadoras que median su activación (Shaul y cols., 1996).

La localización de la eNOS en la caveola es dependiente de una serie de acilaciones que se producen en su molécula. En primer lugar, una miristoilación cotraduccional irreversible en su glicina N-terminal fija la enzima a la membrana plasmática (González y cols., 2002), donde se producirán palmitoilaciones postraduccionales reversibles en los residuos Cys 15 y Cys 26 (Shaul, 2002). Estas miristoilaciones y palmitoilaciones confieren a la eNOS tres grupos acilo que la anclan firmemente a la bicapa lipídica caveolar. El carácter reversible de las palmitoilaciones hace que la fijación de la eNOS a la caveola y, por extensión, su

actividad enzimática esté sujeta a un nivel adicional de control dinámico (Yeh y cols., 1999).

En la caveola, la eNOS interactúa directamente con la caveolina-1. Esta interacción inhibe tónicamente la actividad eNOS debido a la ocupación de su sitio de unión a la calmodulina (Michel y cols., 1997).

2.2.3. Regulación por Calcio/Calmodulina

La calmodulina es un activador clave de la NOS, esencial para su funcionamiento, que conecta específicamente el control de la actividad de la NOS a los niveles celulares de calcio. La eNOS y la nNOS contienen un bucle de 40-50 aminoácidos localizado dentro del dominio de unión al FMN que desestabiliza la unión de la calmodulina a niveles de calcio subfisiológicos (Fleming y Busse, 1999). En ausencia de CaM unida, la transferencia de electrones desde el dominio reductasa al dominio oxigenasa es impedida y la actividad catalítica debilitada. La eNOS es, además, inhibida por la unión de la caveolina-1 en una interacción proteína-proteína reversible que sirve para atenuar su actividad basal. Por tanto, la eNOS tiene máxima actividad sólo cuando las concentraciones intracelulares de calcio alcanzan un nivel suficientemente alto para promover la unión de la CaM y, de esta forma, desplazar a la caveolina-1, facilitando el flujo de electrones necesario para la actividad catalítica. De este modo, la concentración de calcio intracelular regula la actividad de la eNOS. Por el contrario, la iNOS permanece unida a la CaM y, en consecuencia, su actividad no depende de los niveles de calcio intracelulares (Cho y cols., 1992).

2.2.4. Fosforilación

Además de las vías de regulación que involucran a la acilación y a la calcio/CaM, en la regulación dinámica de la eNOS están implicadas numerosas vías de fosforilación y desfosforilación. Todas las isoformas de la NOS están sujetas a la regulación por fosforilación. Se sabe que la eNOS se fosforila en numerosos sitios, incluyendo la Ser 1177 y Ser 635 las cuales son estimuladoras, y la Thr 495 y Ser 116 que son inhibidoras. La proteína quinasa Akt (o proteína quinasa B) es un

importante determinante de la fosforilación de la eNOS en la Ser 1177, lo que implica una íntima participación en la activación basal de esta enzima y su estimulación mediada por agonistas (Bauer y cols., 2003). La quinasa Akt está a su vez bajo el control directo de las vías de fosforilación dependientes de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) (Vanhaesebroeck y cols., 1997). Señales provenientes de diversos tipos de agonistas de la eNOS, incluyendo proteínas (VEGF, insulina), pequeñas moléculas de acción hormonal (estrógenos, mediadores lipídicos derivados de plaquetas) y fuerzas mecánicas (de cizallamiento) pueden estimular la actividad de la eNOS a través de la vía de PI3K/Akt (Dudzinski y cols., 2006). En contraste a la fosforilación en la Ser 1177, la fosforilación en la Thr 495 parece atenuar la actividad enzimática de la eNOS mediante la prevención de la unión de la calmodulina (Fleming y cols., 2001).

2.2.5. S-Nitrosilación

La S-Nitrosilación de la eNOS ha sido recientemente reconocida como otro nivel de control dinámico postraducciona l de la eNOS (Erwin y cols., 2005). La fuente de NO• para la nitrosilación es la propia eNOS, en un proceso que ocurre cuando esta enzima está localizada en la membrana. La eNOS quiescente en células endoteliales es inhibida como resultado de S-nitrosilación tónica en dos de los residuos de cisteína, la Cys 94 y Cys 99 (Erwin y cols., 2005; Ravi y cols., 2004). El mecanismo por el cual la S-nitrosilación inhibe la actividad de la eNOS permanece desconocido.

2.2.6. Papel de la proteína hsp90

La proteína de choque térmico 90 (hsp90), una chaperona involucrada en el tráfico de proteínas y en el plegamiento, también participa en la activación de la eNOS dependiente de agonistas. La eNOS se asocia fuertemente con la hsp90 cuando esta última sufre la fosforilación reversible en una tirosina en respuesta a diversos agonistas de la eNOS (Harris y cols., 2000; Garcia-Cardena y cols., 1998). La unión de la hsp90 estimula la actividad de la eNOS aumentando su afinidad para unir CaM, equilibrando la producción de NO• en comparación con la de superóxido,

y, posiblemente, facilitando la unión del grupo hemo (Pritchard y cols., 2001; Bender y cols., 1999). La hsp90 también afecta a la actividad específica de la eNOS mediante su efecto sobre Akt. Esta proteína de choque térmico puede unirse a Akt, tanto a su forma activa como inactiva, y es requerida para la interacción de esta quinasa con la eNOS (García-Cardena y cols., 1998; Takahashi y Mendelsohn, 2003a). De esta modo, la hsp90 estimula la catálisis de la eNOS mediante el aumento de la tasa de fosforilación dependiente de Akt (Takahashi y Mendelsohn, 2003b; Fontana y cols., 2002; Sato y cols., 2000).

2.3. Importancia de la eNOS en la función endotelial

En condiciones fisiológicas, el NO• sintetizado por la eNOS y liberado por el endotelio se convierte en una molécula fundamental para el mantenimiento de la función endotelial y homeostasis vascular: actúa sobre las células musculares lisas induciendo su relajación y consecuente vasodilatación (Palmer y cols., 1987); inhibe la expresión de diferentes moléculas de adhesión y quimotácticas (selectina P, VCAM-1 ICAM-1, MCP-1, etc.) previniendo la adherencia celular a la pared vascular y disminuyendo la quimiotaxis (Kubes y cols., 1991; Zeiher y cols., 1995); promueve la angiogénesis e incrementa la supervivencia de las células endoteliales (Dimmeler y Zeiher, 1999) ; ejerce una acción antitrombótica inhibiendo la adhesión de las plaquetas al subendotelio, al mismo tiempo que inhibe la síntesis de factores implicados en la cascada de la coagulación (Radomski y cols., 1987; de Graaf y cols., 1992; Gerlach y cols., 1998), y presenta propiedades antiproliferativas y antimitóticas sobre las VSMC (Garg y Hassid, 1989) (**Figura 7**).

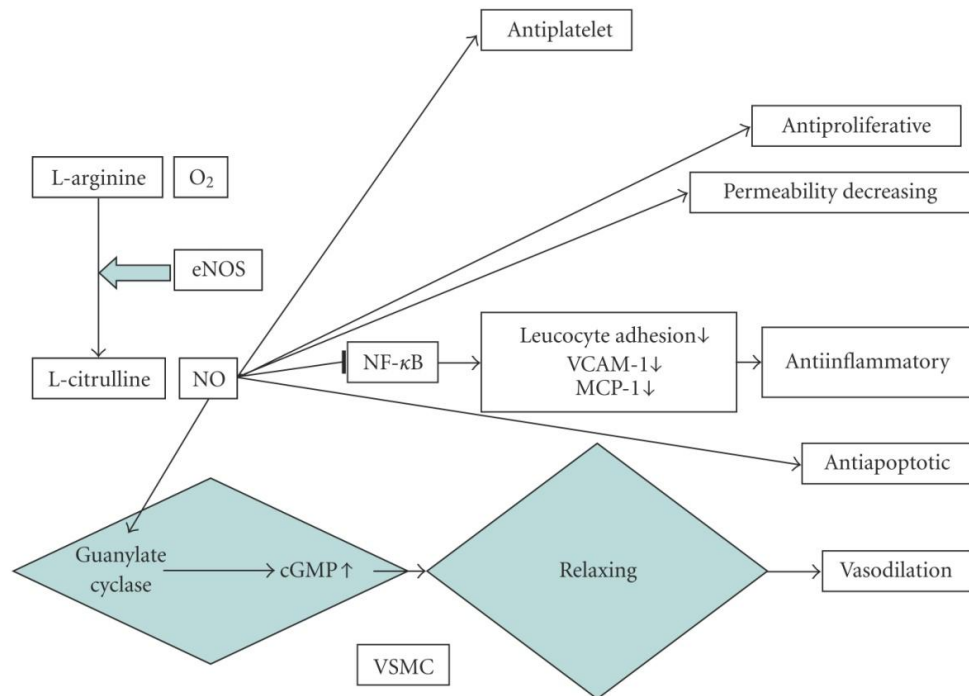


Figura 7: Propiedades del NO endotelial en la función vascular

2.4. Importancia de la iNOS en la función endotelial

Bajo condiciones fisiológicas normales, es poco probable que la iNOS tenga mucho impacto en el sistema cardiovascular debido a su baja o nula expresión, una conclusión que es apoyada por la ausencia de fenotipo en ratones knockout para la iNOS no infectados (MacMicking y cols., 1995). Sin embargo, la expresión de la iNOS puede ser inducida por mediadores inflamatorios tales como el lipopolisacárido (LPS) o citoquinas como la IL-1 β , la IL-6 y el interferón- γ (IFN- γ) en la mayoría de los tipos de células vasculares, incluyendo las células endoteliales (Gross y cols., 1991), los cardiomiocitos (Balligand y cols., 1994) y las VSMC (Geller y cols., 1993), así como en macrófagos (Buttery y cols., 1996). Esta inducción, como consecuencia de la alta liberación de NO \bullet , puede tener consecuencias adversas a nivel vascular. La toxicidad del NO \bullet está mediada en parte, por el anión peroxinitrito (ONOO $^-$). Cuando el NO \bullet se encuentra a altas concentraciones, reacciona con el O $_2^{\bullet-}$ para formar ONOO $^-$. Este anión es muy tóxico y daña lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, incluyendo todos los complejos de la cadena de transporte electrónico (Radi y cols., 1991; Pacher y cols., 2007). Además, el ONOO $^-$

puede interferir en la producción de NO•, ya que es capaz de oxidar a la BH₄ desacoplando la eNOS y, por tanto, aumentando la producción de O₂•⁻ (Kuzkaya y cols., 2003). La excesiva producción de NO• generada por la iNOS también es responsable de la profunda hipotensión que se produce en el shock séptico (Kilbourn y cols., 1990). La expresión de la iNOS por macrófagos y células musculares lisas en lesiones ateroscleróticas tiene su papel perjudicial en la aterosclerosis (Buttery y cols., 1996). Además, la expresión de la iNOS es responsable de un aumento de radicales libres y, por tanto, de la inhibición de la eNOS en los vasos tratados con mediadores de la inflamación (Kessler y cols., 1997).

3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La disfunción endotelial, que se caracteriza por una alteración en la función normal del endotelio provocando una disminución de la vasodilatación y un estado protrombótico y proinflamatorio, participa en la patogénesis de diversas enfermedades vasculares como la hipertensión arterial y la arteriosclerosis. En las últimas décadas se ha demostrado que factores de riesgo coronario bien conocidos como el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), el tabaquismo, la diabetes o la hipertensión, así como otros factores emergentes como los radicales libres, la homocisteína, las infecciones o el déficit estrogénico, provocan disfunción endotelial (Herrmann y Lerman, 2008).

El mediador más importante derivado del endotelio es el NO•, y la disminución de su biodisponibilidad causa disfunción endotelial. Como ya se ha indicado, el NO• ejerce numerosos efectos vasoprotectores, de modo que unos niveles anormalmente bajos de esta molécula a nivel endotelial perturba profundamente la homeostasis vascular. La reducción en la biodisponibilidad del NO• puede ser consecuencia tanto del incremento en su consumo como de una disminución de su producción.

3.1. Estrés oxidativo/nitrosativo y disfunción endotelial

Aunque la disfunción endotelial es un proceso multifactorial (Harrison, 1997), hoy día se sabe que el estrés oxidativo y nitrosativo contribuyen marcadamente a su establecimiento (Cai y Harrison, 2000).

Los ROS son moléculas altamente reactivas producidas constantemente en todos los organismos aerobios, en su mayor parte como consecuencia de la respiración aeróbica. Junto a los ROS, las RNS, también pueden ser generadas intracelularmente. A pesar de su toxicidad, los ROS y los RNS juegan un papel muy importante en la fisiología de los organismos. Bajo condiciones fisiológicas, la producción de ROS/RNS es compensada por un eficiente sistema antioxidante que previene el daño oxidativo/nitrosativo. Sin embargo, cuando la generación de ROS/RNS excede a las defensas antioxidantes, estas especies reactivas reaccionan con moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando muerte celular. Los mecanismos de defensa antioxidante incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión reductasa (GRd) y la glutatión peroxidasa (GPx); proteínas plasmáticas como la albumina y la ceruloplasmina; y distintas moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, la bilirrubina, el ácido úrico, las vitaminas E y C, el β -caroteno, la coenzima Q y la melatonina (Förstermann, 2008; Reiter y cols., 2003b).

Los radicales libres pueden disminuir la biodisponibilidad del NO• a nivel vascular a través de distintos mecanismos, promoviendo de este modo la disfunción endotelial (**Figura 8**).

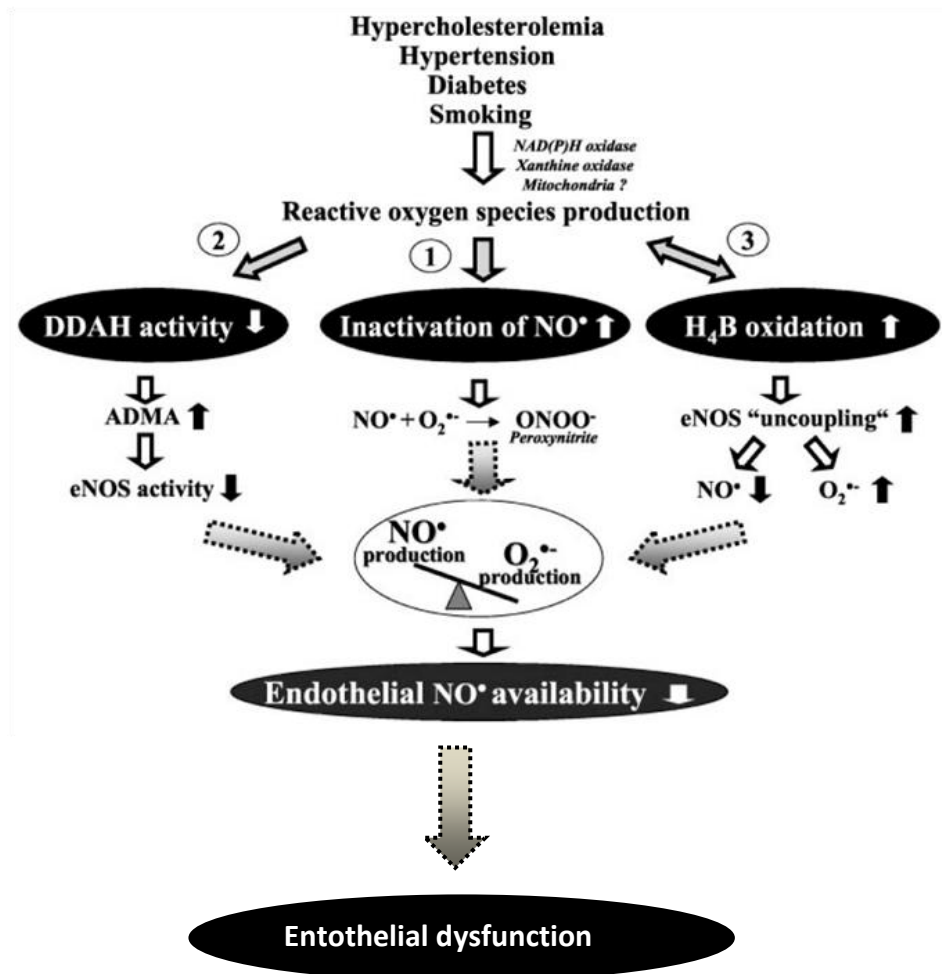


Figura 8: El estrés oxidativo puede provocar disfunción endotelial
(Modificado de Landmesser y cols. 2004).

3.2. Inflamación y disfunción endotelial

Los estados proinflamatorios también causan disfunción endotelial mediante el incremento de estrés oxidativo y la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB). El NF-κB es un factor de transcripción que se activa en respuesta a estímulos inflamatorios como el LPS, la IL-1 o el TNF-α, entra en el núcleo, e induce la expresión de una gran variedad e genes relacionados con la respuesta inflamatoria (VCAM-1, E-selectina, IL-1, IL -6, IL-8, TF, PAI-1, ciclooxigenasa 2 (COX-2), iNOS) (Heike, 1999). La activación de NF-κB parece jugar un papel clave en el desarrollo de la disfunción endotelial (de Martin y cols., 2000).

3.3. Disfunción endotelial y aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad crónica vásculo-oclusiva caracterizada por la acumulación en la intima de macrófagos, células musculares lisas y linfocitos T, además de lípidos y componentes de la matriz extracelular. Es la forma más común de arteriosclerosis, un término general que incluye varias enfermedades caracterizadas por el engrosamiento y pérdida de elasticidad de la pared arterial. La aterosclerosis afecta principalmente a las arterias elásticas (como la aorta, la carótida y las arterias ilíacas) y a las arterias musculares de medio y gran calibre (como las arterias coronarias y las poplíteas). Esta enfermedad es la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad en los países occidentales, siendo el infarto de miocardio, el aneurisma aórtico y el infarto cerebral las consecuencias más relevantes de esta patología desde el punto de vista clínico (Ross, 1999).

Uno de los procesos que primero aparece en el desarrollo de la aterosclerosis es la disfunción endotelial, la cual es ya evidente en la etapa preclínica y puede ser detectada mucho antes que los cambios estructurales que aparecen en la enfermedad arterial coronaria (Schächinger y cols., 2000). Un endotelio disfuncional predispone los vasos sanguíneos a procesos que favorecen el desarrollo de aterosclerosis. Por ejemplo, un aumento de la activación, adhesión y migración de los monocitos hacia el endotelio vascular puede provocar la acumulación de macrófagos. También aumenta la permeabilidad vascular facilitando el acceso de los monocitos y de las lipoproteínas a la pared vascular. Todo ello conlleva a una reducción de la disponibilidad de vasodilatadores disminuyendo, por tanto, el flujo sanguíneo y ayudando a la adhesión y migración de los monocitos. De acuerdo a la migración de los monocitos, hay varias etapas en el desarrollo de una lesión aterosclerótica (**Figura 9**). En la pared vascular, los macrófagos pueden capturar y almacenar lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL), transformándose en células espumosas y creando la característica estría grasa de una lesión aterosclerótica temprana. La liberación de factores de crecimiento por parte de estas células inflamatorias puede causar la proliferación de las VSMC en la intima, aumentando el tamaño de la lesión y disminuyendo el diámetro del lumen. Finalmente, la liberación de metaloproteasas de la matriz por los leucocitos puede romper el colágeno y causar la desestabilización y ruptura de

la placa, dando lugar a la formación de trombos y desencadenando eventos cardiovasculares agudos (Laufs, 2003).

Los principales factores de riesgo de aterosclerosis están relacionados con el aumento del estrés oxidativo y con el aumento de lípidos en sangre, principalmente de cLDL.

Aunque los factores de riesgo no lipídicos pueden causar disfunción endotelial, parece que la aterosclerosis solamente se desarrolla en el marco de los desordenes lipídicos. Los niveles altos de cLDL parece ser la condición *sine qua non* de la aterosclerosis. Sin embargo el cLDL nativo, por sí mismo, no parece ser suficiente para desencadenar esta patología, sino que tiene que ir acompañado de un proceso de oxidación. Las LDL oxidadas están consideradas unas moléculas altamente aterogénicas que contribuyen tanto al inicio como a la progresión de la lesión aterosclerótica a través de distintos mecanismos, incluyendo sus propiedades proinflamatorias, inmunogénicas y citotóxicas (Joseph y cols., 2001). Junto a la oxidación de las LDL, otros fenómenos de oxidación están involucrados en desarrollo de la aterosclerosis. Dado el importante componente oxidativo de esta patología, el uso de antioxidantes puede representar un complemento importante en el tratamiento de las lesiones ateroscleróticas.

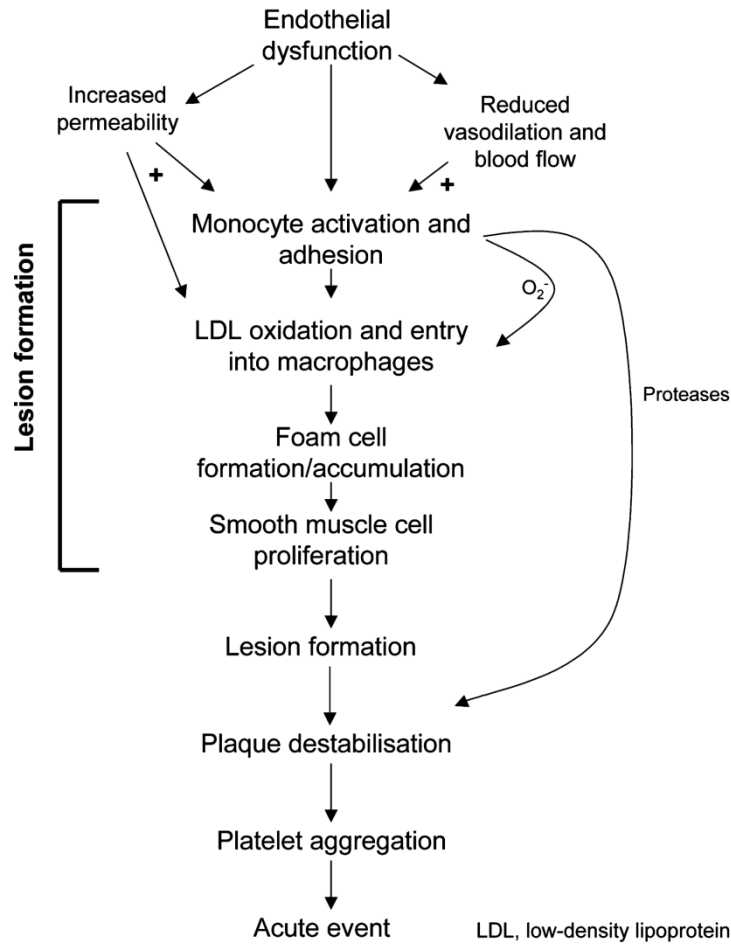


Figura 9: Esquema mediante cual los factores de riesgo cardiovasculares pueden provocar aterosclerosis a través de la disfunción endotelial (Tomado de Lauf, 2003)

4.- ESTATINAS

4.1. Generalidades

En 1976 se aisló la primera estatina, la mevastatina, a partir del hongo *Penicillium citrinum*. Poco después, se aisló la lovastatina que se convertiría en la primera estatina comercializada en 1987. Más tarde aparecieron en el mercado las estatinas sintéticas.

Actualmente son siete las estatinas usadas en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Unas son derivadas de fermentación: lovastatina,

pravastatina, simvastatina; y otras son sintéticas: fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina y pitavastatina (**Figura 10**).

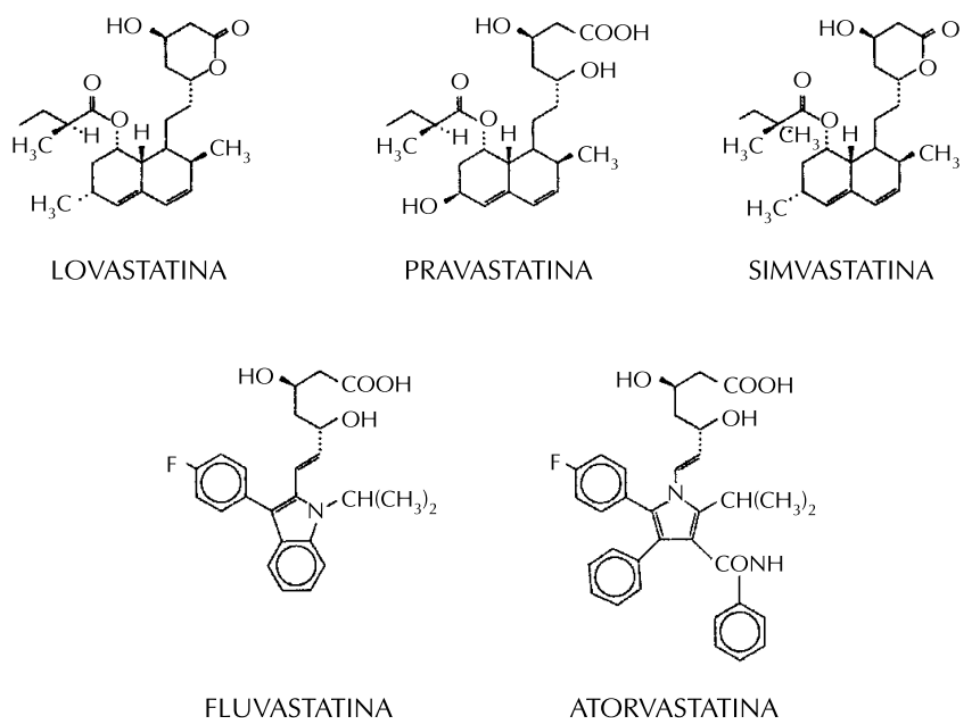


Figura 10. Estructura química de las estatinas

4.2. Acción hipocolesterolemia

La acción hipocolesterolemia de las estatinas se basa en su capacidad para inhibir a la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), actuando, por tanto, en el paso limitante de la síntesis de colesterol al interrumpir la génesis de ácido mevalónico (**Figura 11**).

Todas las estatinas comparten un dominio tipo HMG e inhiben a la reductasa por el mismo mecanismo de inhibición competitiva reversible. Este dominio hidrofóbico ocupa el sitio de unión al HMG de la enzima bloqueando el acceso de su sustrato. La estrecha unión que se da entre la estatina y la HMG-CoA reductasa es posible gracias al gran número de interacciones de Van der Waals que se forman (Istvan y Deisenhofer, 2001).

De los fármacos hipolipemiantes existentes actualmente, las estatinas son los más eficaces y los más utilizados. En el año 2000 se estimaba que un 2,89% de

la población española consumía fármacos hipolipemiantes, de los cuales, el 85,5% consumía estatinas (Siles y cols., 2001). Además de su efecto en la disminución del colesterol LDL plasmático, las estatinas parecen provocar, aunque más levemente, un aumento de los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y una disminución de los triglicéridos (Jones y cols., 1998).

