

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**ESTUDIO DE DIFERENTES FRACCIONES Y
EXTRACTOS DE ALLIUM SATIVUM SOBRE LA
REACTIVIDAD VASCULAR, NIVELES DE
COLESTEROL Y CULTIVOS CELULARES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Patricia Ganado Olmedo

Bajo la dirección del Doctor:

María Teresa Tejerina Sánchez

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2009-9

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



**ESTUDIO DE DIFERENTES FRACCIONES Y
EXTRACTOS DE *ALLIUM SATIVUM* SOBRE LA
REACTIVIDAD VASCULAR, NIVELES DE
COLESTEROL Y CULTIVOS CELULARES.**

TESIS DOCTORAL

PATRICIA GANADO OLMEDO

Madrid, 2001

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



**ESTUDIO DE DIFERENTES FRACCIONES Y
EXTRACTOS DE *ALLIUM SATIVUM* SOBRE LA
REACTIVIDAD VASCULAR, NIVELES DE
COLESTEROL Y CULTIVOS CELULARES.**

TESIS DOCTORAL

PATRICIA GANADO OLMEDO

Madrid, 2001

DIRECTORA:

Dra. TERESA TEJERINA SÁNCHEZ

WILLIAM HARVEY

DEL MOVIMIENTO DEL CORAZÓN Y DE LA SANGRE EN LOS ANIMALES

Versión castellana anotada y antecedita de una

INTRODUCCIÓN HISTÓRICO-CRÍTICA SOBRE
LOS ANTECEDENTES, LOS ORÍGENES Y
LA IMPORTANCIA DE ESTA OBRA

por José Joaquín Izquierdo



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIRECCIÓN GENERAL DE PUBLICACIONES

EXERCITATIO
ANATOMICA DE
MOTV CORDIS ET SAN-
GVINIS IN ANIMALI-
BVS,
GVILIELMI HARVEI ANGLI,
Medici Regii, & Professoris Anatomia in Col-
legio Medicorum Londinens.



FRANCOFRTI,
Sumptibus GVILIELMI FITZERI.
ANNO M. DC. XXVIII.

“También el que los medicamentos aplicados sobre el exterior ejerzan en el interior su poder, como si hubiesen sido ingeridos, es consecuencia de lo mismo: la coloquinta y los áloes sueltan el vientre, y las cantáridas mueven la orina; el ajo aplicado con vendas sobre los pies ayuda a expectorar; los cordiales fortifican, y de este modo obran una infinidad de sustancias. Por lo mismo, no sin razón puede decirse que las venas, por intermedio de sus orificios inmediatos al exterior, son las que los absorben y junto con la sangre los transportan al interior, de un modo que en nada difiere del que las venas del mesenterio emplean para chupar el quilo del intestino y llevarlo mezclado con la sangre del hígado...”

Gvilielmi Harvei Angli, 1628

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer sinceramente a todos los que me han ayudado de una u otra forma durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, sin los cuales no habría sido posible su realización:

A la Prof. Teresa Tejerina Sánchez, directora de esta Tesis Doctoral, por darme la oportunidad de incorporarme en el mundo de la investigación y dirigir esta tesis con gran dedicación.

Al Prof. Pedro Lorenzo Velázquez, Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo en el Departamento y por su constante interés.

Al Prof. Ángel Villar del Fresno, Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por haber accedido a ser el tutor de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Mercedes Sanz Sánchez, compañera de fatigas durante todos estos años, por su apoyo y amistad en los momentos buenos y malos.

A mis compañeras y amigas Maria Eugenia Padilla y Miriam Zeini Moreno por los buenos momentos que hemos pasado juntas.

Al Dr. José Emilio Ruiz Olivar por toda su ayuda y enseñanzas en mis comienzos.

A la Dra. Karla Slowing y al Dr. Matsuura de la Universidad de Illinois (USA) que nos proporcionaron generosamente los extractos utilizados en esta Tesis Doctoral.

A los Profs. Miguel Ángel Lasunción y Pablo Gil-Loyzaga por su colaboración durante la realización de los estudios histológicos.

AGRADECIMIENTOS

A Fernando Ortega, Manolo Bas y Maria Luisa Hidalgo que solucionaron los múltiples problemas “técnicos” que surgieron a lo largo de esta tesis, sin su ayuda todo habría sido mucho más difícil.

A todos los miembros del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por su apoyo y colaboración a lo largo de todos estos años.