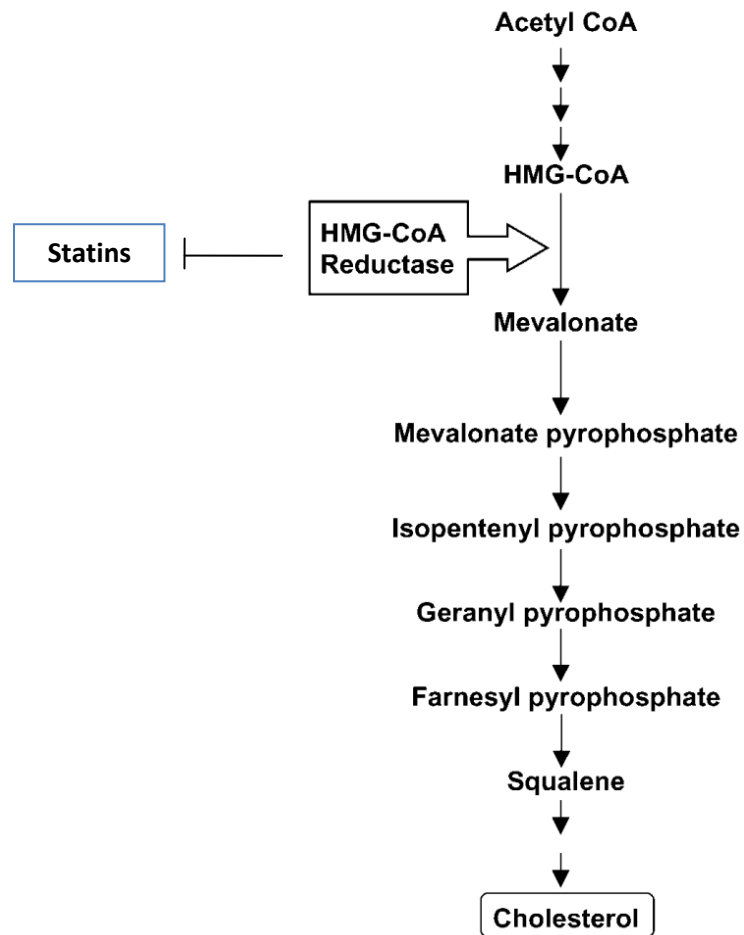


Figura 11. Inhibición de la síntesis de colesterol por las estatinas

Los ensayos clínicos realizados han demostrado que el tratamiento con estatinas mejora de forma importante el perfil lipídico frente a placebo, al disminuir los niveles de cLDL y de triglicéridos y aumentar el cHDL. Estas acciones implican una disminución de la progresión de las lesiones ateroscleróticas ya presentes, una inducción de la regresión de la lesión y se retarda el desarrollo de nuevas lesiones, disminuyendo el número de eventos clínicos agudos.

En cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical humanas (HUVEC) también se ha comprobado que las estatinas pueden reducir los niveles de cLDL entre el 24 y el 60 % (Buckett y cols., 2000).

4.3. Efectos independientes de la reducción del colesterol

Recientemente se han identificado otras propiedades de las estatinas en la función vascular que son independientes de sus efectos hipocolesterolemiantes (Maron y cols., 2000; Palinski, 2001; Wang y cols., 2008). Estos efectos pleiotrópicos de las estatinas están relacionados, principalmente, con su influencia sobre la vía del mevalonato. En efecto, mediante la inhibición de la síntesis del ácido L-mevalónico, las estatinas también previenen la síntesis de importantes intermediarios isoprenoides como el farnesilpírofosfato (FPP) y el geranilgeranilpírofosfato (GGPP) (Goldstein y Brown, 1990). El FPP y el GGPP sirven de importantes anclajes lipídicos para la modificación postraduccional de una gran variedad de proteínas, incluyendo las proteínas G heterotrimericas y las proteínas de unión a GTP monoméricas pertenecientes a la familia de las Ras, Rho, Rap y Rab GTPasas. Las Ras y Rho GTPasa son los principales sustratos para la modificación postraduccional por prenilación (Van Aelst y D'Souza-Schorey, 1997; Hall, 1998). Estas proteínas oscilan entre un estado citosólico inactivo unido a GDP y un estado de membrana activo unido a GTP. En células endoteliales, la translocación de Ras desde el citoplasma a la membrana plasmática es dependiente de farnesilación, mientras que la translocación de Rho (que incluye a las proteínas RhoA, Rac, y Cdc42) es dependiente de geranilgeranilación (Laufs y cols., 1998; Laufs y Liao, 1998).

Mediante la inhibición de la síntesis de intermediarios isoprenoides, las estatinas previenen la isoprenilación de las GTPasas monoméricas, inhibiendo la síntesis de moléculas señalizadoras y dando lugar a distintos efectos en la función celular, que explican casi todos los efectos pleiotrópicos reconocidos de las estatinas (**Figura 12**).

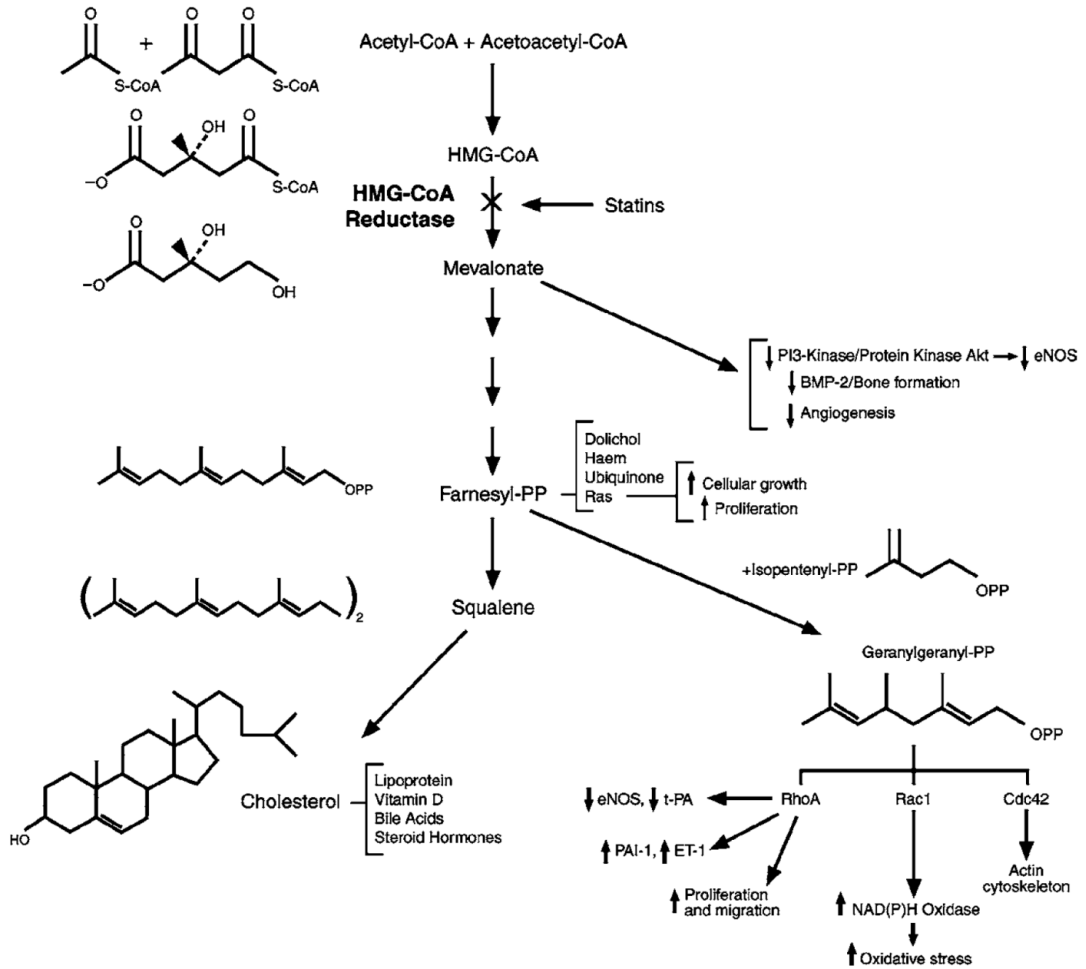


Figura 12: Esquema de la biosíntesis del colesterol mostrando los efectos de la inhibición de la HMG-CoA reductasa por las estatinas. La disminución de la isoprenilación de moléculas señalizadoras como Ras, Rho y Rac, da lugar a la modulación de varias vías señalizadoras (Tomado de Liao y Laufs, 2005)

4.3.1. Efectos de las estatinas sobre la biodisponibilidad del NO•

Una característica distintiva de la disfunción endotelial es la reducción de la biodisponibilidad de NO•. Hay distintos mecanismos por los que las estatinas pueden aumentar la biodisponibilidad de NO•. En primer lugar, las estatinas aumentan la expresión de la eNOS mediante la prolongación de la vida media del ARNm. Esto es consecuencia de la inhibición de la geranilgeranilación de Rho A, el cual, en su forma activa da lugar a reorganizaciones del citoesqueleto de actina que regulan negativamente la estabilidad del ARNm de la eNOS (Laufs y Liao 1998). Las estatinas también pueden inducir rápidamente la fosforilación y activación de la

eNOS en las células endoteliales a través de la vía PI3K/Akt, que es dependiente de la síntesis de mevalonato (Dimmeler y cols., 1999). Otro mecanismo por el que las estatinas pueden aumentar la actividad de la eNOS es mediante la disminución de la abundancia de la caveolina-1, la proteína integral de membrana presente en la caveola que se une a la eNOS inhibiéndola. Esta reducción de la abundancia de la caveolina 1 parece ser un efecto secundario a la disminución de los niveles de colesterol por parte de las estatinas (Plenz y cols., 2004).

Una de las principales fuentes de ROS en las células endoteliales es la enzima NADPH oxidasa, que produce iones superóxido. Las estatinas ejercen una acción antioxidante mediante la inhibición de la activación dependiente de geranylgeranylpirofosfato de Rac1, la cual está involucrada en la activación de la NADPH oxidasa. Al inhibir la producción de $O_2^{\bullet-}$ por la NADPH oxidasa, las estatinas pueden disminuir la pérdida de NO^{\bullet} causada por su reacción con $O_2^{\bullet-}$ para formar $ONOO^-$ (Wagner y cols., 2000).

4.3.2. Otros efectos pleiotrópicos de las estatinas

Junto a los efectos pleiotrópicos que implican un aumento de la disponibilidad de NO^{\bullet} , las estatinas poseen propiedades colesterol-independiente adicionales que pueden mejorar la función vascular.

Varios agente vasoconstrictores, como la ET-1 o la angiotensina II, contrarrestan los efectos vasodilatadores del NO^{\bullet} y pueden contribuir al desarrollo de la aterosclerosis. La ET-1 actúa además como un potente mitógeno, que promueve la formación de nueva intima y la proliferación de células musculares lisas (Yang y cols., 1999). Se ha encontrado que los niveles de ET-1 están elevados en pacientes con aterosclerosis severa. (Lerman y cols., 1991). Las estatinas inhiben la expresión de prepro ET-1 (Hernandez-Perera y cols., 2000) y disminuyen la expresión del receptor de angiotensina subtipo 1 (AT1) (Ichiki y cols., 2001; Xu y cols., 2002) de modo dependiente de RhoA.

Las estatinas también afectan al sistema fibrinolítico de las células endoteliales y las células musculares lisas (Bourcier y Libby, 2000). El PAI-1 es el principal inhibidor endógeno del activador del plasminógeno tisular. El nivel elevado de PAI-1 en sangre es un factor independiente de riesgo cardiovascular, y

está asociado con la enfermedad aterotrombótica (Huber y cols, 2001; Nordt y cols., 1999). Las estatinas inhiben la expresión de PAI-1 por un mecanismo mediado en parte a través de la vía PI3K/Akt (Mukai y cols., 2007).

Las estatinas también pueden inducir angiogénesis mediante la promoción de la movilización, proliferación y supervivencia de las células progenitoras endoteliales (EPCs) circulantes. Este efecto también depende de la activación de la vía PI3K/Akt (Dimmeler y cols., 2001)

A las estatinas también se les ha atribuido algunos efectos inmunomoduladores, como la inhibición de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) inducida por INF- γ , al parecer a través de la inhibición del promotor (promotor IV) del transactivador del MHC II (CIITA) (kwak y cols., 2000); la inhibición de la expresión de CD40 (Mulhaupt y cols., 2003); y el bloqueo selectivo de la interacción del antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1) con ICAM-1 (Weitz-Schmidt y cols., 2001). Este último efecto se da por la unión directa de la estatina con un sitio alostérico en el LFA-1, y representa uno de los pocos efectos pleiotrópicos hallados de las estatinas que no involucran a la inhibición de las GTPasas monoméricas.

4.4.- Efectos adversos de las estatinas y posibles mecanismos

4.4.1.- Efectos adversos de las estatinas

Las estatinas son fármacos utilizados a largo plazo y generalmente bien tolerados, pero tienen reacciones adversas, como pueden ser la miotoxicidad y hepatotoxicidad. Las estatinas pueden ocasionar dolores y debilidad muscular sin elevación de la creatina quinasa, generando mialgias, aunque también pueden provocar una elevación asintomática de la creatina quinasa. La miositis se da cuando coexisten la sintomatología muscular y una elevación de la creatina quinasa, siendo grave cuando supera 10 veces los valores normales. La rabdomiolisis, enfermedad aguda, fulminante y potencialmente mortal, se caracteriza por la presencia de síntomas musculares, acompañada de mioglobinemia y mioglobinuria, elevación muy acusada de la creatina quinasa (generalmente más de 100 veces el límite superior de la normalidad) y afectación

orgánica (principalmente insuficiencia renal) (Pasternak y cols., 2002; Ballantyne y cols., 2003).

La frecuencia de las mialgias y de la miositis en pacientes tratados con estatinas es aproximadamente del 5% y del 0,08 al 0,09% respectivamente. Los casos de rabdomiolisis son extremadamente raros (menos de un caso por millón). Una mención especial merece el caso de la cerivastatina, que aumenta el riesgo de rabdomiolisis de 16 a 80 veces con respecto al resto de las estatinas, sobre todo cuando se asocia a gemfibrozilo (otro fármaco hipolipemiante) o se utiliza a dosis elevadas (0,8 mg/día). Este inesperado aumento de los casos de rabdomiolisis por cerivastatina motivó su retirada del mercado en el año 2001 (Staffa y cols., 2002).

En cuanto a la hepatotoxicidad, el aumento de las transaminasas en los pacientes tratados con estatinas ocurre entre un 0,5% y un 2%, y está directamente relacionada con la dosis (Pasternak y cols., 2002). La hipertransaminemia es reversible con la suspensión del fármaco (Civeira y cols., 2002), y la progresión hacia una insuficiencia hepática ocurre en muy raras ocasiones (Andrade y cols., 2003).

4.4.2.- Posibles mecanismos de los efectos adversos de las estatinas

Poco se sabe sobre el mecanismo de acción de las estatinas para producir toxicidad muscular. Parece ser que el bloqueo de la síntesis de colesterol por las estatinas causa una reducción en el contenido de colesterol de las membranas celulares musculares esqueléticas, haciéndolas inestables. Otra teoría apunta a la disminución de farnesilpirofosfato y geranylgeranylpirofosfato. Estos compuestos son necesarios para activar las proteínas reguladoras de unión a GTP que promueven el mantenimiento y el crecimiento celular y disminuyen, a su vez, la apoptosis. Finalmente, la depleción en las mitocondrias musculares de coenzima Q10 (CoQ10), otro producto final de la vía del mevalonato, también podría causar la miopatía (Thompson y cols., 2003).

La CoQ10 o ubiquinona es un componente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial que participa en el transporte electrónico durante la fosforilación oxidativa. Una reducción en CoQ10 podría, por tanto, alterar la

función respiratoria mitocondrial (Harper y Jacobson, 2007). Se cree que alrededor del 50% de la ubiquinona es de origen exógeno y procede de las grasas ingeridas, mientras que el otro 50% es de origen endógeno. Numerosos estudios han mostrado que las estatinas disminuyen los niveles séricos de CoQ10 (Ghirlanda y cols., 1993; Mabuchi y cols., 2005), aunque la mayoría de este efecto podría explicarse por la disminución de las lipoproteínas séricas, que son los principales transportadores de la CoQ10 (Tomasetti y cols., 1999). También hay otros estudios que no han podido confirmar la disminución de los niveles de CoQ10 en musculo durante el tratamiento con estatina (Laaksonen y cols., 1995). Por tanto, las causas sobre la miopatía asociada a las estatinas aún no están claras.

5.- La melatonina

5.1. Generalidades

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (aMT) es una indolamina derivada del triptófano descrita inicialmente por McCord y Allen en 1917 (McCord y Allen, 1917) y aislada por primera vez por Lerner en 1958 (Lerner y cols., 1958), a partir de extractos de glándula pineal. Se trata de un cristal orgánico, con un punto de fusión entre 116 y 118 °C, poco soluble en agua y muy soluble en etanol (Szmuskowicz y Heinzelman, 1960). La melatonina se produce de forma ubicua en la naturaleza, y se piensa que sus acciones representan uno de los mecanismos de señalización biológica filogenéticamente más antiguos. Además, ha sido identificada en los principales taxones de organismos, incluyendo bacterias, eucariotas unicelulares, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados (Hardeland y Fuhrberg, 1996; Pandi-Perumal SR y cols., 2006) (**Figura 13**).

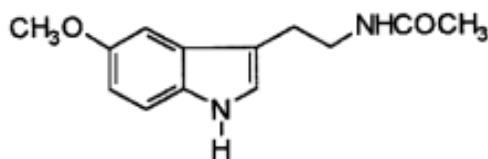


Figura 13. Estructura química de la melatonina

Inicialmente se relacionó a la melatonina con la fisiología circadiana y de la reproducción, pero estudios posteriores demostraron que la melatonina tiene otras propiedades independientes de su acción hormonal. Se demostró que la melatonina es un potente depurador de radicales libres (Tan y cols., 1993) y se identificaron y caracterizaron receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos (Acuña-Castroviejo y cols., 1993, 1994; Becker-André y cols., 1994; Hirose y cols., 1994) y células del sistema nervioso central (Becker-André y cols., 1994; Carlberg y cols., 1995; Giguere y cols., 1994). Asimismo, se demostró la capacidad de la melatonina para unirse a proteínas citosólicas como la PKC (Benítez-King y Antón-Ray, 1996), la CaM (Huerto-Delgadillo y cols., 1994; Pozo y cols., 1994; León y cols., 2000), y la calreticulina (Macías y cols., 2003), permitiendo esta interacción modular las acciones intracelulares del calcio. Por último, diversos trabajos han demostrado el importante papel que la melatonina tiene en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Martín y cols., 2000a, 2002; Acuña-Castroviejo y cols., 2001, 2002; León y cols., 2004, 2005; López y cols., 2009).

La melatonina es una molécula altamente lipofílica y, por tanto, atraviesa las membranas celulares con cierta facilidad, enriqueciendo los compartimentos subcelulares, incluyendo la mitocondria, donde se acumula a altas concentraciones (Acuña-Castroviejo y cols., 2002, 2003; León y cols., 2004).

5.2. Metabolismo de la melatonina: Biosíntesis y degradación.

La glándula pineal fue el primer lugar en el que se identificó la síntesis de melatonina. Dicha síntesis se realiza a partir de triptófano, que entra en el pinealocito por transporte activo en contra de gradiente de concentración (Sugden, 1979). El triptófano es hidroxilado y descarboxilado en dos reacciones sucesivas para dar lugar a serotonina. La serotonina capta un grupo acetilo de la N-acetiltransferasa (NAT) (enzima limitante del proceso de síntesis de la melatonina) y finalmente, a partir de la N-acetilserotonina resultante, la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) origina la molécula de melatonina (Weissbach y cols., 1960; Axelrod y Weissvach, 1961; Axelrod, 1974) (**Figura 14**).

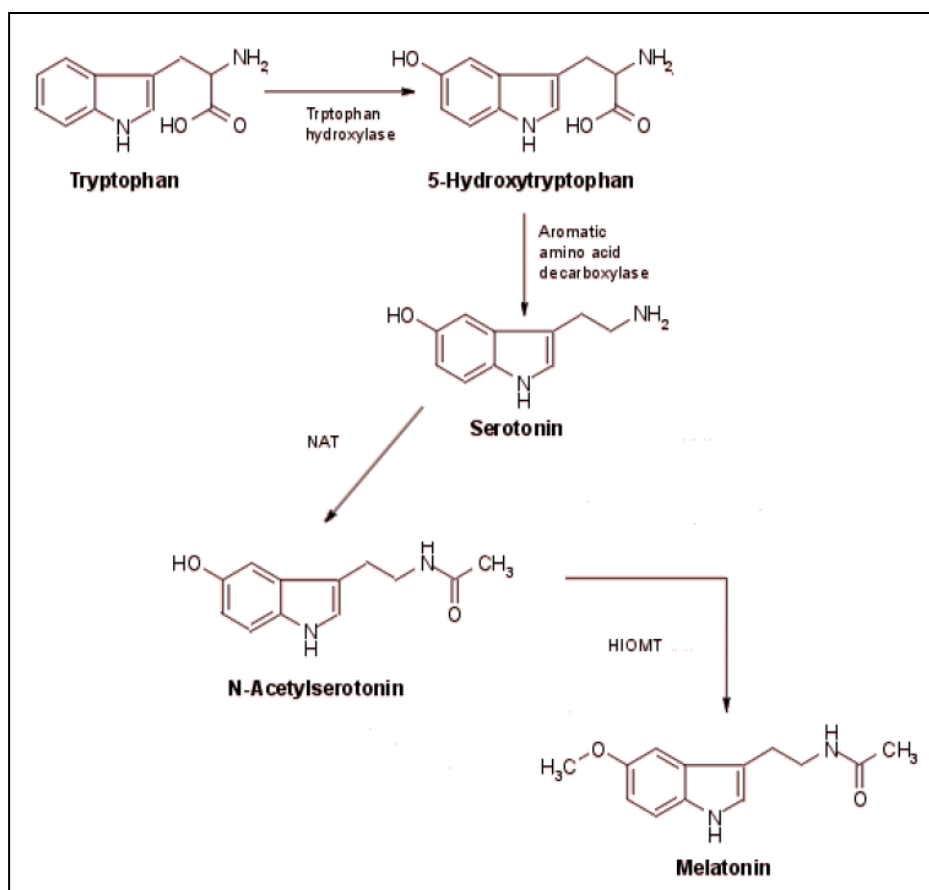


Figura 14: Síntesis de melatonina a partir de triptófano

Una vez sintetizada, la melatonina no se almacena en el pinealocito, sino que es liberada rápidamente al torrente sanguíneo (Reiter, 2003). Uno de los primeros hallazgos con respecto a la producción de melatonina en la glándula pineal es que esta hormona se sintetiza y se libera principalmente durante la noche, siguiendo un ritmo circadiano que está determinado por el ciclo de luz-oscuridad imperante (Axelrod y cols., 1965). En la especie humana, la acrofase de este ritmo se da entre las 2 y las 4 horas de la madrugada, con unos niveles en plasma que alcanzan un máximo de 0.5-1.0 nM por la noche y un mínimo de 0.025-0.050 nM durante el día (**Figura 15**).

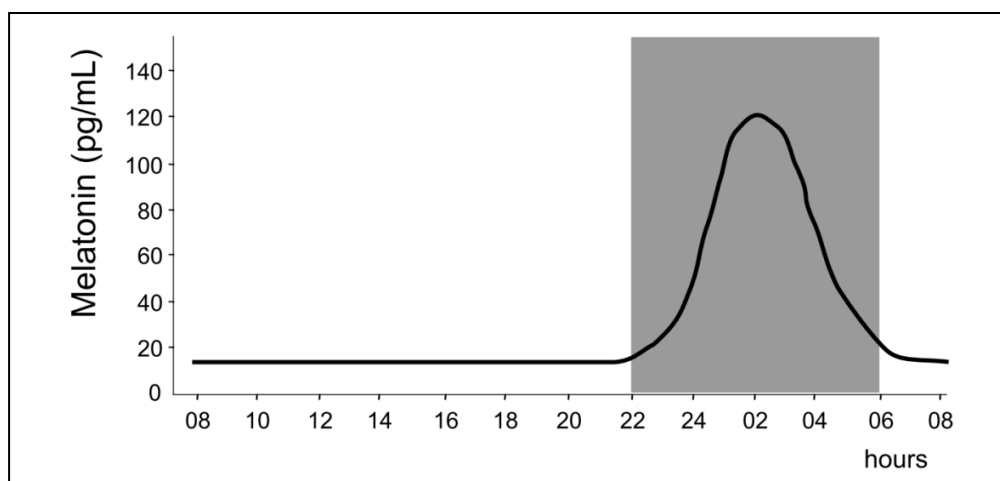


Figura 15: Perfil circadiano de la concentraciones de melatonina en suero en humanos; área gris = periodo de oscuridad

Recientemente se ha demostrado que los genes que codifican las enzimas clave de la síntesis de la melatonina (NAT e HIOMT) se encuentran en muchos tejidos del organismo (Stefulj y cols., 2001, Venegas y cols., 2011), lo que sugiere que estos tejidos pueden producir la melatonina que necesitan en cada momento, sin depender de la melatonina circulante. De hecho, en mamíferos se ha comprobado que la síntesis de melatonina se produce en una gran variedad de tejidos, incluyendo la retina, la glándula harderiana, la mucosa intestinal, el cerebelo, el epitelio respiratorio, el hígado, el riñón, el timo, el tiroides, el páncreas, los ovarios, el cuerpo carotídeo, la placenta y el endometrio y, también, en células no endocrinas como la células NK (natural killer), los eosinófilos, las plaquetas y las células endoteliales (Kvetnoy, 2002). La melatonina extrapineal se produce en cantidades de 2-3 órdenes de magnitud mayor que la pineal y, a diferencia de esta, no sale a la circulación, sino que es utilizada por el propio órgano que la produce (Reiter y Tan, 2003b).

La vida media de la melatonina en suero oscila entre 20 y 40 minutos (Ilnerova y cols, 1978; Vakkuri y cols, 1985). En el hígado, la melatonina sufre hidroxilación a 6-hidroximelatonina y se conjuga con el ión sulfato y con el ácido glucurónico, generando el sulfato y el glucuronato de la 6-hidroximelatonina que se eliminan por orina y por heces (Kopin y cols, 1961).

En otros tejidos, como la retina y el hígado, la melatonina puede sufrir desacetilación y desaminación hasta convertirse en ácido 5-metoxiindolacético y 5-metoxitriptofol (Cahill y Besharse, 1989). Otra vía importante de degradación de la melatonina tiene lugar en el cerebro, en los plexos coroideos y en la glándula pineal, donde la melatonina se metaboliza a N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK) mediante una dioxigenasa y, a su vez, el AFMK mediante una formamidasa se convierte en N-acetil-5-metoxikinurenamina (AMK), siendo esta una de las vías de metabolización más importantes de la melatonina en cerebro de mamíferos (Hirata y cols, 1974; Fujiwara y cols, 1978) (**Figura 16A**). Además, la melatonina también puede transformarse en AFMK de forma no enzimática cuando depura radicales libres (**Figura 16B**) (Hirata y cols, 1974; Fujiwara y cols, 1978).

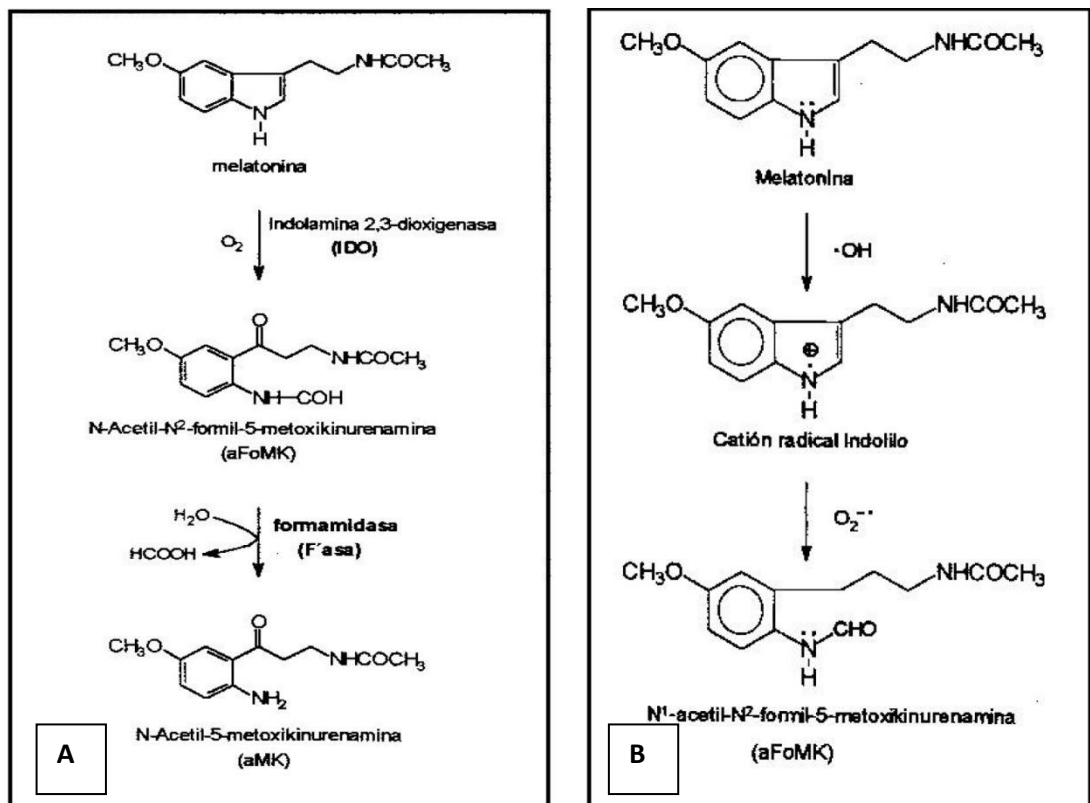


Figura 16: Degradación de la melatonina: A: vía enzimática; B: Vía oxidativa de degradación no enzimática de la melatonina

5.3. Propiedades antioxidantes de la melatonina

La melatonina es un potente antioxidante que actúa tanto de forma directa como indirecta. La melatonina, así como sus metabolitos, depuran especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003a; León y cols., 2004), como el radical $\text{HO}\cdot$ (Tan y cols., 1993; Khaldy y cols., 2000; Reiter y Tan, 2002), el radical peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) (Pieri y cols., 1994), el H_2O_2 (Tan y cols., 2000a) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Cagnoli y cols., 1995). La melatonina neutraliza al radical $\text{HO}\cdot$ porque cede un electrón al radical, transformándose en el catión indolilo (Hardeland y cols., 1993; Poeggeler y cols., 1994), el cual interacciona con el radical $\text{O}_2\cdot^-$ para generar AFMK, que se elimina por la orina (**Figura 17**).

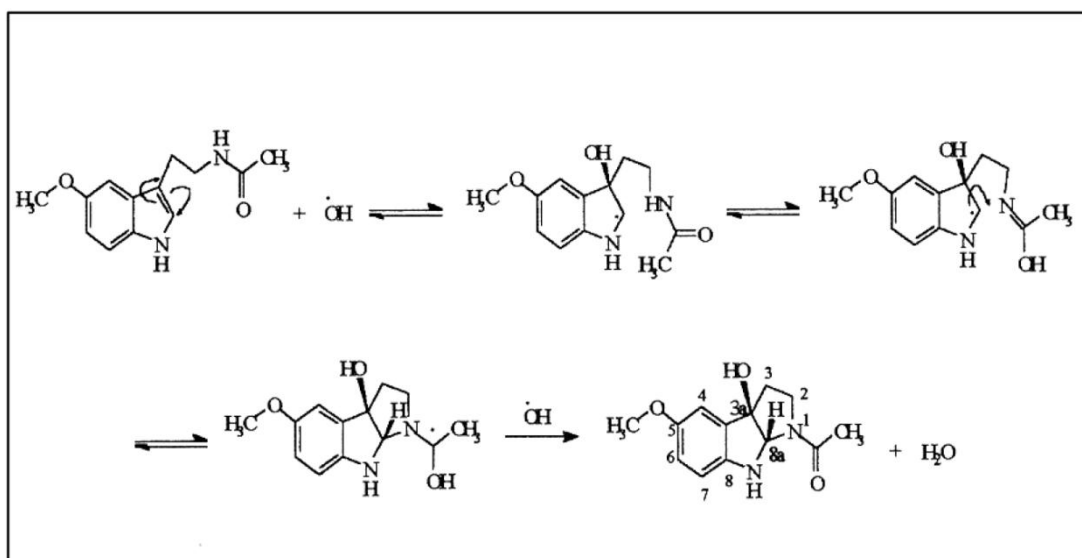


Figura 17: Vía de metabolización del radical $\text{HO}\cdot$ por la melatonina

La melatonina también puede depurar el radical $\text{HO}\cdot$ convirtiéndose en 3-hidroximelatonina cíclica (3-OHaMT), que se elimina por orina. Tanto la 3-OHaMT como el AFMK, parecen tener funciones depuradoras de agentes tóxicos (Acuña-Castroviejo y cols., 2001, 2011a; Reiter y cols., 2003a; León y cols., 2004). La melatonina también posee capacidad para neutralizar el H_2O_2 , convirtiéndose en AFMK (Tan y cols., 2000a) (**Figura 18**).

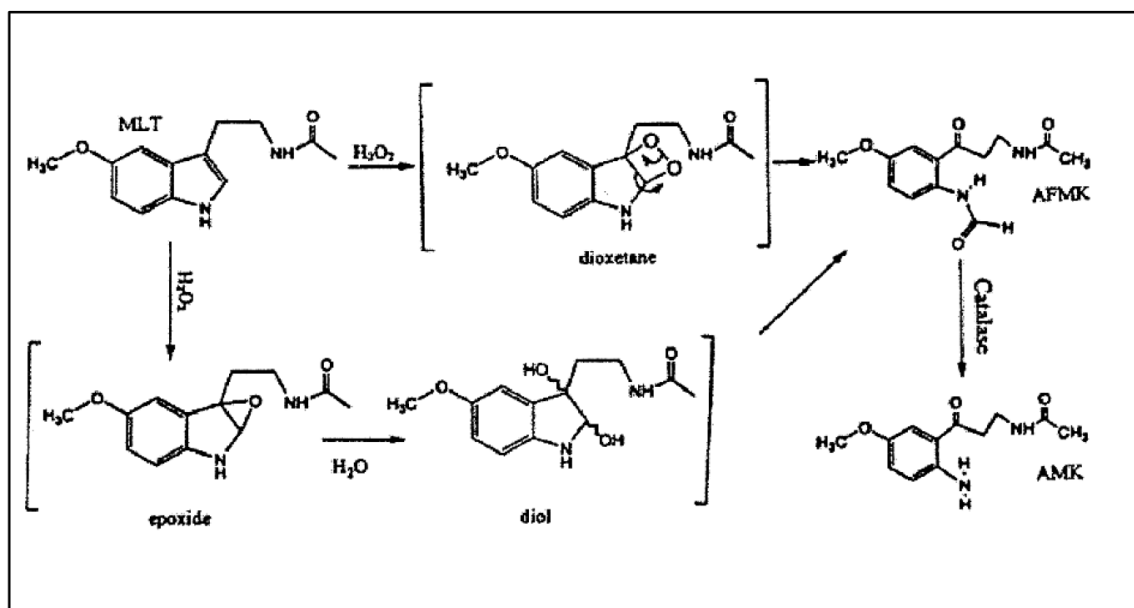


Figura 18: Vía de metabolización del H₂O₂ por la melatonina

Aunque algunos autores han demostrado que la melatonina puede depurar el radical O₂^{•-} (Marshall y cols., 1996; Zang y cols., 1998), el efecto de la melatonina sobre este radical no está claro, especialmente in vivo, ya que el mecanismo de acción de la melatonina para neutralizar este radical no se conoce (Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003a; León y cols., 2004).

La capacidad neutralizadora de la melatonina sobre la formación y la citotoxicidad del oxígeno singlete también se ha demostrado. El ¹O₂ es una forma de oxígeno de alta energía generada normalmente por reacciones de fotosensibilización de colorantes y pigmentos biológicos. Al igual que el proceso de neutralización del H₂O₂, la oxidación que la melatonina sufre en su neutralización genera el metabolito AFMK (de Almeida y cols., 2003).

La melatonina también puede depurar radicales LOO[•], interfiriendo así en la propagación de la peroxidación lipídica, aunque este hecho podría deberse más a la acción depuradora de otras especies reactivas que pueden provocar peroxidación lipídica que a la depuración en sí de radicales peroxilo. No obstante, la melatonina es altamente eficaz para reducir los niveles de peroxidación lipídica, tanto basales como estimulados por estrés oxidativo (Reiter y cols., 2003a; Escames y cols., 2006a; Rodríguez y cols., 2007; Carretero y cols., 2009; Chahbouni y cols., 2010; Acuña-Castroviejo y cols., 2011b).

Además de la capacidad intrínseca para depurar radicales libres, la melatonina posee la capacidad de estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes (Kotler y cols., 1998; Antolin y cols., 1996; Mayo y cols., 2002). La melatonina estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la GPx y de la GRd, regulando así el balance glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) (Pablos y cols., 1998; Martín y cols., 2000a; Rodríguez y cols., 2007; Carretero y cols., 2009; Acuña-Castroviejo y cols., 2011b). Además, la melatonina aumenta la producción de GSH por la estimulación de la γ -glutamylcisteina sintasa, enzima limitante en la ruta de síntesis de glutatión (Urata y cols., 1999; Rodríguez y cols., 2007; Carretero y cols., 2009; Chahbouni y cols., 2011; Acuña-Castroviejo y cols., 2011b); y estimula la glucosa-6- fosfato deshidrogenasa (G-6-PD), que es la enzima encargada de generar el NADPH, requerido por la GRd (Pierrefiche y Laborit, 1995). La melatonina también estimula otras enzimas antioxidantes como la SOD y la CAT (Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003a; León y cols., 2004; Chahbouni y cols., 2011). Además, se ha visto una acción sinérgica de esta indolamina con otros antioxidantes como la vitamina E y C (Reiter y cols., 2003a).

Por otra parte, la melatonina inhibe la expresión de enzimas prooxidantes y proinflamatorias como la iNOS (tanto citosólica como mitocondrial) y la COX-2 (Mayo y cols., 2005).

5.4. Melatonina y sistema inmunológico

La relación entre la melatonina y el sistema inmune es cada vez más evidente (Guerrero y Reiter, 2002; Carrillo-vico y cols., 2006). En situaciones en las que se produce una inhibición en la producción de melatonina se observa un estado de inmunodepresión que desaparece cuando se administra la hormona. También se ha observado que efectos inmunodepresivos producidos por algunos fármacos son contrarrestados por la melatonina (García-Maurino y cols., 1998). Aunque está clara la relación entre la melatonina y el sistema inmune, no es así la forma en la cual se regula la producción de citoquinas. Lissoni y cols. (Lissoni y cols., 1998) demostraron que la secreción de IL-2 aumenta durante la noche, de una forma concomitante a la melatonina, mientras que no existen evidencias de

secreción circadiana de otras citoquinas. García- Maurino y colaboradores (García- Maurino y cols., 1997) encontraron que in vivo, la melatonina es capaz de activar los linfocitos CD4+ aumentando la producción de IL-2 e IFN- γ , lo que podría sugerir que la melatonina pueda estar implicada en la regulación de las funciones inmunes en humanos modulando la actividad de las células CD4 y monocitos.

En condiciones fisiológicas, la acrofase de la melatonina pineal se ha vinculado con un aumento del cociente IFN- γ /IL-10, que depende a su vez del cociente Th1/Th2 (Petrovsky y Harrison, 1998). Por otro lado, la pinealectomía inhibe la producción de IL-2 y la actividad natural killer (del Gobbo y cols., 1989). En conclusión, el inicio del sueño favorece la actividad de las citoquinas Th1, que es reemplazado por un predominio más pronunciado de las Th2 durante las fases tardías del sueño (Carrillo-Vico y cols., 2004).

El mecanismo por el cual la melatonina controla la producción de citoquinas depende de la activación de sus receptores de membrana en las células T-helper (Dimitrov y cols., 2004)). Con la activación de dichos receptores, la melatonina aumenta la producción de INF- γ , IL-2, IL-6 e IL-12 (Garcia-Maurino y cols., 1999; Garcia-Maurino y cols., 2000). Además, la melatonina es sintetizada por los propios linfocitos y participa en la regulación de la IL-2 (Carrillo-Vico y cols., 2005). Ello indica que la melatonina endógena sintetizada por las células T humanas puede contribuir a la regulación de su propia producción de IL-2, ampliando la actividad biológica de la IL-2 (Lardone y cols., 2006).

Otros factores proinflamatorios de interés en la clínica humana son aquellos derivados de la activación de la respuesta inmune innata, como es el caso de la activación de la vía del NF- κ B. Estudios in vivo indican que la actividad del factor de transcripción NF- κ B en el tejido esplénico es menor durante la noche cuando la concentración endógena de melatonina es elevada, que durante el día cuando los niveles de melatonina son muy bajos. Asimismo, la administración de melatonina provoca un descenso significativo añadido de la actividad NF- κ B (Chuang y cols., 1996). En diversos estudios in vivo se ha demostrado el efecto inhibitor de la melatonina sobre la expresión del NF- κ B (Gitto y cols., 2004, 2005). La disminución de la expresión de la iNOS por la melatonina podría deberse a la disminución del NF- κ B, ya que NF- κ B induce una gran variedad de genes entre los cuales está la iNOS (Chuang y cols., 1996; Escames y cols., 2006a).

5.5. Melatonina y mitocondria.

Las mitocondrias juegan un papel central en los procesos de generación de energía dentro de la célula a través de la cadena de transporte electrónico (CTE), cuya función principal es la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Durante el metabolismo normal, la CTE es la principal fuente de ROS en la célula (Lenaz, 2001).

La melatonina, además de poder atravesar fácilmente la membrana mitocondrial, se acumula a elevadas concentraciones en dicha organela (Martín y cols, 2000a; Acuña-Castroviejo y cols, 2002, 2003; León y cols, 2004, Venegas y cols., 2011), estabiliza su membrana interna (García y cols, 1999) y mejora la actividad de la CTE (Acuña-Castroviejo y cols, 2001, 2005, 2011b; López y cols., 2009) (**Figura 19**).

Existen muchos estudios que avalan la influencia de la melatonina en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial. En condiciones normales, la melatonina es capaz de aumentar de forma dosis-dependiente la actividad de los complejos de la CTE (Martín y cols, 2000b; López y cols., 2009). La melatonina, debido a sus propiedades antioxidantes, va a mejorar la actividad de estos complejos. Además, la melatonina tiene un potencial potencial de óxido-reducción (0.74V) (Tan y cols, 2000b), que le permite interactuar con los complejos de la CTE donando y aceptando electrones, incrementando así el flujo electrónico, cosa que no sucede con otros antioxidantes (Martín y cols, 2002).

Puesto que la mitocondria es la principal fuente de radicales libres de la célula (Turrens, 2003), también debe disponer de mecanismos antioxidantes propios que le permitan mantener su equilibrio redox; el principal de ellos es el GSH, el cual elimina peróxidos con ayuda de NADPH y a través de la GPx, transformándose en GSSG, que vuelve a reducirse por acción de la GRd. Este ciclo ha de funcionar permanentemente con fin de asegurar una reserva de GSH en la mitocondria. Además, la melatonina también estimula la actividad de los enzimas que participan en el ciclo del glutatión, aumentando los niveles de GSH y disminuyendo el GSSG (Martín y cols, 2000a).

El exceso de ROS y de RNS se relaciona con el inicio de una serie de daños oxidativos irreversibles para la mitocondria que resultan en una inhibición de la

síntesis de proteínas, peroxidación de la membrana lipídica y mutaciones y deleciones en el DNA mitocondrial (mtDNA) (Halliwell y Gutteridge, 1999). Una disfunción de la mitocondria conduce a una despolarización en su membrana, un descenso en la producción de ATP y el inicio de los procesos mitocondriales proapoptóticos, como apertura del poro de transición mitocondrial (PTM), la salida de proteínas del espacio intermembranal al citosol y la subsiguiente activación de las caspasas que fragmentan el DNA nuclear (Halestrap y cols, 2002; Zamzami y Kroemer, 2001; Kim y Lemasters, 2003). La melatonina, al reducir la peroxidación lipídica de las membranas y proteger del daño oxidativo al mtDNA y nuclear, desempeña un papel antiapoptótico en la muerte celular mediada por la mitocondria (León y cols, 2004). De hecho, el efecto antiapoptótico de la melatonina se ha descrito en muchos sistemas y en diferentes situaciones (Sainz y cols, 2003).

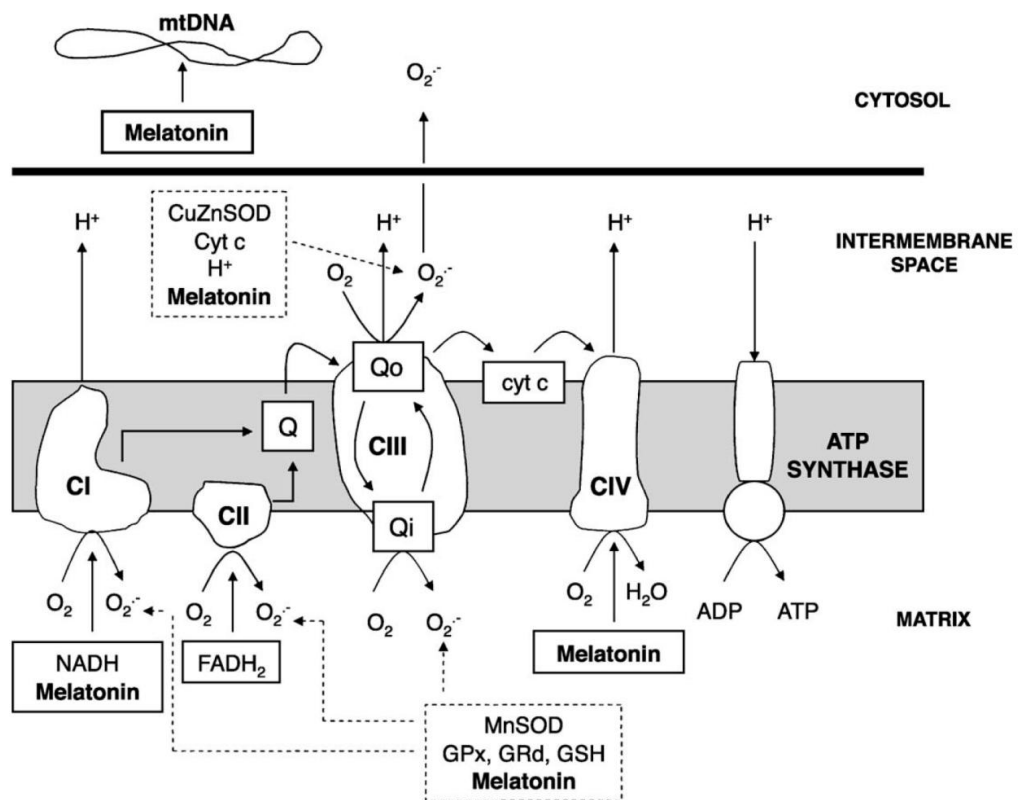


Figura 19: Componentes de la ETC. Los sistemas de defensa antioxidante controlan la producción de ROS durante el metabolismo normal. La melatonina actúa como antioxidante, pero también puede interactuar con los complejos

5.6. Efectos beneficiosos de la melatonina en la enfermedad cardiovascular

Dadas sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, es de esperar un efecto beneficioso de la melatonina sobre la disfunción endotelial y las patologías derivadas de esta. Los datos experimentales obtenidos de estudios en humanos y en roedores sugieren que la melatonina podría tener utilidad en el tratamiento de varias patologías cardiovasculares, entre las que se incluyen la hipertensión, la aterosclerosis y el daño cardíaco por isquemia/reperfusión.

5.6.1.- Melatonina e hipertensión

Numerosos experimentos han identificado a la melatonina como un agente antihipertensivo (Birau y cols., 1981; Escames y cols., 2004; Simko y Paulis, 2007; Reiter y cols., 2009).

En primer lugar, se sabe que la pinealectomía en ratas es seguida por un lento pero persistente aumento de la presión arterial (PA) (Zamboni y Zamboni-Muciaccia, 1967; Simko y Paulis, 2007), y que este es atenuado con el tratamiento diario con melatonina (Holmes y Sugden, 1976). De igual modo, en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), el tratamiento diario con melatonina reduce la PA, ya sea administrada intraperitonealmente o disuelta en el agua de bebida (Kawashima y cols., 1987; Nava y cols., 2003)

También en humanos, distintos estudios han mostrado un efecto regulador de la presión arterial por parte de la melatonina. Jonas y compañeros (Jonas y cols., 2003) mostraron que entre personas hipertensas, aquellas cuya PA descendía en un 10% o más por la noche, presentaban mayores niveles de sulfato de 6-hidroximelatonina excretada por la noche, que aquellas personas cuya PA descendía levemente o nada durante la noche. En dos estudios distintos se vio que, tanto en hombres como en mujeres hipertensos y normotensos (Scheer y cols., 2004; Cagnacci y cols., 2005), la administración oral de melatonina durante tres semanas tomada como una única dosis diaria por la noche antes de acostarse, redujo las presiones sistólica y la diastólica durante las horas de sueño sin afectar a la frecuencia cardíaca.

En otro experimento, Ersahin y colaboradores (Ersahin y cols., 2009) examinaron si la melatonina podía aliviar los cambios fisiológicos y daños moleculares en un modelo de rata con hipertensión renovascular dependiente de angiotensina II (dos riñones, un clip). Parece ser que los daños en los tejidos relacionados con la hipertensión que ocurre en los riñones así como en otros órganos incluyendo el sistema cardiovascular, son mediados por una elevada generación de radicales libres en dichos tejidos (Laurson y cols., 1997). Así, durante la hipertensión renovascular prolongada, la generación patológica de radical $O_2^{\bullet-}$ y sus derivados eventualmente causan disfunción endotelial, proliferación de las VSMC, inflamación, etc., todo lo cual contribuye al daño vascular derivado de la hipertensión. En el estudio mencionado, tras nueve meses de hipertensión renovascular provocada, el tratamiento simultáneo con melatonina limitó significativamente el desarrollo de la hipertensión y también alivió la disfunción ventricular izquierda. Además, el tratamiento diario con melatonina redujo el daño oxidativo tisular en el corazón, riñón y cerebro de las ratas hipertensas.

También se ha comprobado en ratas que la melatonina modula la PA actuando centralmente a través los receptores para melatonina MT1 y MT2 en las neuronas del área hipotalámica anterior (AHA) (Xia y cols., 2008). Otros medios por los que la melatonina podría reducir la PA incluyen la depresión de los niveles circulantes de catecolaminas, la relajación del musculo liso periférico de los vasos sanguíneos, debido a sus actividades antioxidantes, o actuando en los receptores presentes en los vasos sanguíneos periféricos (Ekmekcioglu y cols., 2001).

5.5.2.- Melatonina y daño cardiaco por isquemia/reperfusión

El reflujo de sangre en el corazón tras la privación transitoria de oxígeno tiene efectos negativos adicionales en los cardiomiocitos y en la fisiología cardiaca. Colectivamente, el daño que ocurre es conocido como daño por isquemia/reperfusión.

Los ROS y los RNS se consideran como los principales contribuyentes al daño cardiaco durante la isquemia/reperfusión. Por ello, las estrategias antioxidantes han sido frecuentemente consideradas en la prevención de este

daño. Diversos estudios en este sentido apoyan firmemente la idea de que la melatonina tiene importantes acciones cardioprotectoras, con una considerable capacidad para detener el daño molecular y mejorar los resultados funcionales después de un evento de isquemia / reperfusión (Reiter y Tan, 2003a).

Usando un modelo de corazón en funcionamiento aislado, Dobsak y compañeros (Dobsak y cols., 2003) vieron que la perfusión de una solución de melatonina (50 μ M) en corazones de rata mantenidos en isquemia durante 30 minutos, mejoró en gran medida los parámetros hemodinámicos (rendimiento coronario, aórtico y cardíaco y frecuencia cardíaca), redujo las arritmias postisquémicas durante el periodo de reperfusión y previno el desarrollo de la fibrilación ventricular fatal que se produjo en los corazones no tratados. La melatonina también redujo marcadamente la muerte de cardiomiocitos y, de manera dosis dependiente, protegió el corazón contra el daño provocado por el radical LOO^{\bullet} y redujo la peroxidación lipídica.

Dado que los radicales libres intervienen en el daño por isquemia/reperfusión al corazón y que las mitocondrias son la principal fuente de especies reactivas de oxígeno, el grupo de Petrosillo y colaboradores (Petrosillo y cols., 2006) examinó la habilidad de la melatonina para modular la función mitocondrial durante la anoxia y la reperfusión usando un modelo de corazón de rata aislado. Durante la reperfusión, distintos parámetros bioenergéticos en las mitocondrias del corazón, incluyendo el consumo de oxígeno, la actividad de los complejos I y III y la producción de H_2O_2 , así como el grado de peroxidación lipídica y el contenido y oxidación de la cardiolipina fueron alterados negativamente. Cada una de estas alteraciones fue significativamente contrarrestada por la infusión de melatonina.