A mi familia que siempre estuvo ahí en los momentos difíciles dándome ánimos para seguir adelante.

A Ricardo, gracias por estar siempre conmigo y hacerme feliz cada día.

ÍNDICE



ABREVIATURAS	1
OBJETIVO	5
INTRODUCCIÓN	
I.- EL AJO	
I.1.- HISTORIA	7
I.2.- DESCRIPCIÓN	9
I.3.- COMPOSICIÓN	11
I.4.- ACCIONES FARMACOLÓGICAS DEL AJO	
<i>I.4.1.-Efectos del ajo sobre los factores de riesgo en la enfermedad cardiovascular</i>	16
I.4.1.A.- Efecto sobre los lípidos sanguíneos	17
I.4.1.B.- Efecto sobre la coagulación sanguínea.....	20
I.4.1.C.- Efecto sobre la presión arterial.....	22
I.4.1.D.- Efecto sobre la placa de ateroma.....	24
I.4.1.E.- Efecto sobre la contractilidad vascular.....	25
I.4.1.F.- Efecto sobre la diabetes	26
<i>I.4.2.- Efectos del ajo sobre la función hepática</i>	27
<i>I.4.3.- Efectos del ajo sobre el cáncer</i>	28
I.4.3.A.- Efecto sobre el cáncer de estómago	29
I.4.3.B.- Efecto sobre el cáncer de hígado.....	30
I.4.3.C.- Efecto sobre el cáncer de vejiga.....	31
I.4.3.D.- Efecto sobre el cáncer de colon y rectal.....	31
I.4.3.E.- Efecto sobre el cáncer de pulmón.....	31
I.4.3.F.- Efecto sobre el cáncer de laringe	32
I.4.3.G.- Efecto sobre el cáncer de piel.....	32
I.4.3.H.- Efecto sobre otros tipos de cáncer.....	32
<i>I.4.4.- Efectos sobre la función inmune</i>	33
I.4.4.A.- Ajo y macrófagos	33
I.4.4.B.- Ajo y linfocitos T	33

I.4.4.C.- Ajo y células asesinas (killer).....	34
<i>I.4.5.- Efectos sobre la proliferación celular.....</i>	<i>34</i>
<i>I.4.6.- Efectos sobre los radicales libres.....</i>	<i>35</i>
I.4.6.A.- Ajo como antioxidante	37
I.4.6.B.- Efectos del ajo sobre el envejecimiento	39
<i>I.4.7.- Efectos sobre el estrés</i>	<i>40</i>
<i>I.4.8.- Efectos antifúngicos y antibacterianos del ajo.....</i>	<i>40</i>
<i>I.4.9.- Efectos sobre el SIDA.....</i>	<i>41</i>

II.- ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL

II.1.- LA ÍNTIMA	43
II.2.- LA MEDIA.....	43
II.3.- LA ADVENTICIA	44

III.- REGULACIÓN DEL TONO DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

III.1.- MECANISMO DE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO

VASCULAR.....	45
---------------	----

<i>III.1.1.- Acoplamiento excitación-contracción</i>	<i>46</i>
--	-----------

III.2.- MECANISMO DE LA RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO

VASCULAR.....	50
---------------	----

III.3.- REGULACIÓN ENDOTELIAL DEL TONO VASCULAR.....

III.3.1.- Factores relajantes derivados de endotelio

III.3.1.A- Óxido nítrico (NO)	52
-------------------------------------	----

III.3.1.B- Factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF)	54
--	----

III.3.1.C- Prostaglandina I ₂ o prostaciclina (PGI ₂).....	56
---	----

III.3.2.- Factores contractores derivados de endotelio

III.3.2.A-Factores derivados de la ruta de la ciclooxigenasa.....	60
---	----

III.3.2.B-Endotelina	62
----------------------------	----

IV.- ATEROSCLEROSIS

IV.1.- ETIOLOGÍA	64
<i>IV.1.1.- Lípidos.....</i>	<i>67</i>
<i>IV.1.2.- Tabaco.....</i>	<i>71</i>
<i>IV.1.3.- Hipertensión arterial.....</i>	<i>72</i>
<i>IV.1.4.- Diabetes mellitus.....</i>	<i>72</i>
<i>IV.1.5.- Otros factores de riesgo.....</i>	<i>73</i>
IV.2.- INTERACCIONES CELULARES Y MOLECULARES.....	73
<i>IV.2.1.- Iniciación de la lesión.....</i>	<i>77</i>
<i>IV.2.2.- Inflamación.....</i>	<i>79</i>
<i>IV.2.3.- Formación de células espumosas.....</i>	<i>83</i>
<i>IV.2.4.- Placa fibrosa.....</i>	<i>85</i>
<i>IV.2.5.- Lesiones avanzadas y trombosis.....</i>	<i>86</i>