5.5.3.- Melatonina y aterosclerosis

Las LDL, una vez oxidadas, son un factor clave en el inicio y en el progreso de la aterosclerosis. A través de múltiples mecanismos, las LDL oxidadas median la disfunción endotelial y la inestabilidad de la placa aterosclerótica (Landmesser y cols., 2001). Dado que la melatonina podría inhibir la formación de moléculas de adhesión derivadas del endotelio (Dominguez-Rodriguez y cols., 2008), que es un

potente antioxidante (Tan y cols., 1993, 2007; Allegra y cols., 2003), y que tiene propiedades antiinflamatorias (Carrillo-Vico y cols., 2005), podría ser beneficiosa en el tratamiento y/o prevención de la aterosclerosis. Se han realizado distintos estudios in vitro para probar la eficacia de la melatonina en la inhibición de la oxidación de las LDL. Piere y colaboradores (Piere y cols, 1996) y Kelly y Loo (Kelly y Loo, 1997) encontraron que, efectivamente, la melatonina tiene esta capacidad. Seegar y compañeros (Seegar y cols., 1997) comprobaron que los metabolitos de la melatonina eran los responsables frenar la oxidación de las LDL. También se ha comprobado que hay una relación directa entre los niveles de melatonina y los niveles en sangre de colesterol. En un estudio con ratas hipercolesterolémicas, la melatonina bajó las concentraciones de colesterol total y colesterol VLDL así como de la subfracción LDL (Hoyos y cols., 2000). Abyja y colaboradores, en cambio, no pudieron mostrar ningún efecto de la melatonina sobre la peroxidación del LDL (Abyja y cols., 1997). Con respecto a las concentraciones del cHDL en sangre, Tamura y colaboradores (Tamura y col., 2008) vieron que, la administración de 1 mg de melatonina al día a mujeres peri y postmenopáusicas aumentó significativamente sus niveles circulantes de este cHDL sin cambiar los niveles totales de colesterol.

Es obvio que la melatonina posee una serie de efectos beneficiosos en la fisiopatología cardiovascular. Considerando su baja toxicidad, la melatonina merece ser considerada para su inclusión en estudios encaminados a identificar moléculas con beneficios cardiovasculares (korkmaz y col., 2009)

Hipótesis y Objetivos

1. HIPÓTESIS

Se sabe hoy en día que parte de los efectos protectores de las estatinas frente al daño endotelial se deben a una acción directa sobre la producción de NO por dichas células endoteliales. Consideramos, por tanto, que el tratamiento con estatinas va a mejorar las vías de activación de la eNOS. Sin embargo, las estatinas presentan una serie de efectos adversos, algunos relacionados con un aumento de radicales libres.

Por otro lado, como el estrés oxidativo contribuye a la disfunción endotelial y al desarrollo de la aterosclerosis, se ha visto que los antioxidantes pueden mejorar la función endotelial. Se sabe que tanto la melatonina, como sus metabolitos, son potentes antioxidantes, y que la melatonina inhibe la COX-2 y la iNOS en procesos inflamatorios. También se ha visto que hay receptores de melatonina en arterias de muchos tejidos, lo que sugiere que la melatonina juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo.

Basándonos en estos datos, nuestra hipótesis es que la melatonina podría potenciar las acciones beneficiosas de las estatinas y reducir sus efectos adversos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Conocer si la melatonina potencia los efectos beneficiosos de la atorvastatina y reduce los efectos adversos de este fármaco, en el modelo de células HUVEC.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estudiar los efectos de la atorvastatina y/o de la melatonina sobre la expresión de la proteína eNOS, así como de su mRNA, en células HUVEC cultivadas en presencia de LPS.

2.2.2. Estudiar los efectos de la atorvastatina y/o de la melatonina sobre la respuesta inflamatoria de las células HUVEC cultivadas con LPS, mediante la determinación de la expresión de la iNOS y de los niveles de IL-6.

2.2.3. Estudiar los efectos de la atorvastatina y/o de la melatonina sobre el estrés oxidativo, mediante la determinación de los niveles de LPO, así como de la producción intracelular de radicales libres, en células HUVEC cultivadas en presencia de H₂O₂,

Material y Métodos

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Línea celular HUVEC:

Este estudio se ha realizado en cultivos de células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC) (obtenidas de "Cell Applications, INC", USA).

En cultivo, estas células crecen adheridas a la superficie del sustrato en forma de monocapa (**Figura 1**).

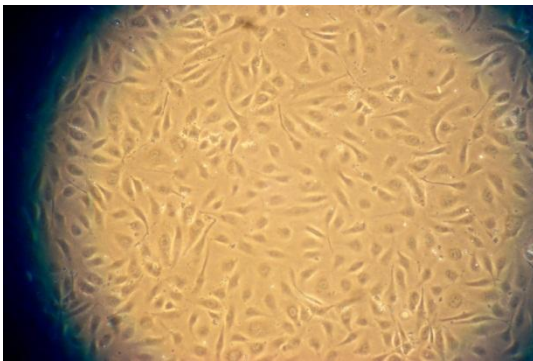


Figura 1: Células HUVEC en cultivo

1.2. Procedimiento para el cultivo

1.2.1. Preparación de medios

El medio de cultivo utilizado es el F-12K (Nutrient mixture F-12 Ham Kaighn's modification, SIGMA) suplementado con 1.5 g/l de bicarbonato sódico, 10% de suero fetal bovino (SFB) (SIGMA), 100 mg/l de heparina sódica (Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa, SIGMA), 30 mg/l de suplemento de crecimiento endotelial (endothelial cell growth supplement from bovine neural tissue, SIGMA) y 1% de solución de penicilina-estreptomicina-anfotericina B (SIGMA) (100000 unidades de penicilina, 100 mg de estreptomicina y 250 µg de anfotericina B por litro de medio de cultivo).

El DPBS (*tampón* salino fosfatado de Dulbecco) es una solución salina tamponada con fosfatos que se utiliza para lavar las células y para la dilución de reactivos.

Su composición es la siguiente:

KCl	0.2 g/l
KH ₂ PO ₄ (anhidro)	0.2 g/l
NaCl	8.0 g/l
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	1.15 g/l

1.2.2. Manipulación de las células congeladas tras su recepción

Las células se conservan congeladas en nitrógeno líquido. El medio de congelación contiene DMSO. Para evitar el daño celular, es importante que la descongelación sea rápida y que se elimine el DMSO antes de iniciar el cultivo.

Método:

1- Sacar el criovial del tanque de nitrógeno líquido y desenroscar el tapón un cuarto de rosca para liberar el nitrógeno que pudiera haber en su interior y volver a enroscarlo.

2- Descongelar el criovial rápidamente poniendo la mitad inferior de este en un baño a 37°C.

3- Lavar el exterior del criovial con etanol al 70%.

4- Traspasar el contenido del criovial a un tubo estéril y a continuación añadir de 10 a 15 ml de medio de cultivo atemperado, lentamente para que la dilución del DMSO sea progresiva.

6- Resuspender el pellet mediante pipeteo.

7- Centrifugar a 220 g durante 5 minutos.

8- Desechar el sobrenadante mediante aspiración.

9- Resuspender el pellet mediante pipeteo tras añadir 3 o 4 ml de medio.

10- Tomar una alícuota de 20 µl en un eppendorf y hacer un recuento celular.

11- Añadir el volumen necesario adicional de medio al tubo, mezclar bien mediante pipeteo y dispensarlo en frascos de cultivo a una densidad de alrededor de 8000 células/cm² y a un volumen de 0,24 ml de medio/cm².

12- Introducir los frascos en la estufa y no moverlos hasta pasadas al menos 5 o 6 horas.

1.2.3. Recuento celular

Para sembrar las células a la densidad deseada se hace un recuento celular utilizando una cámara de Neubauer. Para diferenciar entre células viables y no viables se utiliza azul tripán, que tiñe tan sólo las células no viables.

Método:

- 1- Coger una alícuota de 20-50 µl de la suspensión celular.
- 2- Diluir 1/2 con una solución de azul tripán al 0.4 % en DPBS y mezclar bien.
- 3- Esperar 5 minutos
- 4- Contar las células y calcular la concentración celular.

1.2.4. Cultivo

En cada frasco de cultivo se siembran 8000 células/cm² en medio de cultivo con suero fetal al 10%. Los cultivos se mantienen en estufa a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio de cultivo se cambia cada dos días. El subcultivo se realiza cuando la confluencia es aproximadamente del 80 %, y se trabaja siempre en campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad.

El medio se cambia periódicamente ya que los nutrientes se van consumiendo, los productos de desecho van aumentando y el pH disminuye. Para ello se retira el medio de los frascos mediante aspiración y se añade 0,24 ml/ cm² de medio fresco a 37 °C.

Las células se dividen y van cubriendo toda la superficie disponible del sustrato. Antes de llegar a este extremo, cuando la confluencia ronda el 80%, se realiza el subcultivo, que consiste en pasar las células de un frasco de cultivo a otros, de modo que la densidad celular vuelva a ser la adecuada para que las células se sigan dividiendo. Como las células están adheridas al sustrato, hay que utilizar una solución de tripsina y EDTA para despegarlas.

Método:

Todos los reactivos se usan a temperatura ambiente.

- 1- Eliminar el medio de cultivo del frasco mediante aspiración.
- 2- Lavar la monocapa de células con DPBS para eliminar los restos de medio de cultivo: añadir 0,32ml de DPBS/cm², dejar que este bañe las células durante unos segundos y a continuación retirarlo por aspiración.
- 3- Añadir 0,05 ml/cm² de solución de tripsina-EDTA (0.05 % de tripsina y 0.02% de EDTA•4Na en DPBS) y asegurarse de que toda la superficie basal del frasco queda cubierta.
- 5- Observar con el microscopio el despegado de las células.
- 6- Una vez despegadas, añadir rápidamente medio de cultivo al frasco (0,1 ml/cm²), pasar todo el contenido a un tubo estéril y resuspender.
- 7- Centrifugar a 220 g durante 5 min.
- 8- Desechar el sobrenadante por aspiración.
- 9- Resuspender el pellet mediante pipeteo tras añadir de 3 o 4 ml de medio.
- 10- Tomar una alícuota de 20 µl en un eppendorf y hacer un recuento celular.
- 11- Añadir el volumen necesario adicional de medio, mezclar bien mediante pipeteo y dispensar en frascos de cultivo a una densidad alrededor de 8000 células/cm² y a un volumen de 0,24 ml de medio/cm²
- 12- Introducir los frascos en la estufa.

1.2.5. Criopreservación de células

Con los pases, el número de frascos crece exponencialmente, haciendo de su mantenimiento una tarea cada vez más costosa. Además, siempre existe el riesgo de contaminación o de fallo de algún equipo que podría provocar la pérdida de todas las células que estamos cultivando. Por todo ello, resulta muy útil la criopreservación en nitrógeno líquido de stocks celulares. Para evitar dañar las células hay que usar un agente crioprotector, como el DMSO, y que la congelación sea lenta. El medio de congelación tiene la siguiente composición:

- 80 % de medio de cultivo sin SFB
- 20 % de SFB
- 10 % de DMSO

Método:

1- Despegar las células con tripsina-EDTA e inhibir la tripsina con medio de cultivo, siguiendo los mismos pasos que para el subcultivo (pasos 1-6).

2- Tomar una alícuota de 20 μ l y hacer un recuento celular en cámara de Neubauer.

3- Centrifugar a 220g durante 5 min.

4- Desechar el sobrenadante por aspiración.

5- Resuspender el pellet resultante en medio de congelación a razón de 2×10^6 células/ml.

6- Pasar a crioviales estériles de 1.5 ml (no llenar más de 3/4 del criovial).

7- Llevar los crioviales inmediatamente al congelador de -20° C.

8- Al día siguiente se traspasan al congelador de -80° C.

9- Al día siguiente se traspasan al tanque de nitrógeno líquido para su conservación.

2. TRATAMIENTOS

Los tratamientos se llevan a cabo cuando las células están en el cuarto pase.

2.1. Inducción del daño endotelial

En este estudio se ha utilizado LPS para inducir disfunción endotelial y daño oxidativo/nitrosativo. El LPS usado es el serotipo 055:B5 (SIGMA) de *E.coli*, y se aplica a una concentración final de 10 μ g/ml.

2.2. Estatinas

Se usa la atorvastatina (suministrada por Pfizer). La concentración utilizada es de 1 μ M.

2.3. Melatonina

La melatonina (Helsinn Chemicals S.A., Suiza) se usa a una concentración final de 100 μ M.

2.4 - Grupos experimentales

Los grupos experimentales evaluados son los siguientes:

- Grupo control: Células no tratadas
- Grupo LPS: Células tratadas con LPS (10 μ g/ml) durante 6 horas
- Grupo LPS+ATV: Células tratadas con atorvastatina (1 μ M) durante 30 minutos antes de añadir el LPS durante 6 horas.
- Grupo LPS+aMT: Células tratadas con melatonina (100 μ M) durante 30 minutos antes de añadir el LPS durante 6 horas
- Grupo LPS+ATV+aMT: Células tratadas con melatonina y atorvastatina durante 30 minutos antes de añadir el LPS durante 6 horas

El LPS se disuelve en DPBS y se prepara un stock de 2 mg/ml. La atorvastatina se disuelve en DMSO a una concentración 10 mM y la melatonina en Propilenglicol al 10% a una concentración 4 mM.

3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.1. Análisis de la expresión del ARNm de la eNOS mediante qRT-PCR

La determinación de la cantidad de ARNm de la eNOS se hizo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) con SYBR-GREEN. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un Stratagene MxPro 3000.

Método:

El ARN total se extrae usando el kit de aislamiento de ARN Real Total Spin Plus (Durviz, S.L., Valencia, España).

Los cebadores específicos son:

Gen de la eNOS:

Cebador sentido: 5'-AGAGATCCACCTCACTGTAG-3'

Cebador antisentido: 5'-GTTGCACTGGTAGAGATGGC-3')

Gen de la β -actina:

Cebador sentido: 5'-GCTGTCCCTGTATGCCTCTG-3',

Cebador antisentido, 5'-CGCTCGTTGCCAATAGTGATG-3')

Los cebadores se diseñaron con el programa Beacon designer (Premier Biosoft Int., Palo Alto, CA, USA) y adquiridos a Thermo Electron GmbH (Ulm, Germany).

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ L de mezcla de reacción, que contenía 10 ng de ARN, 12.5 μ L de 2X SYBR Green Master Mix (Stratagene), 75 nM de cada cebador y agua. Cada muestra se analizó por triplicado, y también se analizó un control negativo, con todos los componentes de la reacción sin ARN.

El programa de ciclos a los que se sometieron las muestras de ARN se muestran en la tabla 2:

Nº CICLOS	ETAPA	DURACIÓN	TEMPERATURA
1	Retrotranscripción	30 min	50 °C
1	Desnaturalización	10 min	95 °C
40	Replicación del ADN	30 s	95 °C
		1 min	55 °C
		1 min	72 °C

Tabla 2

Al finalizar la RT-PCR se realizó una curva de disociación que comienza a 55°C y alcanza los 95°C, para confirmar que nuestro producto corresponde al fragmento deseado y no a dímeros de cebadores.

Los datos se analizaron utilizando una curva estándar realizada con diluciones seriadas de ARNm por triplicado (50, 5, 0.5 y 0.05 ng), y se normalizaron con la expresión de β -actina.

3.2. Análisis de la expresión de proteínas eNOS e iNOS mediante Western blot

La determinación de la cantidad de proteína eNOS e iNOS se hizo mediante Western blot.

Método:

Los pellets celulares se resuspenden en tampón de lisis (20 mmol/l de Tris-HCl, pH=7.5, 0.25 m/l de sacarosa, 10 mmol/l de EGTA, 2 mmol/l de EDTA, 2 mmol/l de ditioneitol, 1 % de Tritón X-100, 0.1 % de SDS, 1% de deoxicolato sódico, e inhibidores de proteasas: 10 μ g/ml de peptatina, 25 μ g/ml de aprotinina, 50 μ g/ml de leupeptina y 100 μ g/ml de PMSF). Se incuban en hielo 15 minutos y se sonicar durante 10 segundos. El lisado se centrifuga 10 minutos a 16000 *g* a 4 °C, se guarda una pequeña alícuota del sobrenadante para medir proteínas (Bradford, 1976) y el resto se utiliza para realizar el western blot. Estas muestras se diluyen con el tampón de Laemmli (6.25 mmol/L Tris-HCl, pH=6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol) en una proporción 1:1, y se calientan durante 5 minutos a 95 °C. A continuación, las muestras se eluyen en tampón de carga (2.5% SDS, 5% beta-mercaptoetanol) para la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 7.5% y, una vez terminada la electroforesis, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con un tampón de Tris-HCl 25 mM y PH 7.4, que contiene NaCl 150mM, 0.05 % de Tween 20 (tampón TBST) y 5% de leche en polvo. A continuación se incubaba con una dilución de un anticuerpo policlonal específico para la iNOS o la eNOS, durante toda la noche a 4 °C. Tras los correspondientes lavados con tampón TBST, se

incuba durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. La inmunorreacción se detecta con el kit de aumento de quimioluminiscencia “Western Lightning™” y el sistema de análisis de imagen “KODAK Image station 2000R”.

3.3. Determinación de los niveles intracelulares de IL-6

La determinación de IL-6 se realizó con el kit “Human Cytokine Lincoplex HCYTO-60K Kit” (Linco Research).

Método:

A cada pocillo de la placa se añade 50 µl de la solución de trabajo que contiene microesferas ligadas al anticuerpo específico contra la citoquina mencionada, se lava dos veces con 200 µl de tampón de lavado Linco-Plex y se filtra para su secado. A continuación, se añade 50 µl de la muestra resuspendida con los diluyentes específicos de muestra Linco-Plex y se incuba 60 minutos a temperatura ambiente. Tras dos nuevos lavados, las microesferas se incuban con el coctel de anticuerpos de detección a temperatura ambiente. Después de otros dos lavados, las microesferas se incuban con 25 µl de la solución de estreptavidina-ficoeritrina durante 30 minutos a temperatura ambiente y se procede con dos lavados más. Las microesferas se resuspenden en cada pocillo con 100 µl de tampón de ensayo (Sheath fluid Linco-Plex) y se determina la concentración de IL-6 usando un lector fluorimétrico (BioPlex Analyzer, BioRad, Madrid, España) basándose en una curva estándar confeccionada para cada citoquina.

3.4. Determinación de la peroxidación lipídica (LPO)

La determinación de LPO se hace utilizando un kit (Bioxytech LPO-586; Cayman Chemical) que está basado en la reacción de un reactivo cromógeno, el N-metil-2-fenilindol (NMFI), con malonildialdehído (MDA) ó 4-hidroxiacetalquenal (4-HDA), a una temperatura de 45º C. Los niveles de MDA y 4-

HDA reflejan directamente los niveles de peroxidación lipídica (Esterbauer y Cheeseman, 1990). La reacción de una molécula de MDA ó 4-HDA con dos moléculas de NMF1 produce un cromóforo estable que, en presencia del ácido metanosulfónico tiene una absorbancia máxima a 586 nm (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

Método:

Los pellets se resuspenden en 240 µl de agua milli-Q y se sonicán. El lisado resultante se conserva a -80 °C para la posterior determinación de la concentración de proteínas (Bradford, 1976) y del nivel de LPO.

Para la determinación de la LPO, se mezclan 200 µl de muestra y 650 µl de un reactivo compuesto por NMF1 10.3 mM en acetonitrilo y metanol, en una proporción 1:3 (v/v). Tras agitar durante 3-4 segundos, se añaden 150 µl de ácido metanosulfónico, y se incuba a 45 °C durante 40 minutos. Una vez acabado el periodo de incubación, los tubos se colocan en hielo. Finalmente, se cogen 100 µl de cada tubo que se añaden a los pocillos de la microplaca y se mide la absorbancia a 586 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Bio-Tek Power-WaveBxB Microplate Scanning Spectrophotometer). La recta de calibrado se realiza con diluciones seriadas (2,5-20 nmol /ml), a partir de una disolución stock procedente del kit LPO-586. Todas las determinaciones se hacen por duplicado. Los resultados se expresan en nmol MDA + 4HDA / mg prot.

3.5. Cuantificación de los niveles de los ROS

La medida de los ROS se realizó mediante el método descrito por Wang y Joseph (Wang y Joseph, 1999), que se basa en la fluorescencia emitida por la 2', 7'diclorodihidrofluoresceína (DCFH) al oxidarse a 2', 7'diclorofluoresceína (DCF). El DCFH es un derivado de la fluoresceína incoloro y no fluorescente. La membrana celular es impermeable al DCFH debido a la polaridad de este compuesto. Sin embargo, su éster de diacetato (DCFH-DA), cuando se adiciona al medio extracelular, difunde pasivamente al interior de la célula, donde sus dos grupos acetato son eliminados por las esterasas intracelulares, dando lugar al DCFH, que

queda atrapado en el interior de la célula. La subsiguiente oxidación de esta molécula por los ROS intracelulares da lugar al producto altamente fluorescente DCF.

Método:

Las células se siembran el día antes del experimento en una microplaca de 96 pocillos, a una densidad de 10.000 células/ml en un volumen de 100 μ l de medio de cultivo por pocillo. Se siembran tres pocillos por cada grupo de tratamiento. El día del experimento, tras los tratamiento correspondientes, las células se lavan con PBS y se incuban con una concentración de 100 μ M de DCFH-DA (SIGMA) en medio de cultivo fresco durante 30 minutos en el interior de la estufa (37 °C, 5% CO₂, 95% humedad). Tras la eliminación del medio con DCFH-DA, las células se lavan nuevamente y se incuban con tampón *Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB)** con 500 μ M de H₂O₂ para inducir la generación de ROS. A continuación se mide la fluorescencia con un espectrofluorímetro para microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) cada 5 minutos durante 30 minutos a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 530 nm.

La composición del tampón Krebs-Ringer-bicarbonato es el siguiente:

- D-Glucosa	1.8 g/l
- Cloruro magnésico	0.0468 g/l
- Cloruro potásico	0.34 g/l
- Cloruro sódico	7.0 g/l
- Fosfato sódico dibásico	0.1 g/l
- Fosfato sódico monobásico	0.18 g/l

3.6. Determinación de concentración de proteínas totales

La concentración proteica de las muestras se determina mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Este se basa en la formación de un compuesto coloreado entre el azul comassie y las proteínas, que se

caracteriza por presentar un máximo de absorción a 595 nm y un alto coeficiente de extinción, lo que permite una elevada sensibilidad en la determinación.

Método:

Para hacer la curva patrón se utiliza albúmina sérica bovina como estándar disuelta en TRIS 20 mM a concentraciones entre 0,1 y 0,5 mg/ml. Las muestras también son diluidas en TRIS 20 mM hasta una concentración adecuada.

En primer lugar, se pone en los pocillos de la microplaca 10 μ l de blanco, patrones o muestras. A continuación se añade 200 μ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories GmbH) diluido 1/5 en agua destilada y se agita. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Tek Power-WaveBxB Microplate Scanning Spectrophotometer).

4. Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm error estándar (SEM). Se utilizó un test de ANOVA seguido por el test de la t de Student. El nivel de significación estadística se estableció en $P < 0.05$

Resultados

Los resultados de esta Tesis se corresponden con el Trabajo siguiente:

Dayoub JC, Ortiz F, López LC, Venegas C, Del Pino-Zumaquero A, Roda O, Sánchez-Montesino I, Acuña-Castroviejo D, Escames G. Synergism between melatonin and atorvastatin against endothelial cell damage induced by lipopolysaccharide. J Pineal Res Doi:10.1111/j. 2011

1. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE LA eNOS

1.1. Expresión de la proteína eNOS

En la figura 1 se muestran los resultados del análisis del contenido de la proteína eNOS en las células HUVEC con los diferentes tratamientos mediante western blot.

Podemos observar que el LPS inhibe de forma significativa la expresión de la proteína eNOS ($P < 0,01$), mientras que la atorvastatina al igual que la melatonina contrarrestan totalmente el efecto del LPS ($P < 0,01$ y $P < 0,05$ respectivamente). Sin embargo, cuando se administran conjuntamente la atorvastatina y la melatonina, los niveles de la proteína aumentan por encima del valor control ($P < 0,01$), mostrando un efecto sinérgico entre ambas moléculas para contrarrestar los efectos del LPS sobre la expresión de la eNOS.

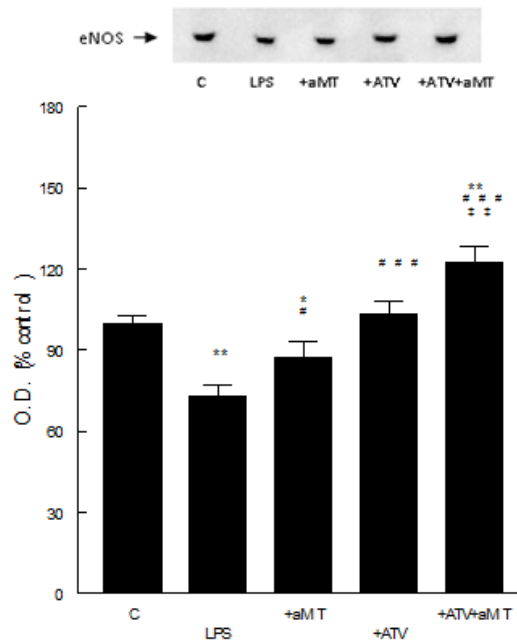


Figura 1: Efecto de la melatonina y/o atorvastatina sobre la expresión de la proteína de la eNOS en las células HUVEC incubadas con LPS. Las células se incubaron con 10 mg/mL de LPS durante 6 h en presencia y ausencia de 1 μ M de atorvastatina y/o 100 μ M de melatonina. La expresión de la proteína eNOS se ha determinado mediante western blot en el grupo control (C), LPS, LPS más melatonina (+aMT), LPS más atorvastatina (+ATV) y LPS más melatonina y atorvastatina (+ATV +aMT), respectivamente * $P < 0.05$, y ** $P < 0.01$ versus C; # $P < 0.05$ y ### $P < 0.001$ versus LPS; ## $P < 0.01$ versus LPS + ATV.

1.2. Expresión del mRNA de la eNOS

La figura 2 representa los niveles de ARNm de la eNOS de las células HUVEC obtenidos mediante qRT-PCR. Al tratarse de una técnica semicuantitativa, los datos expresan la cantidad relativa de ARNm de las muestras problema con respecto al control, dando el valor 1 al control después de restar los valores basales y de fondo. El tratamiento con LPS produce una disminución de los niveles de ARNm de la eNOS del 50 % con respecto al control. El tratamiento con melatonina o atorvastatina contrarresta de forma significativa los efectos del LPS ($P < 0,001$), aunque la atorvastatina es más eficiente que la melatonina ya que incrementa los

niveles del ARNm por encima del control. Sin embargo, cuando se administran simultáneamente ambas moléculas, la melatonina no potencia el efecto de la atorvastatina, predominando el efecto de la atorvastatina para recuperar los niveles de ARNm inhibidos por el LPS.

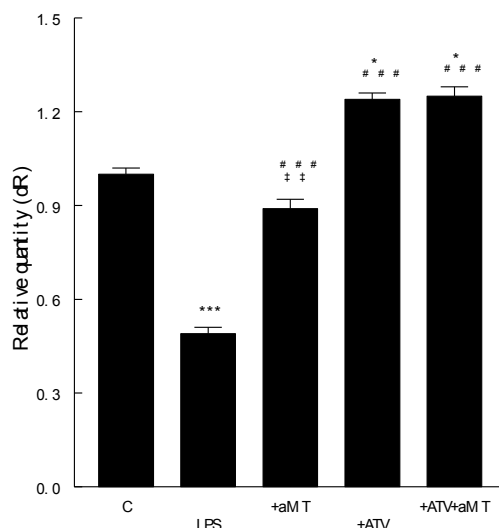


Figura 2: Efecto de la melatonina y/o atorvastatina sobre la expresión del ARNm de la eNOS en las células HUVEC incubadas con LPS. Las células se incubaron con 10 mg/mL de LPS durante 6 h en presencia y ausencia de 1 μ M de atorvastatina y/o 100 μ M de melatonina. La expresión del ARNm de la eNOS se ha determinado mediante RT-PCR en el grupo control (C), LPS, LPS más melatonina (+aMT), LPS más atorvastatina (+ATV) y LPS más melatonina y atorvastatina (+ATV +aMT), respectivamente * $P < 0.05$, y *** $P < 0.001$ versus C; ### $P < 0.001$ versus LPS; ††† $P < 0.01$ versus LPS + ATV.

2. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

2.1. Expresión de la proteína iNOS

En la figura 3 se muestra el contenido de la iNOS de las células HUVEC obtenido mediante western blot. El tratamiento con LPS induce un aumento

significativo de esta proteína ($P < 0.05$), mientras que la melatonina contrarresta totalmente el efecto del LPS ($P < 0.01$), alcanzando los niveles de la iNOS unos valores similares a los del grupo control. Sin embargo, la atorvastatina, no solo no contrarresta el efecto del LPS, sino que provoca un aumento significativo de los niveles de la iNOS ($P < 0.01$), por encima de los niveles inducidos con el LPS. Un resultado muy interesante es que la melatonina previene el aumento de la iNOS provocado por la atorvastatina, disminuyendo los niveles por debajo de los del control ($P < 0.01$).

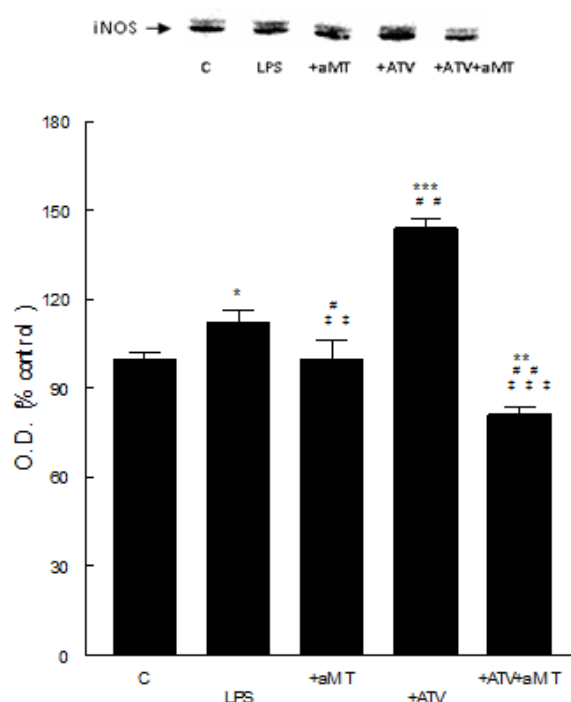


Figura 3: Efecto de la melatonina y/o atorvastatina sobre respuesta inflamatoria de las células HUVEC inducida con LPS. Medida de la expresión de la iNOS mediante western-blot. Las células se incubaron con 10 mg/mL de LPS durante 6 h en presencia y ausencia de 1 μ M de atorvastatina y/o 100 μ M de melatonina. Grupo control (C), LPS,, LPS más melatonina (+aMT), LPS más atorvastatina (+ATV) y LPS más melatonina y atorvastatina (+ATV +aMT), respectivamente * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$ versus C; # $P < 0.05$ y ## $P < 0.01$ versus LPS; ### $P < 0.001$ versus LPS + ATV.

2.2. Niveles de citoquinas proinflamatorias: IL-6

La figura 4 muestra los valores de IL-6 intracelulares medidos con el kit comercial "Human Cytokine Lincoplex Kit" (Linco Research). El LPS induce un aumento de los niveles de IL-6 intracelulares alcanzando unos valores 25 veces superiores a los del control ($P < 0.001$). Observamos que la melatonina contrarresta los efectos del LPS disminuyendo de forma significativa los niveles de la IL-6 ($P < 0.001$), sin embargo la atorvastatina no tiene ningún efecto para reducir los niveles de esta citoquina proinflamatoria. Cuando las células HUVEC se incuban con melatonina más atorvastatina, predomina el efecto de la melatonina provocando una disminución significativa de la IL-6 ($P < 0.001$).

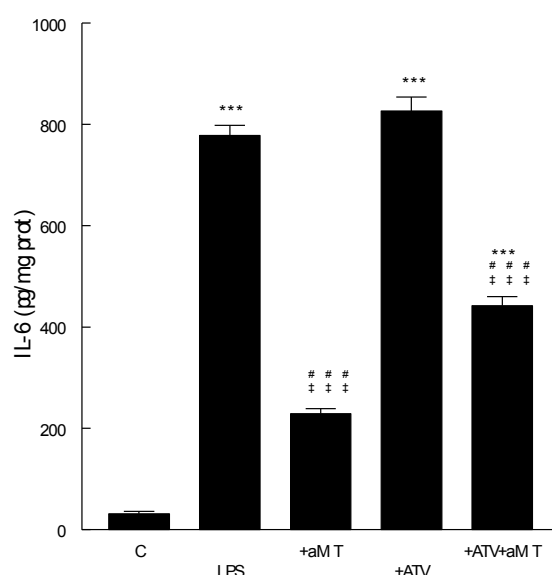


Figura 4: Efecto de la melatonina y/o atorvastatina sobre la respuesta inflamatoria en las células HUVEC incubadas con LPS. Medida de los niveles de IL-6. Las células se incubaron con 10 mg/mL de LPS durante 6 h en presencia y ausencia de 1 μ M de atorvastatina y/o 100 μ M de melatonina. Grupo control (C), LPS, LPS más melatonina (+aMT), LPS más atorvastatina (+ATV) y LPS más melatonina y atorvastatina (+ATV+aMT), respectivamente. *** $P < 0.001$ versus C; ### $P < 0.001$ versus LPS; ### $P < 0.01$ versus LPS + ATV.

3. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

3.1. Niveles de ROS intracelulares

Los niveles de radicales libres intracelulares se han cuantificado mediante la medida de la fluorescencia emitida por el DCFH al oxidarse en el interior de las células HUVEC en presencia de H_2O_2 . Este método nos permite analizar la generación de radicales libres intracelulares y evaluar la respuesta al estrés oxidativo con los diferentes tratamientos.

En la figura 5 está representado el incremento de fluorescencia a lo largo del tiempo en los diferentes grupos estudiados. Las medidas de fluorescencia se hicieron cada 5 minutos durante 30 minutos. Se observa que la melatonina reduce de forma significativa la producción de ROS inducida por el H_2O_2 . Sin embargo, la atorvastatina, es incapaz de disminuir el estrés oxidativo generado por el H_2O_2 . Cuando ambas drogas se añaden simultáneamente al medio de cultivo, se observa un efecto sinérgico para disminuir los ROS. Las pendientes de las curvas de dichos experimentos fueron respectivamente: grupo control, 141,6; grupo con LPS más melatonina, 123,3; grupo con LPS más atorvastatina, 147,9; y grupo con LPS más melatonina y atorvastatina, 125.

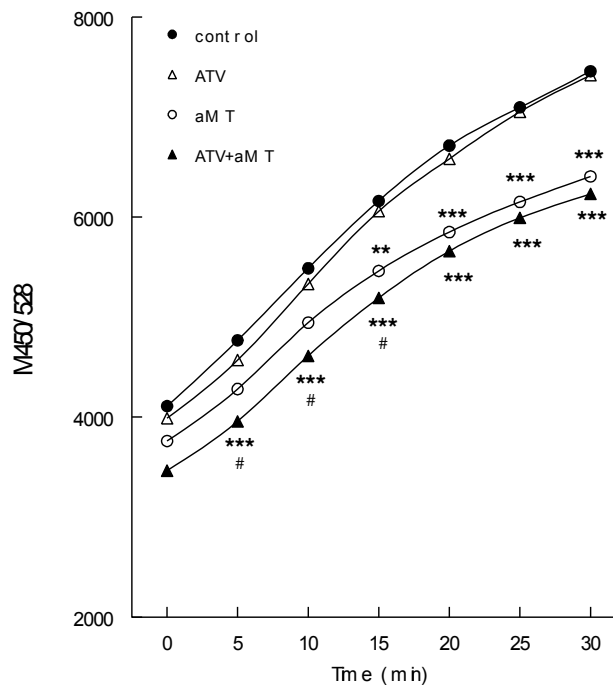


Figura 5: Niveles de ROS cuantificados por la fluorescencia emitida por el DCFH al oxidarse en el interior de las células HUVEC. La producción de ROS se induce mediante la incubación de las células con H_2O_2 . Grupo control (C), melatonina (+aMT), atorvastatina (+ATV) y melatonina más atorvastatina (+ATV+aMT). ** $P < 0.01$, y *** $P < 0.001$ versus C; # $P < 0,5$ versus melatonina.

3.2. Niveles de peroxidación lipídica

La figura 6 muestra los cambios en los niveles de lipoperoxidación en las células HUVEC con los distintos tratamientos. La LPO, medida como la producción de MDA + 4HDA, aumenta de forma significativa con LPS, efecto que es totalmente contrarrestado por la melatonina ($P < 0,01$). Sin embargo, el efecto de la atorvastatina para reducir la LPO inducida por el LPS es menor ($P < 0,05$) y, por tanto, no es capaz de contrarrestar de forma significativa los efectos del LPS. La combinación de melatonina más atorvastatina reduce de forma sinérgica los niveles de LPO por debajo de los valores control.

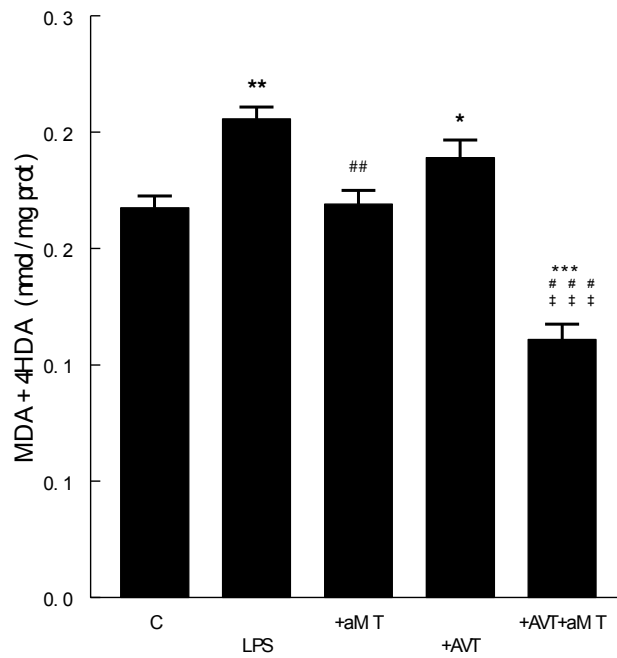


Figura 6: Niveles de peroxidación lipídica medida como la producción de MDA + 4HDA en las células HUVEC en los grupos control (C), LPS, LPS más melatonina (+aMT), LPS más atorvastatina (+ATV) y LPS más melatonina y atorvastatina (+ATV +aMT). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus C; ## $P < 0.01$, and ### $P < 0.001$ versus LPS; ††† $P < 0.01$ versus LPS + ATV.

Synergism between melatonin and atorvastatin against endothelial cell damage induced by lipopolysaccharide

Abstract: The beneficial effects of atorvastatin are based on both cholesterol-dependent and independent mechanisms. The latter probably include the ability of the statin to enhance the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and to cause a vasodilatation. In turn, the antioxidant and anti-inflammatory actions of melatonin are related to its vascular protection. In the present study, we investigated the efficacy of the combination of melatonin plus atorvastatin against endothelial cell damage induced by inflammation and oxidative stress injury. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured with bacterial lipopolysaccharide (LPS) in the presence or absence of melatonin and/or atorvastatin. LPS inhibited eNOS mRNA and protein expression, which was reversed by atorvastatin and, to a lesser extent, by melatonin. Together, melatonin + atorvastatin induced higher eNOS protein expression than either compound alone. Melatonin, but not atorvastatin, reduced free radical generation, lipid peroxidation, and interleukin-6 levels induced by LPS. In the presence of atorvastatin, the effects of melatonin were maintained or even improved. These data suggest that melatonin improves the beneficial effects of atorvastatin and reduces its side effects in endothelial cells during inflammation and under conditions of oxidative stress.

José C. Dayoub^{1,2}, Francisco Ortiz^{1,2}, Luis C. López^{1,2}, Carmen Venegas^{1,2}, Alberto del Pino-Zumaquero^{1,2}, Olga Roda³, Indalecio Sánchez-Montesinos³, Darío Acuña-Castroviejo^{1,2} and Germaine Escames^{1,2}

¹Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada and RETICEF, Granada, Spain; ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain; ³Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain

Key words: atorvastatin, endothelial nitric oxide synthase, human umbilical vein endothelial cells, melatonin, oxidative stress

Address reprint requests to Germaine Escames, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.
E-mail: gescames@ugr.es

Received January 20, 2011;
Accepted April 8, 2011.

Introduction

Atherosclerosis is the result of a chronic inflammation perpetuated by a dysfunctional endothelium. Disrupted production and release of endothelium-derived nitric oxide (NO^{*}), which is produced by endothelial nitric oxide synthase (eNOS), is a major cause of endothelial dysfunction [1].

There is a strong association between elevated plasma cholesterol levels and atherosclerosis [2]. Consequently, inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase such as the statins are often utilized in the prevention of coronary heart disease because of their efficacy for lowering lipid levels. Additional benefits of statins have been identified. These actions are independent of their cholesterol-lowering effect and include, among others, the improvement of endothelial function by promoting the production of eNOS-dependent NO^{*} [1].

There is a general agreement that reactive oxygen species (ROS) play a vital role in the pathogenesis of coronary atherosclerosis and its complications [3, 4]. The importance of ROS in the development and maintenance of hypertension has been documented in a number of studies [5, 6], and

there is increasing evidence that oxidative injury induces endothelial cell damage [7]. Because oxidative stress contributes to endothelial dysfunction and development of atherosclerosis, the use of antioxidant supplementation to improve endothelial function has been reported [8]. Several clinical trials, however, did not show beneficial actions of antioxidant vitamin supplementation [9].

A number of drugs used clinically to reduce hypertension inflict collateral damage, and it has been suggested that these damaging effects are mediated by free radicals and related reactants [10, 11]. Melatonin and several of its metabolites are known to protect against oxidative stress in all cells, tissues, and organs [12–16]. Antioxidative actions of melatonin are observed at multiple levels including attenuation of radical formation, which is referred to as radical avoidance [17]. Melatonin exhibits immunomodulatory properties by inhibiting COX-2 and iNOS in inflammatory process [18, 19]. Previously, the protective effects of melatonin against ROS-induced endothelial cell death have been documented [20]. There is also evidence of the existence for the presence of melatonin receptors in bovine cerebral arteries, suggesting a potential role for melatonin in regulating blood flow [20]. Moreover,

melatonin acts centrally via both MT1 and MT2 receptors to modulate mean arterial pressure [21].

Based on previous data, our hypothesis is that the beneficial effects of statins on endothelial cells may be significantly improved by the presence of melatonin. So, we considered it worthwhile to explore the effects of melatonin and atorvastatin in protecting human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) from lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory injury, and whether the combinatory therapy with both drugs improves the beneficial effects of these compounds independently.

Materials and methods

Cell culture

Primary HUVEC were purchased from Cell Applications, Inc, USA. Cells were cultured in F-12K medium (Nutrient mixture f-12 Ham Kaighn's modification, Sigma Chemicals, Madrid, Spain) supplemented with 1.5 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 100 mg/L heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa, 30 mg/L endothelial cell growth supplement from bovine neural tissue, and 1% penicillin-streptomycin-amphotericin B mixture. The cells were cultured at 37°C, 5% CO₂, and 95% of humidity.

To induce endothelial damage, HUVEC were incubated with 10 µg/mL bacterial LPS (serotype 055:B5 from *E. coli*) for 6 hr. Preliminary experiments showed that this time yield a significant cellular damage. Cultured HUVEC were divided into five groups as follows: (i) Control group, incubated with vehicle; (ii) LPS group, comprising cells cultured in the presence of 10 µg/mL LPS for 6 hr; (iii) LPS + AVT group, corresponding to cells incubated in the presence of LPS plus atorvastatin during 6 hr (10 µg/mL LPS + 1 µM atorvastatin); (iv) LPS + aMT group, corresponding to cells incubated in the presence of LPS plus melatonin for 6 hr (10 µg/mL LPS + 100 µM melatonin); and (v) LPS + AVT + aMT group, comprising cells cultured in the presence of LPS plus atorvastatin and melatonin for 6 hr (10 µg/ml LPS + 1 µM atorvastatin + 100 µM melatonin).

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from HUVEC using a commercial RNA isolation kit (Real Total RNA Spin Plus, Durviz, S.L., Valencia, Spain). Ten nanograms of the total RNA extracted was used for RT-PCR. Gene-specific primers for eNOS (forward primer, 5'-AGAGATCCACCTCACTGTA G-3', and reverse primer, 5'-GTTGCACTGGTAGAGATG GC-3') and β-actin (forward primer, 5'-GCTGTCCCTGT ATGCCTCTG-3', and reverse primer, 5'-CGCTCGTTGC CAATAGTGATG-3'), were designed using the Beacon Designer software (Premier Biosoft Int., Palo Alto, CA, USA) and obtained from Thermo Electron GmbH (Ulm, Germany). Real-time PCRs were carried out in a final volume of 25 µL of reaction mixture containing 10 ng of RNA, 12.5 µL of 2X SYBR Green Master Mix (Stratagene; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), 75 nM each specific gene primer, and pure water. The samples were

run in triplicate in the amplification program, and the mean value was used as the final expression value. A negative control without RNA template was also run. The PCR program was initiated by 10 min at 95°C before 40 thermal cycles, each of 30 s at 95°C, and 1 min at 55°C. Data were analyzed according to the relative standard curve method, constructed with triplicate serial dilutions of the RNA obtained from the control sample (0.05, 0.5, and 50 ng), and were normalized by β-actin expression.

Western blot analysis

Adherent cells were harvested with trypsin/EDTA and pelleted by centrifugation before washing with PBS and re-centrifugation. Cell pellets were resuspended in the lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.25 g/L sucrose, 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 10 µg/mL pepstatin, 25 µg/mL aprotinin, 50 µg/mL leupeptin, and 100 µg/mL PMSF), followed by a 15-min incubation on ice and a 10-sec sonication. The lysates were then centrifuged at 16,000 g for 10 min at 4°C, and the supernatants were collected to assay the protein content [22] and expression. For protein expression assay, the samples were diluted 1:1 with Laemmli sample buffer (6.25 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 25% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, and 0.01% bromophenol blue) and boiled for 5 min at 95°C. Aliquots containing 10 µg of protein were electrophoresed on 7.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels and subsequently transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Barcelona, Spain). The membranes were blocked in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20 (TBST buffer), and 5% (w/v) dry milk for 2 hr. Blots were probed with anti-eNOS mouse monoclonal antibody (BD Biosciences, Madrid, Spain) using a dilution 1:2 500, or with anti-iNOS rabbit polyclonal antibody (BD Biosciences, Madrid, Spain) at a dilution of 1:500, in blocking buffer overnight at 4°C. After TBST washing, the blots were incubated with 1:1000 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (BD Biosciences) or 1:5000 anti-rabbit (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain) IgG antibody. The immunoreaction was detected using the enhanced chemiluminescence EC system (GE Healthcare, Barcelona, Spain). Blots were digitized and processed with a Kodak ImageStation 2000R (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). Three experiments were performed.

Reactive oxygen species (ROS) quantitation

The levels of intracellular ROS were measured with a previously published method [23], following the change in fluorescence resulting from oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Once the dye is in the intracellular compartment, the acetate group on DCFH-DA is cleaved by intracellular esterases, thereby trapping the nonfluorescent (DCFH). When DCFH is oxidized by ROS inside the cell, it is converted into fluorescent DCF. HUVEC were seeded into a 96-well plate at a density of

10,000 cells/mL in 100 μ L complete media 1 day before the experiments. On the day of the experiment, the cells were treated accordingly, washed with PBS and then incubated with 100 μ M DCFH-DA in fresh medium at 37°C for 30 min. After removing the excess of DCFH-DA, the cells were washed again and incubated with Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 500 μ M H₂O₂ to induce intracellular ROS. The fluorescence was measured every 5 min for 30 min at 485 nm excitation and 530 nm emission in a multiwell plate reader spectrofluorometer (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

Lipid peroxidation (LPO) assay

Cells were incubated in the presence of the drugs tested in the aforementioned conditions. After 6 hr of incubation, cells were centrifuged at 800 g at 4°C for 10 min, washed in PBS and centrifuged again. Pellets were sonicated (0.1 g/mL) in ice-cold buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4). The crude homogenate was centrifuged at 2 500 g at 4°C for 30 min, and an aliquot of the supernatant was either stored at -80°C for total protein determination [22] or used to calculate the LPO levels [24]. For this purpose, a commercial LPO assay kit able to determine both malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (4HDA) was used (Byoxytech LPO-568 assay kit; OxisResearch, Portland, OR, USA). The concentration of LPO was expressed in nmol/mg protein.

Bio-Plex cytokine assay

The Bio-Plex Human Cytokine immunoassay kit (Millipore Corp., Billerica, MD, USA) was used to profile expression of IL-6. The assay was performed following the kit instructions. Briefly, 50 μ L of a working solution containing multiple microbeads labeled with specific antibodies against IL-6 was added into each well, washed twice with 200 μ L of Linco-Plex wash buffer and filtered to dryness. Then 25 μ L of thawed plasma aliquots diluted 1:4 with the specific Linco-Plex sample diluents was added to each well and incubated for 60 min at room temperature. After a wash step (twice) with 200 μ L Linco-Plex wash buffer, the beads were incubated with 25 μ L of the detection antibody cocktail for 30 min at room temperature, each antibody specific to a single cytokine. After another two time wash step with 200 μ L Linco-Plex wash buffer, the beads were incubated with 25 μ L of the streptavidin-phycoerythrin solution for 30 min at room temperature and washed twice again. The beads were resuspended in each well with 100 μ L of the Linco-Plex Sheath fluid, and the concentration of each cytokine was determined using the array reader. A parallel standard curve for IL-6 was constructed. Levels are expressed in ng/L.

Statistical analysis

Results are presented as means \pm S.E.M. of at least three experiments analyzed in duplicate. Statistical analyses included multiple comparisons between the groups using variance analysis, followed by Student's *t*-test that was used to compare the means between groups. Statistical significance was accepted at a level of $P < 0.05$.

Results

Western blot analysis of eNOS protein expression in HUVEC is shown in Fig. 1 (upper). LPS induced a significant reduction in the amount of eNOS protein expression ($P < 0.01$), which was counteracted by atorvastatin ($P < 0.01$) or melatonin ($P < 0.05$). Atorvastatin plus melatonin significantly enhanced eNOS expression upon control values ($P < 0.01$).

Figure 1 (bottom) shows the data obtained in quantitative RT-PCR experiments. Because this is a semiquantitative technique, the data represent the relative quantity of mRNA eNOS found in experimental samples versus control, giving to the control a value = 1 after subtracting background values. It can be seen a significant reduction

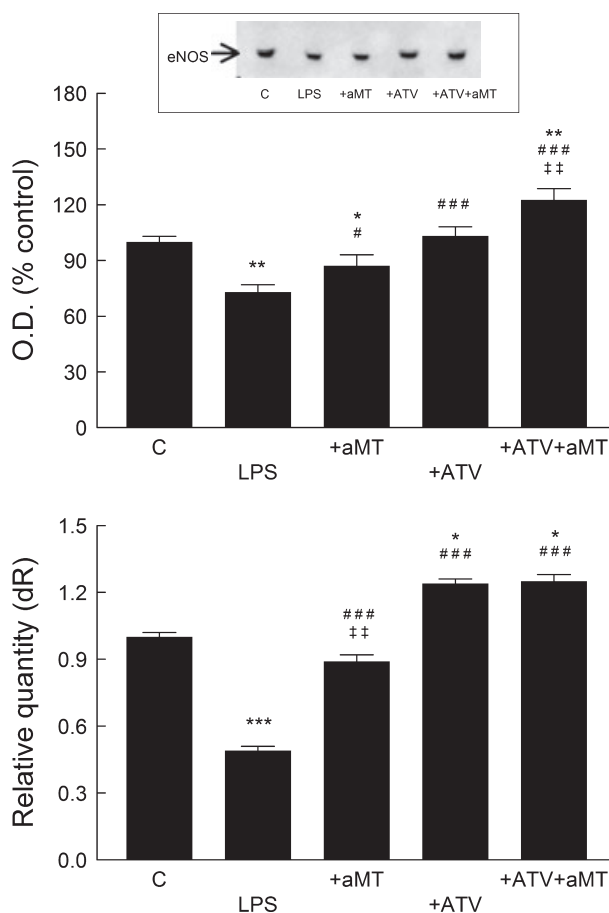


Fig. 1. Effects of atorvastatin and/or melatonin on eNOS protein (upper) and mRNA (bottom) expression in human umbilical vein endothelial cells cultured with lipopolysaccharide (LPS). Cells were incubated with 10 mg/mL LPS during 6 hr in the presence and absence of 1 μ M atorvastatin and/or 100 μ M melatonin. eNOS protein expression was determined by Western blot, and eNOS mRNA was determined by RT-PCR as described in the text. The relative eNOS mRNA levels were calculated as the ratio to β -actin mRNA expression. Results are expressed as a mean \pm S.E.M. of three experiments measured in duplicate. C, control group (cells incubated with vehicle); LPS, +aMT, +AVT, +aMT +AVT, cells incubated with LPS, LPS + aMT, LPS + AVT, and LPS + aMT + AVT, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus C; # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ versus LPS; ‡‡ $P < 0.01$ versus LPS + AVT.

(50%) in the eNOS mRNA expression after LPS treatment in HUVEC, which was counteracted by melatonin or atorvastatin ($P < 0.001$), being the latter the most efficient of both drugs. HUVEC incubated with atorvastatin plus melatonin did not modify the effect of atorvastatin alone in recovering eNOS expression inhibited by LPS.

The inflammatory response of HUVEC incubated with LPS, is shown in the Fig. 2. The protein expression of iNOS (upper) and the levels of IL-6 (bottom) were determined. LPS induced a significant increase in the expression of iNOS ($P < 0.05$, upper), which was further increased by atorvastatin ($P < 0.01$), whereas melatonin counteracted LPS-induced iNOS expression ($P < 0.05$). Interestingly, the presence of melatonin prevented the induction of iNOS by atorvastatin, further reducing iNOS expression below the control values. LPS induced a significant increase in IL-6 production ($P < 0.001$), which was reduced by melatonin ($P < 0.001$) but not by atorvastatin. When HUVEC were incubated with melatonin plus atorvastatin, the effects of the former prevailed ($P < 0.001$).