MATERIAL Y MÉTODOS

I.- ESTUDIO CRÓNICO *EX VIVO*: EFECTO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL DESARROLLO DE LA ATROSCLEROSIS EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS

I.1.- CONDICIONES GENERALES	91
I.2.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	93
<i>I.2.1.- Muestras de sangre.....</i>	<i>93</i>
<i>I.2.2.- Muestras de órganos y arterias.....</i>	<i>94</i>
I.2.2.A.- Muestras de órganos.....	94
I.2.2.B.- Arteria Aorta.....	94
<i>I.2.3.- Sistemas de registro.....</i>	<i>96</i>
I.3.- DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	96
<i>I.3.1.- Determinaciones bioquímicas.....</i>	<i>96</i>
I.3.1.A.- Determinación de la concentración de colesterol total plasmático.....	96
I.3.1.B.- Determinación de la concentración plasmática	

de LDL.....	97
I.3.1.C.- Determinación de la concentración plasmática de HDL.	98
<i>I.3.2.- Determinación del peso corporal y de los distintos órganos.....</i>	<i>99</i>
<i>I.3.3.- Estudio morfométrico de las muestras de aorta.....</i>	<i>99</i>
<i>I.3.4.- Reactividad vascular en arteria aorta.....</i>	<i>100</i>
I.3.4.A.- Efecto del ajo sobre la contracción inducida por potasio y noradrenalina.	100
I.3.4.B.- Efecto del ajo sobre la relajación endotelio dependiente y endotelio independiente.....	100

II.- ESTUDIO *IN VITRO* : ESTUDIO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL MÚSCULO LISO VASCULAR

II.1.- OBTENCIÓN Y MONTAJE DE LOS ÓRGANOS.....	101
<i>II.1.1- Arteria aorta.....</i>	<i>101</i>
<i>II.1.2- Arteria mesentérica.....</i>	<i>101</i>
<i>II.1.3- Sistemas de registro.....</i>	<i>102</i>
II.2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	
<i>II.2.1.- Arteria Aorta.....</i>	<i>103</i>
II.2.1.A.- Basales.....	103
II.2.1.B.- Relajación de la contracción inducida por NA y KCl.....	103
II.2.1.C.- Inhibición de la contracción producida por NA y KCl.....	104
II.2.1.D.- Efecto de la incubación con L-NAME o Indometacina sobre la relajación de la contracción inducida por NA producida por RG 20-100.....	104
II.2.1.E.- Relajación de la contracción inducida por NA en arterias sin endotelio con RG 20-100.....	105
II.2.1.F.- Efecto de RG 20-100 sobre la curva de NPS.....	105
II.2.1.G.- Efecto de RG 20-100 sobre las contracciones	

inducidas por Ca ²⁺ en aorta previamente despolarizada	105
II.2.1.H.- Efecto de RG 20-100 sobre la movilización de Ca ²⁺ intracelular.	106
<i>II.2.2.- Arteria Mesentérica</i>	107
II.2.2.A.- Basales	107
II.2.2.B.- Relajación de la contracción inducida por NA y KCl.....	107
II.2.2.C.- Inhibición de la contracción producida por NA y KCl.....	107
III.- CULTIVOS CELULARES: EFECTO DE RG 20-100 SOBRE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA DE RATA.	
III.1.- OBTENCIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES	
LISAS DE AORTA.	109
III.2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL 109	
<i>III.2.1.- Proliferación celular.</i>	109
<i>III.2.2.- Toxicidad celular: Ldh</i>	110
<i>III.2.3.- Ciclo celular y Síntesis de DNA.</i>	112
IV.- FÁRMACOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS.	
IV.1.- LÍQUIDOS NUTRICIOS.....	114
IV.2.- REACTIVOS QUÍMICOS UTILIZADOS.....	115
IV.3.- EXTRACTOS Y FRACCIONES DE AJO.....	117
V.- ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	117

RESULTADOS

I.- ESTUDIO CRÓNICO *EX VIVO*: EFECTO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL DESARROLLO DE LA ATEROSCLEROSIS EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS.