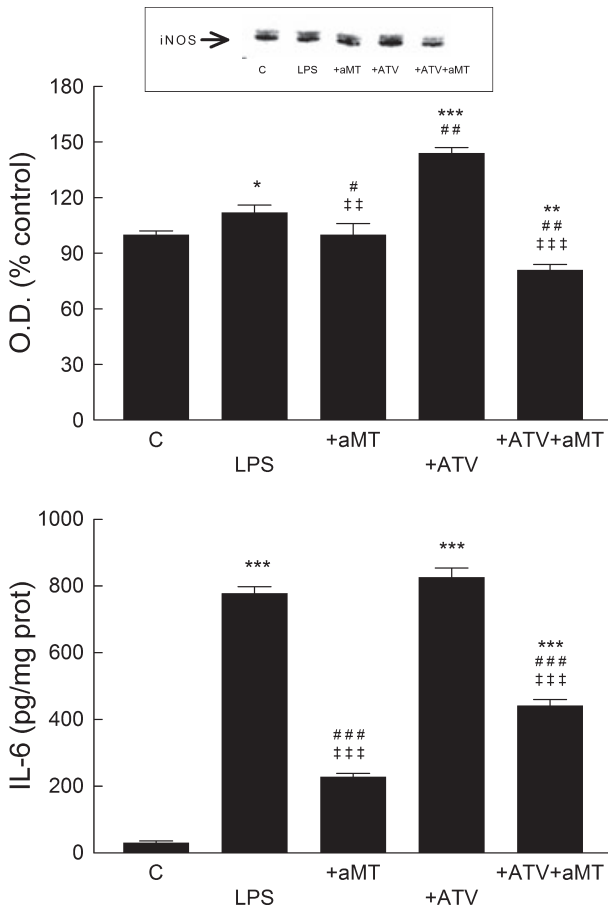


Fig. 2. Inflammatory response elicited by human umbilical vein endothelial cells. Cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS), and the protein expression of iNOS (upper) and the levels of IL-6 (bottom) after atorvastatin and/or melatonin incubation were assessed. See legend of Fig. 1 for additional information. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus C; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, and #### $P < 0.001$ versus LPS; †† $P < 0.01$, and ††† $P < 0.001$ versus LPS + AVT.

Figure 3 shows the oxidative stress response of HUVEC to LPS. A sensitive method based on DCFH-DA oxidation in the presence or absence of H_2O_2 was used to measure intracellular free radicals generation (Fig. 3, upper). The regression plot represents measurements being taken for every 5 min. Atorvastatin was unable to reduce H_2O_2 -induced ROS generation. Melatonin, however, significantly reduced ROS production and, when both drugs were simultaneously added to the culture medium, the effect of melatonin remained, without further modifications in ROS production by the presence of atorvastatin. The calculated slopes from these experiments were H_2O_2 , 141.6; melatonin, 123.3; atorvastatin, 147.9, and melatonin plus atorvastatin, 125.

Figure 3 (bottom) also shows the changes in LPO levels following ROS generation in HUVEC. LPO, measured as the production of MDA + 4HDA, increased significantly after incubation of HUVEC with LPS ($P < 0.01$), and this effect was absolutely counteracted by melatonin ($P < 0.01$). Atorvastatin alone had a small effect on LPO levels ($P < 0.05$), but the combination of melatonin plus

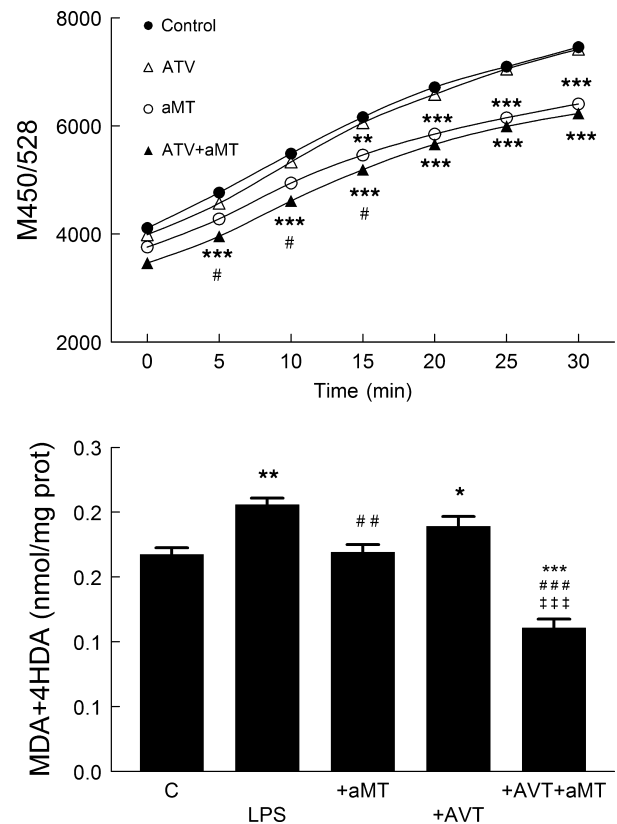


Fig. 3. Oxidative stress response of human umbilical vein endothelial cells. Cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS) and the generation of reactive oxygen species (ROS) (upper) and the levels of lipid peroxidation (bottom) after atorvastatin and/or melatonin incubation were determined. ROS production was induced by incubating the cells with $500 \mu M H_2O_2$. The generation of ROS was fluorometrically assessed using DCFH-DA as a fluorescent probes (upper). See legend of Fig. 1 for additional information. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus C; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, and #### $P < 0.001$ versus LPS.

atorvastatin synergistically decreased LPO levels below control values ($P < 0.001$).

Discussion

A series of studies have demonstrated that eNOS is an essential factor for endothelial function, and it is a major protective factor in the pathophysiology of vascular endothelium. The reduction of eNOS expression leads to extensive damage by platelet aggregation and neutrophil infiltration [25]. Furthermore, the up-regulation of eNOS contributes to the protective mechanism of the endothelium by increasing blood flow. Cytoprotection has also been demonstrated with numerous statins, which increases vascular eNOS production and attenuates myocardial necrosis following ischemia/reperfusion in wild type, but not eNOS-deficient mice [26]. Therefore, the pleiotropic effects of statins on vascular endothelium have been associated with increased eNOS-derived NO^{*}, which prevents HUVEC damage by maintaining blood flow. Our results show that eNOS protein levels decline in HUVEC incubated with LPS, whereas atorvastatin provides a significant microvascular protection through the activation of eNOS. Melatonin also prevented the LPS-induced eNOS reduction. Our results demonstrate for the first time a synergism between melatonin and atorvastatin, because both compounds simultaneously added to HUVEC cells treated with LPS not only prevented the effects of LPS on eNOS expression, but also increased eNOS levels above control values. The melatonin–eNOS interaction, however, seems complex. Whereas some authors reported that melatonin reduces NO^{*} production induced by bradykinin by a mechanism involving the interactions of Ca²⁺-calmodulin with eNOS [27], others authors [28] demonstrated that melatonin enhanced eNOS activity, reducing blood pressure significantly. It is known that blood pressure decreases after melatonin administration, an effect related to the melatonin-dependent NO^{*} production and subsequent reduction of the peripheral resistance [29]. Therefore, the effects of melatonin on the vascular tone depend of the experimental conditions, and consequently, the data obtained from different experiments are partly contradictory. The current findings support a positive effect of the indoleamine on eNOS. Thus, when eNOS is reduced, for example, during an inflammatory process such as in our experimental paradigm, melatonin exerts its protective action by increasing the expression of eNOS mRNA and protein levels. Although we did not measure NO^{*} production, the rise in the amount of eNOS was followed by a significant improvement of the HUVEC, increasing cell viability.

It is clear that one consequence of the endothelial dysfunction is a reduced production of NO^{*}. However, overproduction of NO^{*} from iNOS leads also to cell toxicity and death. Large amounts of NO^{*} produced by iNOS react rapidly with the superoxide radical forming peroxynitrite (ONOO⁻), which plays an important role in the mechanism of apoptosis and subsequent barrier dysfunction [30]. Our study revealed that LPS increased iNOS expression in HUVEC, an effect further enhanced by atorvastatin. The duality of atorvastatin effects of eNOS/iNOS expression may reduce its beneficial effects on the

endothelium. The inhibitory effect of melatonin on iNOS expression, which has been reported in multiple experimental paradigms [19, 31], also occurred here, counteracting the induction of iNOS by LPS in HUVEC. Moreover, melatonin prevented the stimulatory effect of atorvastatin on iNOS expression. These data suggest that melatonin, reducing atorvastatin-induced iNOS expression, prevented the deleterious effects of the statin on the endothelium, whereas improved the beneficial effects of atorvastatin on eNOS. Hence, the use of melatonin in combination with atorvastatin may regulate eNOS/iNOS balance toward eNOS, yielding enough NO^{*} for regulating endothelial function, and preventing the excess of NO^{*} and the production of the toxic ONOO⁻ [32].

Elevated ROS levels in endothelial cells inhibit the expression of eNOS [32, 33], a finding related to the hypertensive status in elderly people. Thus, the generation of ROS causes endothelial dysfunction and vascular smooth muscle cell proliferation and inflammation, all of which contribute to hypertensive vascular damage [34]. Statins can reduce LDL oxidation, and it was suggested that they can reduce intracellular oxidative stress [35]. The scavenging ability of oxygen-derived free radicals is shared by many statins, including atorvastatin [36], which prevented hyperglycemia-enhanced superoxide formation in coronary artery segments [37]. In the current study, atorvastatin did not prevent H₂O₂-induced ROS generation and it had only a slight effect in reducing LPS-induced LPO levels in HUVEC. Melatonin showed its well-known antioxidant activity, reducing ROS generation and LPO levels in these cells [38–42]. Interestingly, melatonin plus atorvastatin showed a synergistic effect on LPO levels, suggesting that in some conditions, i.e., in the presence of other antioxidants, atorvastatin also may exert antioxidant effects. Again, these results demonstrate that melatonin enhances the beneficial effects of atorvastatin, protecting the endothelial cells from inflammatory injury.

Besides oxidative stress and inflammation, two common processes implicated as major causative factors of chronic vascular disease [43], the captured monocyte-derived macrophages secrete cytokines, chemokines, growth factors, and desintegrins, all of which contribute to the activation and proliferation of the adjacent smooth muscle cells [44]. In this regard, anti-inflammatory actions of atorvastatin also have been reported [45]. Similar to the lack of antioxidant activity, we were also unable to detect any anti-inflammatory action of atorvastatin. In fact, atorvastatin did not reduce the LPS-induced IL-6 production and increased iNOS expression. Our data confirm the results of some clinical trials conducted to determine the effects of statin treatment on inflammatory markers in patients with chronic heart failure. These studies revealed that statins failed to cause a marked reduction in IL-6 and TNF- α , while decreasing the levels of high-sensitivity C-reactive protein and soluble vascular cell adhesion molecule [46]. Together, the results support that, in the presence of an inflammatory stimulus such as LPS, atorvastatin exerts a pro-inflammatory activity on endothelial cells that may surpass its beneficial effects. Again, eNOS/iNOS balance may be critical for the endothelial cell function and, here, melatonin may play a homeostatic role on this equilibrium.

Melatonin also has important actions against inflammation, including the modulation of iNOS and COX-2 responses and the subsequent cytokine production [47–51]. Here, we found that melatonin protects endothelial cells by inhibiting IL-6 production in the presence of LPS. These results are very important because IL-6, together with other cytokines such as TNF- α , contributes to endothelial dysfunction, cardiac myocyte apoptosis, structural deterioration, and left ventricular dysfunction [52, 53].

The results of this study suggest that melatonin, a potent antioxidant and anti-inflammatory compound that can easily diffuse into cells [12, 54–57], likely has beneficial effects in cardiovascular disease [6, 34, 39]. Our data support the combination therapy of melatonin plus atorvastatin to enhance the beneficial effects of the former, increasing eNOS expression, preventing the harmful actions of the statin, and reducing the inflammatory reaction and ROS generation. Considering the low toxicity of melatonin even during long term makes possible its use [10], our results provide evidence for the therapeutic value of melatonin in combination with atorvastatin in clinical practice.

Acknowledgements

This study was partially supported by grants from Pfizer (Madrid, Spain), the Instituto de Salud Carlos III (RD06/0013/0008), and the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (CTS-101). The authors thank Araceli Puertas for her technical assistance.

References

- LAUFS U, LIAO JK. Rapid effects of statins: from prophylaxis to therapy for ischemic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**:156–157.
- LAROSA JC, HUNNINGHAKE D, BUSH D et al. The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association. *Circulation* 1990; **81**:1721–1733.
- PAPAHARALAMBUS CA, GRIENGLING KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med* 2007; **17**:48–54.
- SUREKHA RH, SRIKANTH BB, JHARNA P et al. Oxidative stress and total antioxidant status in myocardial infarction. *Singapore Med J* 2007; **48**:137–142.
- BERRY C, BROSNAN MJ, FENNEL J et al. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; **10**:247–255.
- TENGATTINI S, REITER RJ, TAN DX et al. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 2008; **44**:16–25.
- CHOI YJ, LEE MK, LEE YJ et al. Inhibition of hydrogen peroxide-induced endothelial apoptosis by 2',4',7-trihydroxyflavanone, a flavonoid form. *J Med Food* 2004; **7**:408–416.
- DAVIGNON J, JACOB RF, MASON RP. The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis* 2004; **15**:251–258.
- MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; **360**:23–33.
- REITER RJ, TAN DX, MAYO JC et al. Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. *Free Radic Res* 2002; **36**:1323–1329.
- GUVEN A, YAVUZ O, CAM M et al. Melatonin protects against epirubicin-induced cardiotoxicity. *Acta Histochem* 2007; **109**:52–60.
- TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B et al. Melatonin: a potent hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; **1**:40–57.
- MUKHERJEE D, ROY SG, BANDYOPADHYAY A et al. Melatonin protects against isoproterenol-induced myocardial injury in the rat: antioxidative mechanisms. *J Pineal Res* 2010; **48**:251–262.
- LEE S, JADHAV V, AYER RE et al. Dual effects of melatonin on oxidative stress after surgical brain injury in rats. *J Pineal Res* 2009; **46**:43–48.
- RESSMEYER AR, MAYO JC, ZELOSKO V et al. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep* 2003; **8**:205–213.
- HARDELAND R, TAN DX, REITER RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 2009; **47**:109–126.
- HARDELAND R. Antioxidant protein of melatonin. *Endocrine* 2009; **27**:119–130.
- MAYO JC, SAINZ RM, TAN DX et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005; **165**:139–149.
- ESCAMES G, LEÓN J, MACÍAS M et al. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 2003; **17**:932–934.
- CHUCHAROEN P, CHETSAWANG B, PUTTHAPRASART C et al. The presence of melatonin receptors and inhibitory effect of melatonin on hydrogen peroxide-induced endothelial nitric oxide synthase expression in bovine cerebral blood vessels. *J Pineal Res* 2007; **43**:35–41.
- XIA CM, SHAO CH, XIN L et al. Effects of melatonin on blood pressure in stress-induced hypertension in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; **35**:1258–1264.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248–254.
- WANG H, JOSEPH JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999; **27**:612–616.
- ESTERBAUER H, CHEESEMAN KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; **186**:407–421.
- ALBRECHT ED, ABERDEEN GW, NIKLAUS AL et al. Acute temporal regulation of vascular endothelial growth/permeability factor expression and endothelial morphology in the baboon endometrium by ovarian steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**:2844–2852.
- JONES SP, GIBSON MF, RIMMER DM III et al. Direct vascular and cardioprotective effects of rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *J Am Coll Cardiol* 2002; **40**:1172–1178.
- TAMURA EK, SILVA CL, MARKUS RP. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production *in vitro*. *J Pineal Res* 2006; **41**:267–274.
- PECHANOVA O, ZICHA J, PAULIS L et al. The effect of N-acetylcysteine and melatonin in adult spontaneously hypertensive

- rats with established hypertension. *Eur J Pharmacol* 2007; **561**:129–136.
29. CAGNACCI A, ARANGINO S, ANGIOLUCCI M et al. Effect of exogenous melatonin on vascular reactivity and nitric oxide in postmenopausal women: role of hormone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; **54**:261–266.
 30. KNEPLER JL JR, TAHER LN, GUPTA MP et al. Peroxynitrite causes endothelial cell monolayer barrier dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **281**:C1064–C1075.
 31. ESCAMES G, LÓPEZ LC, TAPIAS V et al. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 2006; **40**:71–78.
 32. CHEN XN, XU J, FENG Z et al. Simvastatin combined with nifedipine enhances endothelial cell protection by inhibiting ROS generation and activating Akt phosphorylation. *Acta Pharmacol Sin* 2010; **31**:813–820.
 33. HANSSON GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; **352**:1685–1695.
 34. REITER RJ, TAN DX, PAREDES SD et al. Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. *Ann Med* 2010; **42**:276–285.
 35. LIAO JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol* 2002; **86**:5–18.
 36. WAGNER AH, KOHLER T, RUCKSCHLOSS U et al. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**:61–69.
 37. CHRIST M, BAUERSACHS J, LIEBETRAU C et al. Glucose increases endothelial-dependent superoxide formation in coronary arteries by NAD(P)H oxidase activation: attenuation by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor atorvastatin. *Diabetes* 2002; **51**:2648–2652.
 38. JOU MJ, PENG TI, HSU LF et al. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca(2+)-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 2010; **48**:20–38.
 39. LEON J, ACUNA-CASTROVIEJO D, SAINZ RM et al. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004; **75**:765–790.
 40. LEON J, ACUNA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G et al. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; **38**:1–9.
 41. ACUNA-CASTROVIEJO D, MARTIN M, MACIAS M et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; **30**:65–74.
 42. ACUNA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, LEON J et al. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol* 2003; **527**:549–557.
 43. FABRIZIO RL, BONOMINI F, REZZANI R et al. Atherosclerosis and the protective role played by different proteins in apolipoprotein E-deficient mice. *Acta Histochem* 2007; **109**:45–51.
 44. YAMAMOTO K, IKEDA U, SHIMADA K. Role of mechanical stress in monocytes/macrophages: implications for atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2003; **1**:315–319.
 45. HERNANDEZ-PRESA MA, MARTIN-VENTURA JL, ORTEGO M et al. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002; **160**:49–58.
 46. ZHANG L, ZHANG S, JIANG H et al. Effects of statin therapy on inflammatory markers in chronic heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Med Res* 2010; **41**:464–471.
 47. CRESPO E, MACÍAS M, POZO D et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 1999; **13**:1537–1546.
 48. HARDELAND R, PANDI-PERUMAL SR, CARDINALI DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; **38**:313–316.
 49. CARRILLO-VICO A, GUERRERO JM, LARDONE PJ et al. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; **27**:189–200.
 50. RODRIGUEZ MI, ESCAMES G, LOPEZ LC et al. Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice. *Exp Gerontol* 2008; **43**:749–756.
 51. LEE YD, KIM JY, LEE KH et al. Melatonin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in sleep-deprived mice. *J Pineal Res* 2009; **46**:53–57.
 52. MANN DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* 2002; **91**:988–998.
 53. PINSKY DJ, CAI B, YANG X et al. The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor beta. *J Clin Invest* 1995; **95**:677–685.
 54. TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signal Recept* 2000; **9**:137–159.
 55. TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; **42**:28–42.
 56. REITER RJ. Melatonin: lowering the High Price of Free Radicals. *News Physiol Sci* 2000; **15**:246–250.
 57. HARDELAND R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**:2001–2018.

Discusión

1. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE LA eNOS

La eNOS es una enzima clave en la fisiología vascular, ya que el NO• sintetizado por las células endoteliales ejerce numerosas acciones que mantienen la función normal del endotelio y la homeostasis vascular (Palmer y cols., 1987; Kubes y cols., 1991; Dimmeler y Zeiher, 1999; de Graaf y cols., 1992). Existe un gran número de estudios que muestran una estrecha asociación entre la baja biodisponibilidad del NO• y la aparición de diversas patologías cardiovasculares (Naseem, 2005). También se ha demostrado en ratones, que numerosas estatinas poseen un efecto citoprotector al incrementar la eNOS en el endotelio, y disminuir la necrosis durante los procesos de isquemia/reperfusión. Sin embargo, este efecto no se pudo observar en ratones deficientes en eNOS (Jones y cols., 2002). Por tanto, los efectos pleiotóricos de las estatinas en el endotelio vascular se han asociado con un incremento de NO• derivado de la eNOS previniendo, de esta forma, el daño del endotelio vascular y manteniendo el flujo sanguíneo.

Nuestros resultados muestran una disminución de la expresión de la eNOS en las células HUVEC incubadas con LPS, mientras que la atorvastatina ejerce un importante papel vasculoprotector mediante un aumento de la eNOS. Se sabe que las estatinas pueden aumentar la expresión la eNOS mediante la prolongación de la vida media del ARNm. Esto es consecuencia de la inhibición de la geranilgeranilación de Rho A, el cual, en su forma activa da lugar a reorganizaciones del citoesqueleto de actina que regulan negativamente la estabilidad de los ARNm de la eNOS (Laufs y Liao 1998).

La melatonina también contrarresta la reducción de la eNOS provocada por el LPS. Nuestros resultados muestran por primera vez un sinergismo entre la melatonina y la atorvastatina, ya que cuando ambos compuestos se añaden simultáneamente a las células HUVEC tratadas con LPS, no sólo se contrarresta el efecto del LPS sobre la expresión de la eNOS, sino que aumentan los niveles de eNOS por encima de valor control.

Otros autores (Chen y cols., 2010) también han demostrado un efecto sinérgico entre otras estatinas, como la simvastatina, y la nifedipina para contrarrestar la inhibición de la expresión de la eNOS en células HUVEC incubadas

con H_2O_2 . La nifedipina es un fármaco utilizado en el tratamiento de la hipertensión que, además, tiene propiedades antioxidantes (Yamagishi y cols., 2005). Estos autores establecen una relación directa entre la disminución de los ROS y el aumento de la expresión de la eNOS.

Sin embargo, el mecanismo de acción de la melatonina para incrementar la expresión de la eNOS parece complejo. Mientras que el efecto de la atorvastatina en el aumento de la expresión de la eNOS está bien documentado y existe unanimidad al respecto, los datos disponibles sobre los efectos de la melatonina en la expresión de la eNOS son escasos, contradictorios y están basados en modelos experimentales dispares. Así, mientras que Chucharoen y colaboradores encontraron que la melatonina no participaba en la recuperación de los niveles de proteína eNOS inhibida con H_2O_2 en vasos sanguíneos cerebrales bovinos (Chucharoen y cols., 2007), Koh encontró que la disminución de los niveles de eNOS en tejido cerebral provocada por la isquemia inducida mediante oclusión de la arteria media cerebral, era prevenida por el tratamiento previo con melatonina (Koh, 2008). Otros autores (Park y cols., 2007) demostraron que la melatonina incrementaba los niveles de ARNm de la eNOS en tejido hepático tras un evento de isquemia/reperfusión. Sin embargo, Wang y colaboradores no encontraron que la melatonina alterase significativamente la expresión disminuida del gen de la eNOS en la microcirculación del musculo cremaster de rata provocada por un proceso de isquemia/reperfusión (Wang y cols., 2005).

También hay autores que demuestran que la melatonina reduce la producción de $NO\cdot$ inducida por bradikinina al interactuar con el complejo calcio-calmodulina e impide que la eNOS se una a dicho complejo (Tamura y cols., 2006), mientras que otros autores (Pechanova y cols., 2007) encuentran que la melatonina aumenta la actividad de la eNOS. A pesar de las aparentes discordancias en estos estudios, el aumento de la expresión de la eNOS por la melatonina está demostrado en numerosos trabajos, que indican una relación directa entre el aumento de la expresión de la eNOS y la inhibición del $TNF\alpha$. En efecto, $TNF\alpha$ está considerado uno de los estímulos más potentes para inhibir la expresión de la eNOS en células endoteliales vasculares. Tal inhibición tendría lugar tanto a nivel transcripcional, mediante la disminución de la actividad del promotor del gen de la eNOS (Anderson y cols., 2004; Neumann y cols., 2004),

como a nivel postranscripcional, mediante la disminución de la estabilidad o vida media de su ARNm (Yoshizumi y cols., 1993; Yan y cols., 2008). Por otro lado, se sabe que la melatonina, probablemente mediante la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- κ B, es capaz de inhibir la expresión de TNF α (sacco y cols., 1998; Chandel y cols., 2000; Chahbouni y cols., 2010).

Todos estos datos parecen indicar que los efectos de la melatonina en el tono vascular dependen de las condiciones experimentales y, es por ello, que los diferentes datos que encontramos en la bibliografía son contradictorios. Nuestros resultados indican un efecto positivo de esta indolamina sobre la eNOS. Además, cuando la eNOS se inhibe por el LPS, la melatonina tiene un efecto protector, no sólo incrementando los niveles de la proteína eNOS, sino también induciendo la expresión del ARNm de la eNOS. Por otra parte, otros autores ((Lu y cols, 1996) demostraron en células endoteliales de vena coronaria bovina, que la disminución de los niveles de la proteína y del ARNm de la eNOS provocada por el LPS se debía a un aumento de la tasa de degradación del ARNm.

Nuestros resultados apoyan un efecto beneficioso de la melatonina sobre la función endotelial mediante el aumento de la expresión de la eNOS en condiciones en las que esta está disminuida, por ejemplo durante un proceso inflamatorio, como en nuestro modelo experimental.

2. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

2.1. Expresión de la proteína iNOS

Es bien conocido que la disminución de la biodisponibilidad de NO \bullet es un hecho central en la disfunción endotelial. El NO \bullet ejerce numerosos efectos vasoprotectores, de modo que unos niveles anormalmente bajos de esta molécula a nivel endotelial altera la homeostasis vascular. Sin embargo, la sobreproducción de NO \bullet por parte de la iNOS tiene efectos tóxicos y provoca muerte celular, participando también en la disfunción endotelial.

Nuestros estudios revelan que el LPS incrementa la expresión de la iNOS en las células HUVEC, y que este efecto es potenciado por la atorvastatina. El

mecanismo de acción de la atorvastatina para incrementar la expresión de la iNOS no se conoce. Se sabe que el factor de transcripción NF- κ B es una diana central para los activadores o inhibidores de la expresión de la iNOS. Se ha visto que factores, como el LPS, la IL-1 β , el TNF- α o el propio estrés oxidativo, inducen la expresión de la iNOS en la células endoteliales mediante la activación de del NF- κ B (Pautz y cols., 2010). Gao y colaboradores también demostraron que en las células HUVEC tratadas con LPS se producía un incremento de la expresión de la iNOS al mismo tiempo que se incrementaba la expresión de NF- κ B. Estos autores también encontraron que el LPS inducía un aumento en la permeabilidad de la monocapa de células HUVEC, lo cual se relacionó con la excesiva formación de peroxinitrito y la despolimerización de la F-actina (Gao y cols., 2006). Por otro lado, varios estudios llevados a cabo con distintos tipos celulares han demostrado que las estatinas potencian el efecto de las citoquinas o del LPS para incrementar la expresión de la iNOS y, que además, son capaces de inducir la expresión de dicha enzima por sí mismas. Esta acción de las estatinas, parece ser un mecanismo independiente de la activación de NF- κ B y dependiente de la inhibición de la geranilgeranilación y de la actividad de proteínas G monoméricas de la familia Rho. Estas proteínas Rho median cambios en el citoesqueleto de actina que modulan negativamente la expresión de la iNOS. Así, las estatinas podrían inducir la expresión de la iNOS ya que, al inhibir la síntesis de mevalonato, también inhiben la geranilgeranilación de las proteínas Rho, y por tanto su actividad (Finder y cols., 1997; Witteck y cols., 2003; Hattori y cols., 2002, 2004; Kolyada y cols., 2001). Sin embargo, otros autores han encontrado que las estatinas inhibían la expresión de la iNOS inducida por LPS o por citoquinas. En este caso, la causa se atribuye a la inhibición de la actividad de la proteína G monomérica p21 ras. Hay evidencias de que la activación de p21 ras está involucrada en la activación de NF- κ B y la consecuente inducción de la iNOS. Las estatinas, mediante la inhibición de la síntesis de mevalonato, también inhiben la farnesilación de la proteína p21 ras, una etapa necesaria para su activación, provocando así la inhibición de la inducción de la iNOS (Pahan y cols., 1997, 2000; Ghosh y cols., 2009). Por tanto, las estatinas pueden incidir sobre la iNOS a través de dos vías distintas, que provocan efectos contrapuestos. Como se ha descrito para otras vías de transducción de

señales, el efecto de las proteínas G monoméricas sobre la expresión de la iNOS puede depender del tipo celular, el sistema orgánico o la especie investigada.

Nuestros resultados demuestran un efecto dual de la atorvastatina sobre el endotelio ya que, aunque el aumento de la expresión de la eNOS resulta beneficioso para la función endotelial, el aumento de la expresión de la iNOS tendría efectos perjudiciales que podrían restar a estos fármacos eficacia en la mejora de la función vascular, dado el carácter prooxidante y proinflamatorio de la iNOS.

El efecto inhibitor de la melatonina sobre la expresión de la iNOS, que se ha demostrado demostrado en múltiples modelos experimentales (Escames y cols., 2003, 2006a, 2006b), también se observa en nuestro estudio, contrarrestando la inducción de la iNOS por el LPS en las células HUVEC. La melatonina también contrarresta el efecto estimulante de la atorvastatina sobre la iNOS. Incluso, se observa que la melatonina es mucho más eficaz cuando se administra conjuntamente con la atorvastatina, disminuyendo los niveles de la iNOS por debajo del control. Esto podría deberse a que la melatonina es más eficaz cuando el daño celular es mayor (Escames y cols. 2006a). El mecanismo de acción por el cual la melatonina inhibe la expresión de la iNOS parece ser debido a la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Gilad y cols., 1998). En células endoteliales de rata, Tamura y colaboradores encontraron que la melatonina bloquea la vía del NF- κ B, provocando la inhibición de la expresión de la iNOS inducida por LPS (Tamura y cols., 2009). Nuestros resultados sugieren que la melatonina, al reducir la expresión de la iNOS inducida por la atorvastatina previene los efectos deletéreos de esta estatina sobre el endotelio, a la vez que mejora los efectos beneficiosos de la misma sobre la eNOS. Por tanto, el uso de melatonina en combinación con atorvastatina podría regular el equilibrio eNOS/iNOS hacia la eNOS, produciéndose suficiente NO• para la regulación de la función endotelial, y previniendo el exceso de NO• y la producción del anión tóxico ONOO⁻.

2.2. Niveles de citoquinas proinflamatorias: IL-6

La respuesta inflamatoria es un proceso estrechamente relacionado con la disfunción endotelial y las patologías cardiovasculares como por ejemplo la

aterosclerosis (Clapp y cols., 2004; Recio-Mayoral y cols., 2011). Cuando se produce una respuesta inflamatoria, los macrófagos liberan citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento que contribuyen a la activación y proliferación de las células del músculo liso (Yamamoto y cols., 2003). Por tanto, en los procesos inflamatorios, como sucede en los pacientes con enfermedad isquémica cardiaca, hay un aumento en plasma de citoquinas proinflamatorias, como la IL-18, la IL-6 y el TNF α , así como otros marcadores inflamatorios (Ridker y cols., 2000; Engstrom y cols., 2004).

La IL-6 es un mediador de la respuesta inflamatoria producida por distintos tipos celulares, entre las que se incluyen las células endoteliales. Distintos estudios asocian los niveles elevados de IL-6 con la disfunción endotelial, y se sabe que esta citoquina es un buen marcador o indicador de enfermedades cardiovasculares. Se ha visto una correlación negativa entre los niveles de IL-6 y la vasodilatación dependiente del endotelio, tanto en sujetos sanos como en afectados del síndrome coronario agudo o de hipercolesterolemia (Esteve y cols., 2007; Lee y cols., 2006; Dessein y cols., 2005; Nawawi y cols., 2003). Sin embargo, existe una correlación positiva entre los niveles de IL-6 y la presencia o el riesgo de padecer distintas patologías cardiovasculares (Pradhan y cols., 2002; Koenig y cols., 2006; Fisman y cols., 2006; Chae y cols., 2001).

También se ha visto que la IL-6 puede inhibir la activación de la eNOS, disminuyendo la producción de NO \bullet en el endotelio. En este sentido Hung y colaboradores encontraron que, en las células HUVEC, el tratamiento con IL-6 durante 6 horas disminuye la fosforilación de la eNOS en la Ser1177 y, por lo tanto, su activación. Además, el tratamiento con IL-6 provoca un aumento en la vida media de la caveolina-1 que da lugar a una inhibición de la eNOS debido al aumento la interacción proteína-proteína entre la eNOS y la caveolina (Hung y cols., 2010).

Numerosas publicaciones han mostrado que el LPS induce la producción de IL-6 en células endoteliales, incluyendo las células HUVEC (Jirik y cols., 1989; Zeuke y cols., 2002; Kizsel y cols., 2007). En nuestro estudio, el LPS provoca un aumento muy significativo de los niveles intracelulares de IL-6 en las células HUVEC. Este hecho, junto con la inducción de la iNOS observada anteriormente,

avala la validez de nuestro modelo de inducción de la respuesta inflamatoria en las células HUVEC mediante su incubación con esta endotoxina.

Aunque existen estudios que han demostrado una acción antiinflamatoria de la atorvastatina (Hernandez-Presa y cols., 2002; Nawawi y cols., 2003), nosotros fuimos incapaces de detectar ninguna acción antiinflamatoria de esta estatina. En nuestros experimentos, la atorvastatina no sólo no reduce la producción de IL-6 inducida por LPS, sino que además, aumenta la expresión de la iNOS. Nuestros datos confirman los resultados de algunos ensayos clínicos encaminados a determinar los efectos del tratamiento con estatinas sobre los marcadores inflamatorios en pacientes con insuficiencia cardiaca crónica. Estos estudios revelan que las estatinas no son capaces de reducir los niveles de IL-6 y de TNF- α , aunque si disminuyen los niveles de la proteína C reactiva de alta sensibilidad y los niveles de las VCAM-1 solubles (Zhang y cols., 2010). Estos resultados apoyan que la atorvastatina ejerce una actividad proinflamatoria en las células endoteliales en presencia de un estímulo inflamatorio como sucede con el LPS, y que este podría exceder a sus propiedades beneficiosas. De nuevo, el balance eNOS/iNOS podría ser crítico para la función de las células endoteliales y, en este equilibrio, la melatonina podría jugar un papel homeostático.

Se sabe que la melatonina tiene importantes acciones antiinflamatorias, incluyendo la modulación de las respuestas de la iNOS y de la COX-2, así como la producción de citoquinas (Crespo y cols., 1999; Carrillo-Vico y cols., 2005; Mayo y cols., 2005). La disminución de la IL-6 por la melatonina también se ha demostrado en otros modelos experimentales (Kang y cols., 2011; Chahbouni y cols., 2010). En nuestro estudio encontramos que la melatonina protege las células endoteliales mediante la inhibición de la producción de IL-6 inducida por el LPS. Observamos que la melatonina también contrarresta la respuesta inflamatoria cuando se administra con la atorvastatina. Estos resultados son muy importantes porque la IL-6, junto con otras citoquinas como el TNF- α , contribuye a la disfunción endotelial y a muchas patologías cardiacas. (Mann, 2002). Por tanto, estos resultados demuestran que la melatonina aumenta los efectos beneficiosos de la atorvastatina, protegiendo las células endoteliales del daño que provoca la respuesta inflamatoria.

3. EFECTO DE LA ATORVASTATINA Y DE LA MELATONINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

3.1. Niveles de ROS intracelulares

Numerosos datos en la bibliografía indican que el estrés oxidativo contribuye de forma significativa al establecimiento de la disfunción endotelial (Cai y Harrison, 2000) y juega un importante papel en la patogénesis y el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (Lakshmi y cols., 2009). La excesiva producción de ROS puede oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y también disminuir la biodisponibilidad del NO• a nivel vascular a través de distintos mecanismos, promoviendo de este modo la disfunción endotelial (Radi y cols., 1991; Kuzkaya y cols., 2003; Cooke, 2000). Los ROS inhiben la expresión de la eNOS (Chen, 2010; Hansson, 2005) contribuyendo a un estado hipertensivo en las personas mayores.

Diversos estudios también han demostrado una capacidad antioxidante de las estatinas. Así, se ha comprobado que el tratamiento con estatinas previene la oxidación de las LDL (Hussein y cols., 1997, Suzumura y cols., 1999, Yasuhara y cols., 2000, Rikitake y cols., 2001) y, por tanto, se ha sugerido que las estatinas pueden reducir el estrés oxidativo intracelular (Liao, 2002). Además, se ha visto que las estatinas disminuyen la actividad de la NADPH oxidasa, una de las principales fuentes de ROS en las células endoteliales. Esto es debido a la inhibición por parte de las estatinas de la isoprenilación de la proteína monomérica de unión a GTP, Rac1, la cual está implicada en el ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa (Wagner y cols., 2000). La actividad depuradora de ROS es compartida por muchas estatinas, incluida la atorvastatina (Wagner y cols., 2000), que previene la formación del radical superóxido en segmentos de la arteria coronaria (Christ y cols., 2002). Sin embargo, en nuestro estudio, no encontramos que la atorvastatina prevenga la generación de ROS inducida por el H₂O₂ en las células HUVEC. La melatonina, en cambio, muestra su bien conocida actividad antioxidante, provocando una reducción significativa de los niveles de ROS. Estos resultados son muy interesantes, ya que el tratamiento con melatonina más atorvastatina muestra un efecto sinérgico, provocando una disminución de ROS

mayor que la conseguida solo con melatonina. Estos datos sugieren, que en unas condiciones similares, en presencia de otros antioxidantes, la atorvastatina también podría tener efectos antioxidantes. De hecho, Chen y colaboradores encuentran que la simvastatina y la nifedipina tienen un efecto antioxidante sinérgico, disminuyendo el estrés oxidativo en las células HUVEC incubadas con H₂O₂ (Chen y cols., 2010).

3.2. Niveles de peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es una de las principales consecuencias del daño producido en los tejidos por los radicales libres. Los lípidos de membrana son susceptibles de la peroxidación, de tal forma, que esta peroxidación lipídica puede perturbar la estructura de la membrana causando cambios en la fluidez y la permeabilidad, alteraciones del transporte iónico e inhibición de procesos metabólicos (Nigam y Schewe, 2000). Además, como consecuencia de la lipoperoxidación, se forma una gran variedad de subproductos, algunos de los cuales son altamente reactivos (Esterbauer y cols., 1991; Parola y cols., 1999; Uchida, 1999; Kehrer y Biswal, 2000; Lee y cols., 2001). La peroxidación también puede afectar a las LDL dando lugar a las LDL oxidadas, que son mediadores clave en el proceso de aterosclerosis (Joseph y cols., 2001).

En otros estudios, en nuestro grupo se ha demostrado que en un modelo experimental de sepsis inducida por LPS en ratas hay un aumento de la LPO en los diferentes tejidos estudiados (pulmón, hígado, corazón, etc), y que la melatonina contrarresta los efectos del LPS (Crespo, 1999; Escames y cols 2003, 2006a). El efecto de la melatonina para disminuir la LPO también se ha comprobado en humanos. La LPO disminuye en niños con síndrome de Duchenne tratados con melatonina (Chahbouni y cols., 2010). En nuestro estudio, los niveles de LPO en las células HUVEC aumentaron con el LPS. Este efecto del LPS podría estar relacionado con la inducción de la iNOS y, por tanto, con un excesivo aumento de NO y de ONOO⁻. La melatonina, debido a su potente actividad antioxidante, restablece los niveles de peroxidación lipídica hasta los valores controles, sin embargo, la atorvastatina no contrarresta de forma significativa el efecto del LPS. Al igual que ocurre con los radicales libres, cuando las células HUVEC se incuban con

melatonina más atorvastatina, encontramos un efecto antioxidante sinérgico, disminuyendo los niveles de LPO hasta un 44 % por debajo del valor control.

De nuevo, nuestros resultados demuestran que la melatonina aumenta los efectos beneficiosos de la atorvastatina, protegiendo a las células endoteliales del daño oxidativo.

Los resultados de este estudio sugieren que la melatonina, que es un potente antioxidante y antiinflamatorio, y que puede difundir fácilmente al interior de las células (Tan y cols., 1993, 2000b, 2007; Reiter, 2000; Hardeland, 2008), tenga efectos beneficiosos en las enfermedades cardiovasculares (Tengattini y cols., 2008; Reiter y cols., 2010; León y cols., 2004). Nuestros datos apoyan la terapia combinada de melatonina más atorvastatina para mejorar los efectos beneficiosos de esta última, incrementando la expresión de la eNOS y previniendo los efectos adversos de la estatina, y reduciendo la reacción inflamatoria y la generación de ROS. Dada la baja toxicidad de la melatonina, incluso usada a largo plazo (Reiter y cols., 2002), nuestros resultados proporcionan evidencias para la valoración terapéutica de la melatonina en combinación con atorvastatina en la práctica clínica.

Conclusiones

1. La melatonina ejerce un efecto beneficioso sobre la función endotelial, aumentando la expresión de la eNOS inhibida por el proceso inflamatorio, y disminuyendo la expresión de la iNOS inducida por dicho proceso.
2. La atorvastatina, que aumenta la expresión de la eNOS, muestra también una actividad proinflamatoria en las células endoteliales en presencia de un estímulo inflamatorio como el LPS, lo que disminuye de manera significativa sus propiedades beneficiosas.
3. En presencia de atorvastatina, la melatonina es capaz de fortalecer los efectos positivos de ésta sobre el endotelio vascular, potenciado la expresión de la eNOS, mientras que reduce sus efectos negativos, inhibiendo la expresión de la iNOS inducida por la atorvastatina.
4. Los efectos beneficiosos de la melatonina frente al daño endotelial también se reflejan en la reducción de los niveles de IL-6 durante la inflamación, efecto que tampoco la atorvastatina es capaz de controlar. Estos resultados son de gran significado, ya que la IL-6, junto con otras citoquinas como el TNF- α , contribuye a la disfunción endotelial y a diversas patologías cardíacas.
5. La melatonina, pero no la atorvastatina, contrarresta el estrés oxidativo del endotelio vascular en presencia de un estímulo prooxidante como el H₂O₂, lo que facilita la acción de la estatina en la célula.
6. Nuestros resultados muestran por primera vez un sinergismo entre la melatonina y la atorvastatina, potenciando la primera los efectos beneficiosos de la estatina, y eliminando sus efectos colaterales negativos, a la vez que la melatonina crea un ambiente reducido que disminuye el daño endotelial debido al estrés oxidativo/inflamatorio creado por el LPS.

Bibliografía

- Abu-Soud HM, Feldman PL, Clark P, Stuehr DJ. Electron transfer in nitric-oxide synthases. Characterization of L-arginine analogs that block heme iron reduction. *J Biol Chem.* 1994; 269: 32318-32326.
- Abu-Soud HM, Presta A, Mayer B, Stuehr DJ. Analysis of neuronal NO synthase under singleturnover conditions: conversion of N ω -hydroxyarginine to nitric oxide and citrulline. *Biochemistry.* 1997; 36: 10811-10816.
- Abyja PM, Liebmann P, Hayn M, Schauenstein K, Esterbauer H. Antioxidant role of melatonin in lipid peroxidation of human LDL. *FEBS Lett.* 1997; 413: 289-293.
- Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1993; 82: 253-256.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, López LC, Hitos AB, León J. Melatonin and nitric oxide: two required antagonists for mitochondrial homeostasis. *Endocrine.* 2005; 27: 159-168.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, León J, Carazo A, Khaldy H. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Advances in experimental Medicin and Biology.* 2003; 527: 549-557.
- Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res.* 1994; 12: 100-112.
- Acuña-Castroviejo D, Martin M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res.* 2001; 30: 65-74.
- Acuña-Castroviejo D, Carretero M, Doerrier C, López LC, García L, Tresguerres JA, Escames G. Melatonin protects lung mitochondria from aging (2011b). *AGE DOI* 10.1007/s11357-011-9267-8.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem.* 2002; 2: 133-151.
- Acuña-Castroviejo D, Tapias V, López LC, Doerrier C, Camacho E, Carrión MD, Mora F, Espinosa A, Escames G. Protective effects of synthetic kynurenines on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *Brain Res Bull.* 2011a; 30; 85: 133-140.

- Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2010; 36: 1286-1298.
- Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* 2003; 199: 8-17.
- Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res.* 2003; 34: 1-10.
- Alonso J, Sanchez de Miguel L, Monton M, Casado S, and Lopez-Farre A. Endothelial cytosolic proteins bind to the 39 untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 5719-5726.
- Anderson HD, Rahmutula D, and Gardner DG. Tumor necrosis factor- α inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 963-969.
- Andrade SE, Donahue JG, Chan KA, Watson DJ, Platt R. Liver function testing in patients on HMG-CoA reductase inhibitors. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2003; 12: 307-313.
- Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research.* 1999; 43: 521-531.
- Antolin IC, Rodríguez RM, Sain JC, Mayo H, Aria M, Kotle MJ, Rodríguez-Colunga J, Toliva D, Menéndez-Peláez A. Neurohormone α MT prevents damage: Effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1996; 10: 882-890.
- Axelrod J, Weissbach H. Purification and properties of hydroxyindole-O-methyltransferase. *J Biol Chem.* 1961; 236: 211-213.
- Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transduce. *Science.* 1974; 184: 1341-1348.
- Axelrod J, Wurtman RJ, Snyder SH. Control of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental light. *The Journal of Biological Chemistry.* 1965; 240: 949-954.
- Ballantyne CM, Corsini A, Davidson MH, Holdaas H, Jacobson TA, Leitersdorf E, März W, Reckless JP, Stein EA. Risk for myopathy with statin therapy in high-risk patients. *Arch Intern Med.* 2003; 163: 553-564.
- Balligand J-L, Ungureanu-Langrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, Smith TW, Michel

- T. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1994; 269: 27580-27588.
- Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H, Sessa WC. Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; 278: 14841-14849.
- Becker-André M, Wiesenberg I, Scharren-Wiemers N, André E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem.* 1994; 269: 28531.
- Bender AT, Silverstein AM, Demady DR, Kanelakis KC, Noguchi S, Pratt WB, Osawa Y. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem.* 1999; 274: 1472-14728.
- Benett HS, Luft JH, Hampton JC. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol.* 1959; 196: 381-390.
- Benítez-King G, Antón-Tay F. In vitro inhibition of Ca²⁺/CaM-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1290: 191-196.
- Berk B. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev.* 2001; 81: 999-1030.
- Berka V, Wu G, Yeh HC, Palmer G, Tsai AL. Three different oxygen induced radical species in eNOS oxygenase under regulation by L-arginine and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem.* 2004; 279: 32243-32251.
- Birau N, Petersen U, Meyer C, Gottschallt J. Hypotensive effect of melatonin in essential hypertension. *IRCS Med Sci.* 1981; 9: 906-909.
- Bouloumie A, Schinikerth VB, and Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 1999; 41: 773-780.
- Bourcier T, Libby P. HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 556-562.
- Boveris A, Costa LE, Poderoso J J, Carreras MC, Cadenas E. Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and NO. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2000; 899: 121-135.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.

- Brown DA, London E. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 240: 1-7.
- Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by NO inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2001; 1504: 46-57.
- Buckett L, Ballard P, Davidson R, Dunkley C, Martin L, Stafford J, McTaggart F. Selectivity of ZD4522 for inhibition of cholesterol synthesis in hepatic versus non-hepatic cells. *Atherosclerosis.* 2000; 151: 41.
- Buttery LDK, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest.* 1996; 75: 77-85.
- Cagnacci A, Cannoletta M, Renzi A, Baldassari F, Arangino S, Volpe A. Prolonged melatonin administration decreases nocturnal blood pressure in women. *Am J Hyperten.* 2005; 18: 1614-1618.
- Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev M. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res.* 1995; 18: 222-226.
- Cahill GM, Berharse JC. Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 1098-1102.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87: 840-844.
- Carlberg C, Weisenberg I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: and unexpected relationship. *J Pineal Res.* 1995; 18: 171-178.
- Carretero M, Escames G, López LC et al. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J Pineal Res.* 2009; 47: 192-200.
- Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine.* 2005; 27: 189-200.
- Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, García-Maurino S, Reiter RJ, Guerrero JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004; 18: 537-539.
- Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R, Guerrero JM, Pozo D. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs.* 2006; 7: 423-431.
- Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 2001; 38: 399-403.

- Chahbouni M, Escames G, López LC, Sevilla B, Doerrier C, Muñoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Acuña-Castroviejo D. Melatonin treatment counteracts the hyperoxidative status in erythrocytes of patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *Clin Biochem.* 2011; 44: 853-858.
- Chahbouni M, Escames G, Venegas C, Sevilla B, Garcia JA, Lopez LC, Munoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Acuna-Castroviejo D. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res.* 2010; 48: 282-289.
- Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF- κ B activation and TNF- α gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol.* 2000; 165: 1013-1021.
- Chen XN, Xu J, Feng Z, Fan M, Han JY, Yang Z. Simvastatin combined with nifedipine enhances endothelial cell protection by inhibiting ROS generation and activating Akt phosphorylation. *Acta Pharmacol Sin.* 2010; 31: 813-820.
- Chidlow JH Jr, Sessa WC. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2010; 1; 86: 219-225.
- Cho HJ, Xie Q-w, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med.* 1992; 176: 599-604.
- Christ M, Bauersachs J, Liebetrau C, Heck M, Gunther A, Wehling M. Glucose increases endothelial-dependent superoxide formation in coronary arteries by NAD(P)H oxidase activation: attenuation by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor atorvastatin. *Diabetes.* 2002; 51: 2648-2652.
- Chuang JI, Mohan N, Meltz ML, Reiter RJ. Effect on melatonin on NF- κ B DNA-binding activity in the rat spleen. *Cecl Biol Int.* 1996; 20: 687-692.
- Chucharoen P, Chetsawang B, Putthaprasart C, Srikiatkachorn A, Govitrapong P. The presence of melatonin receptors and inhibitory effect of melatonin on hydrogen peroxide-induced endothelial nitric oxide synthase expression in bovine cerebral blood vessels. *J Pineal Res.* 2007; 43: 35-41.
- Civeira F, Gonzalvo C, Ferrando J. Prevención y monitorización de las principales reacciones adversas a las estatinas. *Clin Invest Arterioscl.* 2002; 14: 33-40.
- Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, MacAllister RJ. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res.* 2004; 64: 172-178.
- Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2032-2037.
- Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, Guerrero JM, Acuña-Castroviejo D. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in

- liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J.* 1999; 13: 1537-1546.
- Datta YH, Ewenstein BM. Regulated secretion in endothelial cells: biology and clinical implications. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 1148-1155.
- De Almeida EA, Martinez GR, Klitzke CF, de Medeiros MH, Di Mascio P. Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ($O_2(1\Delta g)$) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine. *J Pineal Res.* 2003; 35: 131-137.
- De Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma J. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation.* 1992; 85: 2284-2290.
- De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The Transcription Factor NF- κ B and the Regulation of Vascular Cell Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: e83-e88.
- Dejana E, Orsenigo F, Molendini C, Baluk P, McDonald DM. Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res.* 2009; 335: 17-25.
- del Gobbo V, Libri V, Villani N, Calio R, Nistico G. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int J Immunopharmacol.* 1989; 11: 567-573.
- Dessein PH, Joffe BI, Singh S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: R634-R643.
- Dimitrov S, Lange T, Tieken S, Fehm HL, Born J. Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans. *Brain Behav Immun.* 2004; 18: 341-348.
- Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rütten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest.* 2001; 108: 391-397.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999; 399: 601-605.
- Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide – an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 964-968.
- Dobsak P, Siegelova J, Eicher JC, Jancik J, Svacinova H, Vasku J, Kuchtickova S, Horky M, Wolf JE. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and

- inhibits apoptosis in isolated working rat heart. *Pathophysiology*. 2003; 9: 179-187.
- Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, García-Gonzalez MJ, Samimi-Fard S, Kaski JC, Reiter RJ. Light/dark patterns of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in relation to melatonin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Pineal Res*. 2008; 44: 65-69.
- Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res*. 2000; 86: 347-354.
- Dudzinski DM, Igarashi J, Greif DM, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006; 46: 235-276.
- Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, Leibetseder VJ, Thalhammer T, Marktl W. Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J Recept Signal Transduct Res*. 2001; 21: 85-91.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2002; 277: 38079-38088.
- Engstrom G, Hedblad B, Stavenow L, Tyden P, Lind P, Janzon L, Lindgarde F. Fatality of future coronary events is related to inflammation-sensitive plasma proteins: a population-based prospective cohort study. *Circulation*. 2004; 110: 27-31.
- Ersahin M, Sehirli O, Toklu HZ, Suleymanoglu S, Emekli-Aturfan E, Yarat A, Tatlıdede E, Yeğen BC, Sener G. Melatonin improves cardiovascular function and ameliorates renal, cardiac and cerebral damage in rats with renovascular hypertension. *J Pineal Res*. 2009; 47: 97-106.
- Erwin PA, Lin AJ, Golan DE, Michel T. Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2005; 280: 19888-19894.
- Escames G, Khaldy H, León López J, González L, Acuña-Castroviejo D. Changes in iNOS activity, oxidative stress and melatonin levels in hypertensive patients treated with lacidipine. *J Hypertens*. 2004; 22: 629-635.
- Escames G, López LC, Ortiz F, Ros E, Acuña-Castroviejo D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol*. 2006a; 41: 1165-1173.

- Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla MP, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res.* 2006b; 40: 71-78.
- Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J.* 2003; 17: 932-934.
- Escames G, López LC, Ortiz F, Ros E, Acuña-Castroviejo D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol* 2006a; 41: 1165-1173.
- Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol.* 2006; 5: 4-23.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407-421.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11: 81-128.
- Esteve E, Castro A, Lopez-Bermejo A, Vendrell J, Ricart W, Fernández-Real JM. Serum interleukin-6 correlates with endothelial dysfunction in healthy men independently of insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 2007; 30: 939-945.
- Finder JD, Litz JL, Blaskovich MA, McGuire TF, Qian Y, Hamilton AD, Davies P, Sebt SM. Inhibition of protein geranylgeranylation causes a superinduction of nitric oxide synthase-2 by interleukin-1 β in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1997; 272: 13484-13488.
- Fisman EZ, Benderly M, Esper RJ, Behar S, Boyko V, Alder Y, Tanne D, Matas Z, Tenenbaum A. Interleukin-6 and the risk of future cardiovascular events in patients with angina pectoris and/or healed myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2006; 98: 14-18.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 2001; 88: E68-E75
- Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc. Res.* 1999; 43: 532-541
- Florey L. The endothelial cell. *BMJ.* 1966; 5512: 487-490.
- Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a

- molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res.* 2002; 90: 866-873.
- Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2008; 5: 338-349.
- Frank FG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1161-1168.
- Fujiwara M, Shibata M, Watanabe Y, Nikiwa T, Hirata F, Mizuno N, Hayaishi O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Formation of L-kynurenine from L-tryptophan in cultured rabbit fineal gland. *J Biol Chem.* 1978; 253: 6081-6085.
- Gao J, Zhao WX, Zhou LJ, Zeng BX, Yao SL, Liu D, Chen ZQ. Protective effects of propofol on lipopolysaccharide-activated endothelial cell barrier dysfunction. *Inflamm Res.* 2006; 55: 385-392.
- García JJ, Reiter RJ, Pie J, Ortiz GG, Cabrera J, Sainz RM, Acuña-Castroviejo D. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *Bioenerg Bimembr.* 1999; 31: 609-616.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 1998; 392: 821-824.
- Garcia-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear bindings sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol.* 1998; 92: 76-84.
- Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafiieldrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997; 159: 574-581.
- Garcia-Maurino S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM: Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res.* 2000; 29: 129-137.
- Garcia-Maurino S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci.* 1999; 65: 2143-50.
- Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989; 83: 1774-1777.
- Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR. Molecular cloning and expression of

- inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 3491-3495.
- Gerlach MD, Keh G, Bezold S, Spielmann I, Kürer RU, Peter KJ, Falke H, Gerlach. 1998. Nitric oxide inhibits tissue factor synthesis, expression and activity in human monocytes by prior formation of peroxynitrite. *Intensive Care Med*. 1998; 24: 1199-1208.
- Ghirlanda G, Oradei A, Manto A, Lippa S, Uccioli L, Caputo S, Greco AV, Littarru GP. Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Pharmacol*. 1993; 33: 226-229.
- Ghosh A, Roy A, Matras J, Brahmachari S, Gendelman HE, Pahan K. Simvastatin inhibits the activation of p21ras and prevents the loss of dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2009; 29: 13543-13546.
- Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of RORD, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev*. 1994; 8: 538-553.
- Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF κ B activation. *FASEB J*. 1998; 12: 685-693.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990; 343: 425-430.
- González E, Kou R, Lin AJ, Golan DE, Michel T. Subcellular targeting and agonist-induced site-specific phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2002; 277: 39554-39560.
- Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 280: F193-F206.
- Gross SS, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG. Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent, and inhibited by arginine analogues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 178: 823-829.
- Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem*. 2002; 2: 167-179.
- Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochem*. 2002; 84: 153-166.
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998; 279: 509-514.

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, UK: Oxford University Press. 1999
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1685-1695.
- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993; 17: 347-57.
- Hardeland R, Fuhrberg B. Ubiquitous melatonin. Presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp Biochem Physiol.* 1996; 2: 25-45.
- Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65: 2001-2018.
- Harper CR, Jacobson TA. The broad spectrum of statin myopathy: from myalgia to rhabdomyolysis. *Curr Opin Lipidol.* 2007; 18: 401-408.
- Harris MB, Ju H, Venema VJ, Blackstone M, Venema RC. Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *Gen Pharmacol.* 2000; 35: 165-170.
- Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2153-2157.
- Hattori Y, Kasai K. Disruption of the actin cytoskeleton up-regulates iNOS expression in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 43: 209-213.
- Hattori Y, Nakanishi N, Kasai K. Statin enhances cytokine-mediated induction of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 2002; 54: 649-658.
- Heberlein KR, Straub AC, Isakson BE. The myoendothelial junction: breaking through the matrix? *Microcirculation.* 2009; 16: 307-322.
- Hernandez-Perera O, Pérez-Sala D, Soria E, Lamas S. Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 2000; 87: 616-622.
- Hernandez-Presa MA, Martin-Ventura JL, Ortego M, Gómez-Hernández A, Tuñón J, Hernández-Vargas P, Blanco-Colio LM, Mas S, Aparicio C, Ortega L, Vivanco F, Gerique JG, Díaz C, Hernández G, Egido J. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2002; 160: 49-58.
- Herrmann J, Lerman A. The Endothelium: the Cardiovascular Health Barometer. *Herz.* 2008; 33: 343-353.

- Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Senoh S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem.* 1974; 249: 1311-1313.
- Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. ROR gamma: The third member of RZR/ROR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 205: 1976-1983.
- Holmes SW, Sugden D. The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in rats. *Br J Pharmacol.* 1976; 56: 360-361.
- Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R, Oliván J, Fabrian F, García-Perganeda A, Osuna C. Serum cholesterol and lipid per-oxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Pineal Res.* 2000; 28: 150-155.
- Huber K, Christ G, Wojta J, Gulba D. Plasminogen activator inhibitor type-1 in cardiovascular disease. Status report 2001. *Thromb Res.* 2001; 103: S7-S19.
- Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benítez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J. Pineal Res.* 1994; 17: 55-62.
- Hung MJ, Cherg WJ, Hung MY, Wu HT, Pang JH. Interleukin-6 inhibits endothelial nitric oxide synthase activation and increases endothelial nitric oxide synthase binding to stabilized caveolin-1 in human vascular endothelial cells. *J Hypertens.* 2010; 28: 940-951.
- Hussein O, Schlezinger S, Rosenblat M, Keider M, Aviram M. Reduced susceptibility of low density lipoprotein (LDL) to lipid peroxidation after fluvastatin therapy is associated with the hypocholesterolemic effect of the drug and its binding to the LDL. *Atherosclerosis.* 1997; 128: 11-18.
- Ichiki T, Takeda K, Tokunou T, Iino N, Egashira K, Shimokawa H, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor by hydrophobic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1896-1901.
- Ilnerova N, Backstrom M, Saaf J, Wetterberg L, Vangbo B. Melatonin in rat pineal gland and serum: rapid parallel decline after light exposure at night. *Neurosci Lett.* 1978; 9: 189-193.
- Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science.* 2001; 292: 1160-1164.
- Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 1999; 43: 580-594.

- Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, Kishimoto T, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol.* 1989; 142: 144-147.
- Jonas, M, Garfinkel D, Zisapel N, Laudon M, Grossman E. Impaired nocturnal melatonin secretion in non-dipper hypertensive patients. *Blood Press.* 2003; 12: 19-24.
- Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (The Curves Study). *Am J Cardiol.* 1998; 81: 582-587.
- Jones SP, Gibson MF, Rimmer 3rd DM, Gibson TM, Sharp BR, Lefer DJ. Direct vascular and cardioprotective effects of rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40: 1172-1178.
- Joseph L. Witztum, Daniel Steinberg. The Oxidative Modification Hypothesis of Atherosclerosis: Does It Hold for Humans? *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 11: 93-102.
- Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 14126-14131.
- Kawashima K, Miwa Y, Fujimoto K, Oohata H, Nishino H, Koike H. Antihypertensive action of melatonin in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hyperten A.* 1987; 6: 1517-1528.
- Kehrer JP, Biswal SS. The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci.* 2000; 57: 6-15.
- Kelly MR, Loo G. Melatonin inhibits oxidative modification of human low-density lipoprotein. *J Pineal Res.* 1997; 22: 203-209.
- Kessler P, Bauersachs J, Busse R, Schini-Kerth VB. Inhibition of inducible nitric oxide synthase restores endothelium-dependent relaxations in proinflammatory mediator-induced blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1746-1755.
- Khaldy H, Escames G, León J, Vives F, Luna JD, Acuña-Castroviejo D. Comparative effects of melatonin, L-deprenyl, Trolox and ascorbate in the suppression of hydroxyl radical formation during dopamine autoxidation in vitro. *J Pineal Res.* 2000; 29: 100-107.

- Kilbourn RG, Jubran A, Gross SS, Griffith OW, Levi R, Adams J, Lodato RF. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 172: 1132-1138.
- Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 304: 463-470.
- Kiszel P, Mako V, Prohaszka Z, Cervenak L. Interleukin-6-174 promoter polymorphism does not influence IL-6 production after LPS and IL-1beta stimulation in human umbilical cord vein endothelial cells. *Cytokine.* 2007; 40: 17-22.
- Koenig W, Khuseyinova N, Baumert J, Thorand B, Loewel H, Chambless L, Meisinger C, Schneider A, Martin S, Kolb H, Herder C. Increased concentration of C-reactive protein and IL-6 but not IL-18 are independently associated with incident coronary events in middle-aged men and women: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984–2002. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 2745-2751.
- Koh PO. Melatonin regulates nitric oxide synthase expression in ischemic brain injury. *J Vet Med Sci.* 2008; 70: 747-750.
- Kolyada AY, Fedtsov A, Madias NE. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors upregulate inducible NO synthase expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2001; 38: 1024-1029.
- Kopin IJ, Pare CMB, Axelrod J, Weissbach H. The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem.* 1961; 236: 3072-3075.
- Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin, an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med.* 2009; 15: 43-50.
- Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res.* 1998; 24: 83-89.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 4651-4655.
- Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation.* 2000; 101: 676-681.

- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; 278: 22546-22554.
- Kvetnoy I. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002; 1: 92-96.
- Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med.* 2000; 6: 1399-1402.
- Laaksonen R, Jokelainen K, Sahi T, Tikkanen MJ, Himberg JJ. Decreases in serum ubiquinone concentrations do not result in reduced levels in muscle tissue during short-term simvastatin treatment in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 1995; 57: 62-66.
- Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J Biochem Biophys.* 2009; 46: 421-440.
- Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as marker for cardiovascular events: OX marks the spot. *Circulation.* 2001; 104: 2638-2640.
- Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial Function A Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation.* 2004; 109: 1127-1133.
- Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Naranjo MC, DeFelipe B, Vallejo A, Karasek M, Guerrero JM. Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL-2 production. *J Cell Physiol.* 2006; 206: 273-279.
- Laufs U, Liao JK. Posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem.* 1998; 273: 24266-24271.
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998; 97: 1129-1135.
- Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003; 58: 719-731.
- Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin-II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation.* 1997; 95: 588-593.
- Lee K, Blann AD, Lip GY. Inter-relationships of indices of endothelial damage/dysfunction (circulating endothelial cells, von Willebrand factor and flow-mediated dilatation) to tissue factor and interleukin-6 in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol.* 2006; 111: 302-308.
- Lee SH, Oe T, Blair IA. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science.* 2001; 292: 2083-2086.

- Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*. 2001; 52: 159-164.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Saínz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci*. 2004; 75: 795-790.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res*. 2005; 38: 1-9.
- León J, Macía M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol Pharmacol*. 2000; 58: 967-975.
- Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med*. 1991; 325: 997-1001.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*. 1958; 80: 2587-2592.
- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45: 89-118
- Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol*. 2002; 86: 5-18.
- Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Brivio O, Fumagalli L: Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Nat Immun*. 1998; 16: 1-5.
- López A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, López LC, Acuña-Castroviejo D. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res*. 2009; 46: 188-198.
- López LC, Escames G, Tapias V, Utrilla MP, León J, Acuña-Castroviejo D. Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice. Its relation with mitochondrial dysfunction and revention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38: 267-278.
- Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2005; 15: 302-308.
- Lu JL, Schmiede LM 3rd, Kuo L, Liao JC. Downregulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 225: 1-5.

- Lum H, Malik AB. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996; 74: 787-800.
- Mabuchi H, Higashikata T, Kawashiri M, Katsuda S, Mizuno M, Nohara A, Inazu A, Koizumi J, Kobayashi J. Reduction of serum ubiquinol-10 and ubiquinone-10 levels by atorvastatin in hypercholesterolemic patients. *J Atheroscler Thromb.* 2005; 12: 111-119.
- Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem.* 2003; 270: 832-840.
- MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher D, Trumbauer M, Stevens K, Xie Q-w, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett JS. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell.* 1995; 81: 641-650.
- Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res.* 2002; 91: 988-998.
- Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000; 101: 207-213.
- Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med.* 1996; 21: 307-15.
- Martín M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and D maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 2000a; 14: 1677-1679.
- Martín M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34: 348-357.
- Martín M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito GG, Ortiz D, Acuña-Castroviejo D. Melatonin-induced increases activity of the respiratory Ca²⁺ complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res.* 2000b; 28: 242-248.
- Mass M. A close look at the endothelium: its role in the regulation of vasomotor tone. *European Urology Supplements.* 2009; 8: 48-57.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martín V, Rodríguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59: 1706-1713.

- Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, León L, Rodríguez C, Reiter RJ. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol.* 2005; 165: 139-149.
- McCord CO, Allen EP. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool.* 1917; 23: 207-224.
- McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994; 267: H1921-H1927.
- Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. *J Biol Chem* 1997; 272: 25907-25912.
- Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 2003; 196(3): 430-443
- Mukai Y, Wang CY, Rikitake Y, Liao JK. Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt negatively regulates plasminogen activator inhibitor type 1 expression in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol.* 2007; 292: H1937-H1942.
- Mulhaupt F, Matter CM, Kwak BR, Pelli G, Veillard NR, Burger F, Graber P, Lüscher TF, Mach F. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc Res.* 2003; 59: 755-766.
- Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 2005; 26: 33-65.
- Nava M, Quiroz Y, Vaziri W, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 284: F447-F454.
- Nawawi H, Osman NS, Annuar R, Khalid BA, Yusoff K. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 levels reflect endothelial dysfunction in patients with primary hypercholesterolaemia treated with atorvastatin. *Atherosclerosis.* 2003; 169: 283-291.
- Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF- α induces a decrease in eNOS promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286: L452-L459.
- Nigam S, Schewe T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1488: 167-181.
- Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1992; 90: 2092-2096.

- NordtTK, Peter K, Ruef J, Kübler W, Bode C. Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) and its role in cardiovascular disease. *Thromb. Haemost.* 1999; 82: 14-18.
- Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res.* 1995; 76: 536-543.
- Ohara Y, Sayegh HS, Yamin JJ, Harrison DG. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C. *Hypertension.* 1995; 25: 415-420.
- Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int.* 1998; 32: 69-75.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87: 315-424.
- Pahan K, Liu X, McKinney MJ, Wood C, Sheikh FG, Raymond JR. Expression of a dominant-negative mutant of p21(ras) inhibits induction of nitric oxide synthase and activation of nuclear factor- κ B in primary astrocytes. *J Neurochem.* 2000; 74: 2288-2295.
- Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2671-2679.
- Palinski W. New evidence for beneficial effects of statins unrelated to lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 3-5.
- Palmer RMJ, Ferige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-526.
- Pandi-Perumal SR, Srinivassan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Harderland R. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 2006; 273: 2813-2836.
- Park SW, Choi SM, Lee SM. Effect of melatonin on altered expression of vasoregulatory genes during hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharm Res.* 2007; 30: 1619-1624.
- Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid. Redox Signal.* 1999; 1: 255-284.
- Pasternak C et al. ACC/AHA/NHLBI Clinical advisory on the use and safety of statins. *Circulation.* 2002; 106: 1024-1028.

- Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*. 2010; 23: 75-93.
- Pechanova O, Zicha J, Paulis L, Zenebe W, Dobesova Z, Kojsova S, Jendekova L, Sladkova M, Dovinova I, Simko F, Kunes J. The effect of N-acetylcysteine and melatonin in adult spontaneously hypertensive rats with established hypertension. *Eur J Pharmacol*. 2007; 561: 129-136.
- Petrosillo G, Di Venosa N, Pistolese M, Casanova G, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Paradies G, Ruggiero FM. Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia-reperfusion: role of cardiolipin. *FASEB J*. 2006; 20: 269-276.
- Petrovsky N, Harrison LC. The chronobiology of human cytokine production. *Int Rev Immunol*. 1998; 16: 635-649.
- Piere C, Marra M, Gaspar R, Damjanovich S. Melatonin protects LDL from oxidation but does not prevent the apolipoprotein derivatization. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 222: 256-260.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Pecchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radicals scavenger more potent than vitamin E. *Life Sci*. 1994; 55: 271-276.
- Pierrefiche G, Laborit H. Oxygen radicals, melatonin and aging. *Exp Gerontol*. 1995; 30: 213-227.
- Plenz GA, Hofnagel O, Robenek H. Differential modulation of caveolin-1 expression in cells of the vasculature by statins. *Circulation*. 2004; 109: e7-e8.
- Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin: a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci*. 1994; 738: 419-420.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric-oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 1994; 55: PL455-PL460.
- Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, Siscovick DS, Mouton CP, Rifai N, Wallace RB, Jackson RD, Pettinger MB, Ridker PM. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. *JAMA*. 2002; 288: 980-987.
- Pritchard Jr KA, Ackerman AW, Gross ER, Stepp DW, Shi Y, Fontana JT, Baker JE, Sessa WC. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2001; 276: 17621-17624.

- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991; 266: 4244-4250.
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987; 330: 1057-1058.
- Ravi K, Brennan LA, Levic S, Ross PA, Black SM. S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 2619-2624.
- Recio-Mayoral A, Banerjee D, Streater C, Kaski JC. Endothelial dysfunction, inflammation and atherosclerosis in chronic kidney disease - a cross-sectional study of predialysis, dialysis and kidney-transplantation patients. *Atherosclerosis.* 2011; 216: 446-451.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burrillo S, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol.* 2003a; 527: 539-548.
- Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 957: 341-344.
- Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A. The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension. *J Hyperten.* 2009; 27: 517-520.
- Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res.* 2003a; 58: 10-9.
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.* 2003b; 50: 1129-1146.
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Lopez-Burillo S. Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. *Free Radic Res.* 2002; 36: 1323-1329.
- Reiter RJ, Tan DX, Paredes SD, Fuentes-Broto L. Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. *Ann Med.* 2010; 42: 276-285.
- Reiter RJ, Tan DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J Pineal Res.* 2003b; 34: 79-80.
- Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003; 17: 273-285.
- Reiter RJ. Melatonin: lowering the High Price of Free Radicals. *News Physiol Sci.* 2000; 15: 246-250.

- Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, Oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*. 2007; 454: 345-359.
- Rhodin JAG. Architecture of the vessel wall. In: *Handbook of Physiology, Section 2: the Cardiovascular System. Vol II*. Baltimore, Md: Waverly Press; 1980: 1-31.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000; 101: 2149-2153.
- Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 2001; 154: 87-96.
- Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J*. 1995; 9: 926-933.
- Rodríguez MI, Carretero M, Escames G, López LC, Maldonado MD, Tan DX, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res*. 2007; 41: 15-24.
- Ross, R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340: 115-126.
- Sacco S, Aquilini L, Ghezzi P, Pinza M, Guglielmotti A. Mechanism of the inhibitory effect of melatonin on tumor necrosis factor production in vivo and vitro. *Eur J Pharmacol*. 1998; 343: 249-255.
- Saíñz RM, Mayo JC, Rodríguez C, Tan DX, López-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60: 1407-1426.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 10832-10837.
- Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000; 101: 1899-1906.
- Scheer FAJL, Van Montfrans GA, van Somersen EJW, Mairuhu G, Buijs RM. Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension*. 2004; 43: 192-197.
- Seegar H, Mueck AO, Lippert TH. Effect of melatonin and metabolites on copper-mediated oxidation of low density lipoprotein. *Br J Clin Pharmacol*. 1997; 44: 283-284.

- Shaul PW, Anderson RG. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol.* 1998; 275: L843-L851.
- Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RGW, Michel T. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem.* 1996; 271: 6518-6522.
- Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol.* 2002; 64: 749-774.
- Siddhanta U, Presta A, Fan B, Wolan D, Rousseau DL, Stuehr DJ. Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J Biol Chem.* 1998; 273: 18950-18958.
- Siles M, Goldaracena M, Ávila L, Crespo B. Consumo de hipolipemiantes es España, 1987-2000. *Rev Esp Salud Pública.* 2001; 75: 129-142.
- Silver FH, Christiansen DL, Buntlin CM. Mechanical properties of the aorta: a review. *Crit Rev Biomed Eng.* 1989; 17: 323-358.
- Simko F, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J Pineal Res.* 2007; 42: 319-322.
- Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med.* 2002; 346: 539-540.
- Stan RV. Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1746: 334-348.
- Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, Semmler J, Liebmann PM. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res.* 2001; 30: 243-247.
- Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997; 37: 339-359.
- Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, Adak S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem.* 2004; 279: 36167-36170.
- Sugden D. Circadian change in rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J Neurochem.* 1979; 33: 811-813.
- Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34: 1508-1512.
- Suzumura K, Yasuhara M, Tanaka K, Suzuki T. Protective effect of fluvastatin sodium (XU-62-320), a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)

- reductase inhibitor, on oxidative modification of human low-density lipoprotein in vitro. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57: 697-703.
- Szmuskowicz AW, Heinzelman RV. Synthesis of N-acetylmethoxy-tryptamine. *J Org Chem.* 1960; 25: 287.
- Takahashi S, Mendelsohn ME. Calmodulin-dependent and -independent activation of endothelial nitric-oxide synthase by heat shock protein 90. *J Biol Chem.* 2003a; 278: 9339-9344.
- Takahashi S, Mendelsohn ME. Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90–Akt–CaM- bound eNOS complex. *J Biol Chem.* 2003b; 278: 30821-30827.
- Tamura H, Nakamura Y, Narimatsu A, Yamagata Y, Takasaki A, Reiter RJ, Sugino N. Melatonin treatment in peri- and postmenopausal women elevates serum high density lipoprotein cholesterol levels without influencing total cholesterol levels. *J Pineal Res.* 2008; 45: 101-105.
- Tamura EK, Cecon E, Monteiro AW, Silva CL, Markus RP. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res.* 2009; 46: 268-274.
- Tamura EK, Silva CL, Markus RP. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res* 2006; 41: 267-274.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer, Limson BF, Wintraub ST, Qi W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med.* 2000a; 29: 1177-1185.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J.* 1993; 1: 57-60.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signal Recept.* 2000b; 9: 137-159.
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res.* 2007; 42: 28-42.
- Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, Rezzani R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res.* 2008; 44: 16-25.
- Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA.* 2003; 289: 1681-1690.

- Tomasetti M, Alleva R, Solenghi MD, Littarru GP. Distribution of antioxidants among blood components and lipoproteins: significance of lipids/CoQ10 ratio as a possible marker of increased risk for atherosclerosis. *Biofactors*. 1999; 9: 231-240.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003; 552: 335-344.
- Uchida K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends Cardiovasc Med*. 1999; 9: 109-113.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Lida T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Rad Biol Med*. 1999; 27: 838-847.
- Vakkuri O, Rintamaki H, Leppaluoto J. Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon. *J Endocrinol*. 1985; 105: 263-268.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 1997; 11: 2295-322.
- Van Mourik JA, Romani de Wit T, Voorberg J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol*. 2002; 117: 113-122.
- Vanhaesebroeck B, Leervers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci*. 1997; 22: 267-72.
- Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García-Corzo L, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Extrpineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res*. 2011 Aug 3. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x.
- Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol*. 1982; 95: 355-360.
- Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 61-69.
- Wang XQ, Vaziri ND. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension*. 1999 33: 894-899.

- Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med.* 2008; 14: 37-44.
- Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 612-616.
- Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res.* 2005; 39: 57-65.
- Weibel ER, Palade GE. New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J Cell Biol.* 1964; 23: 101-112.
- Weissbach H, Redfield BG, Axelrod J. Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim Biophys Acta.* 1960; 43: 352-353.
- Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med.* 2001; 7: 687-692.
- Witteck A, Yao Y, Fehir M, Förstermann U, Kleinert H. Rho protein-mediated changes in the structure of the actin cytoskeleton regulate human inducible NO synthase gene expression. *Experimental Cell Research.* 2003; 287: 106-115.
- Xia CH, Shan CH, Xin L, Wang YR, Ding CN, Wang J, Shen LL, Li L, Cao YX, Zhu DN. Effects of melatonin on blood pressure in stress-induced hypertension in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008; 35: 1258-1264.
- Xu CB, Stenman E, Edvinsson L. Reduction of bFGF-induced smooth muscle cell proliferation and endothelin receptor mRNA expression by mevastatina and atorvastatin. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 64: 497-505.
- Yamagishi S, Takeuchi M. Atheroprotective properties of nifedipine. *Int J Tissue React.* 2005; 27: 63-67.
- Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K. Role of mechanical stress in monocytes/macrophages: implications for atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2003; 1: 315-319.
- Yan G, You B, Chen SP, Liao JK, Sun J. Tumor necrosis factor-alpha downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1-alpha 1. *Circ. Res.* 2008; 103: 591-597.
- Yang Z, Krasniei N, Lüscher TF. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation.* 1999; 100: 5-8.

- Yasuhara M, Suzumura K, Tanaka K, Takahashi M, Aoki S, Odawara A, Narita H, Suzuki T. Fluvastatin, an HMG- CoA reductase inhibitor, protects LDL from oxidative modification in hypercholesterolemic rabbits. *Biol Pharm Bull.* 2000; 23: 570-574.
- Yeh DC, Duncan JA, Yamashita S, Michel T. Depalmitoylation of endothelial nitric-oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca²⁺-calmodulin. *J Biol Chem.* 1999; 274: 33148-33154.
- Ying X, Minamiya Y, Fu C, Bhattacharya J. Ca²⁺ waves in lung capillary endothelium. *Circ Res.* 1996; 79: 898-908.
- Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res.* 1993; 73: 205-209.
- Zamboni A, Zamboni-Muciaccia W. Experimental hypertension in pinealectomized rats. *Life Sci.* 1967; 6: 2327-2331.
- Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 67-71.
- Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallynathan V. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1425: 469-77.
- Zeiber AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res.* 1995; 76: 980-986.
- Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res.* 2002; 56: 126-134.
- Zhang L, Zhang S, Jiang H, Sun A, Wang Y, Zou Y, Ge J, Chen H. Effects of statin therapy on inflammatory markers in chronic heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Med Res.* 2010; 41: 464-471.
- Zheng J, Bird IM, Melsaether AN, Magness RR. Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is necessary but not sufficient for basic fibroblast growth factor- and epidermal growth factor-stimulated expression of endothelial nitric oxide synthase in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Endocrinology.* 1999; 140: 1399-1407.
- Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, Hayoz D. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension.* 1998; 32: 351-355.