I.1.- DETERMINACIÓN DEL PESO CORPORAL	118
I.2.- DETERMINACIÓN DEL PESO DE DISTINTOS ÓRGANOS.....	119
I.3.- DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	
<i>I.3.1.- Determinación de la concentración de colesterol total plasmático</i>	121
<i>I.3.2.- Determinación de la concentración plasmática de HDL.....</i>	124
<i>I.3.3.- Determinación de la concentración plasmática de LDL.....</i>	126
I.4.-EFECTO SOBRE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA	128
I.5.- REACTIVIDAD VASCULAR	
<i>I.5.1.- Arteria aorta</i>	
I.5.1.A.- Efecto sobre las contracciones inducidas por NA.....	132
I.5.1.B.- Efecto sobre las contracciones inducidas por KCl.....	133
I.5.1.C.- Relajación dependiente de endotelio	134
I.5.1.D.- Relajación independiente de endotelio.	136

II.- ESTUDIO *IN VITRO*: EFECTO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL MÚSCULO LISO VASCULAR.

II.1.- ARTERIA AORTA

<i>II.1.1.- Basales</i>	140
<i>II.1.2.- Relajación de la contracción inducida por NA</i>	141
<i>II.1.3.- Relajación de la contracción inducida por KCL.....</i>	143
<i>II.1.4.- Inhibición de la contracción inducida por NA</i>	145
<i>II.1.5.- Inhibición de la contracción inducida por KCL.....</i>	147
<i>II.1.6.- Efecto de la incubación con L-NAME o Indometacina sobre la relajación de la contracción inducida por NA producida por RG</i>	

20-100	150
II.1.7.- <i>Relajación de la contracción inducida por NA producida por RG</i> 20-100 en arterias sin endotelio.....	152
II.1.8.- <i>Efecto de RG 20-100 sobre la curva de NPS.....</i>	153
II.1.9.- <i>Efecto de RG 20-100 sobre las contracciones inducidas por</i> <i>Ca²⁺ en aorta previamente despolarizada</i>	154
II.1.10.- <i>Efecto de RG 20-100 sobre la movilización de Ca²⁺</i> <i>intracelular.....</i>	156
II.2.- MESENTÉRICA	
II.2.1.- <i>Basales</i>	158
II.2.2.- <i>Relajación de la contracción inducida por NA</i>	159
II.2.3.- <i>Relajación de la contracción inducida por KCL</i>	161
II.2.4.- <i>Inhibición de la contracción inducida por NA.....</i>	163
II.2.5.- <i>Inhibición de la contracción inducida por KCL</i>	165

III.- CULTIVOS CELULARES: EFECTO DE RG 20-100 SOBRE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA DE RATA.

III.1.- PROLIFERACIÓN CELULAR.....	168
III.2.- MEDIDA DE LA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH).	169
III.3.- CICLO CELULAR Y SÍNTESIS DE DNA.....	171

DISCUSIÓN

I.- ESTUDIO CRÓNICO *EX VIVO*: EFECTO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL DESARROLLO DE LA ATROSCLEROSIS EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS.

I.1.- EFECTOS SOBRE EL PESO CORPORAL, DEL CORAZÓN, HÍGADO Y RIÑONES	180
I.2.- EFECTOS DEL AJO SOBRE EL COLESTEROL TOTAL.....	181
I.3.- EFECTOS DEL AJO SOBRE LAS HDL Y LDL.....	184

I.4.- EFECTOS SOBRE LA PLACA DE ATEROMA	185
I.5.- EFECTOS SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR	187
I.5.1.- Respuesta frente a agentes vasoconstrictores	187
I.5.2.- Relajación dependiente e independiente de endotelio	189
II.- ESTUDIO <i>IN VITRO</i> : EFECTO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL MÚSCULO LISO VASCULAR.	
II.1.- AORTA: EFECTOS SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR	
II.1.1.- Efectos directos en aorta.....	192
II.1.2.- Mecanismo de acción de RG 20-100	194
II.2.- MESENTÉRICA: EFECTOS SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR.....	196
III.- CULTIVOS CELULARES.....	198
CONCLUSIONES.....	201
BIBLIOGRAFÍA.....	202

ABREVIATURAS

AA.....	Acido araquidónico
AII.....	Angiotensina II
Ac.....	Anticuerpo
ACh.....	Acetilcolina
ADP.....	Adenosin difosfato
AMPc.....	Adenosín monofosfato cíclico
Anti BrdU.....	Anti-5' Bromo 2 deoxiuridina
ARN.....	Acido ribonucleico
ATB.....	Antibiótico
BrdU.....	5' Bromo 2 deoxiuridina
Ca ²⁺	Calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio libre intracelular
CaM.....	Calmodulina
CMLV.....	Células musculares lisas vasculares
CSF.....	<i>Colony-stimulating factor</i> (Factor estimulante de colonias)
DAG.....	Diacilglicerol
DMEM.....	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO.....	Dimetil sulfóxido
DNA.....	Ácido desoxiribonucleico
E+.....	Arterias con endotelio
E-.....	Arterias sin endotelio
ECA.....	Enzima convertidora de angiotensina
EDHF.....	<i>Endothelium derived hyperpolarizing factor</i> (factor hiperpolarizante derivado de endotelio)
EDRF.....	<i>Endothelium derived relaxing factor</i> (factor relajante derivado de endotelio)
EGF.....	<i>Epidermal growth factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico)
ET.....	Endotelina
F-75.....	Falcon 75 cm ²
FBS.....	Suero fetal bovino
FGF.....	<i>Fibroblast growth factor</i> (Factor de crecimiento de fibroblastos)

ABREVIATURAS

FG Hp 20-100	Fracción congelada de ajo 20-100
FG Hp 20-20	Fracción congelada de ajo 20-20
FG Hp 20-W	Fracción congelada de ajo 20-W
FG Hp EXT	Extracto congelado de ajo
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GSH.....	Glutation
GSSG	Forma oxidada del glutation
H ₂ O Fr	Fracción acuosa
HB-EGF	<i>Heparin-binding epidermal growth factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico ligado a heparina)
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidad)
20-HETE	20-Hidroxieicosatetranoico
Hipercol.....	Hipercolesterolémico
HMG CoA.....	Hidroximetilglutaril-coenzima A
5-HT	5-Hidroxitriptamina o Serotonina
IFN	Interferón
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> (Factor de crecimiento insulínico)
IgG FITC.....	Anticuerpo antimouse (isotiocianato de fluoresceína)
IL.....	Interleukina
IP	Ioduro de propidio
IP3	Inositol-1, 4,5-trifosfato
K ⁺	Potasio
K _{ATP}	Canales de potasio dependientes de ATP
K _{Ca}	Canales de K ⁺ dependientes de Ca ²⁺
K _V	Canales de K ⁺ dependientes de voltaje, que presentan rectificación tardía
KCl	Cloruro potásico
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL.....	<i>Low density lipoprotein</i> (lipoproteína de baja densidad)
LDLox.....	LDL oxidada

L-NAME	Nw-nitro-L-arginina metil ester
Lp(a)	Lipoproteína a
MCP	<i>Monocyte chemotactic protein</i> (Proteína quimiotáctica de monocitos)
M-CSF	<i>Monocyte colony stimulating factor</i> (Factor estimulante de colonias de monocitos-macrófagos)
MeOH	Metanol
MeOH Fr	Fracción metanólica
MLC	Cadena ligera de miosina
MLCK	Kinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
NA	Noradrenalina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS _e	Óxido nítrico sintasa constitutiva de las células endoteliales
NOS _i	Óxido nítrico sintasa inducible
NOS _n	Óxido nítrico sintasa isoforma neuronal constitutiva
NPS	Nitroprusiato sódico
O ₂ ⁻	Anión superóxido
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)
PG	Prostaglandina
PGI ₂	Prostaglandina I ₂ o Prostaciclina
PIP ₂	Fosfatidil-4,5-bifosfato
PK (A,C y G)	Protein kinasa A, C y G
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PMCA	ATPasa de calcio de la membrana plasmática
RG Hp 20-100	Fracción cruda de ajo 20-100
RG Hp 20-20	Fracción cruda de ajo 20-20
RG Hp 20-W	Fracción cruda de ajo 20-W

ABREVIATURAS

RG EXT	Extracto crudo de ajo
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	Canales de calcio dependientes de receptor
RS.....	Retículo sarcoplásmico
SC.....	Suero de Caballo
SERCA.....	ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico
SOD.....	Superóxido dismutasa
SOD-EC	Superóxido dismutasa extracelular
SSC.....	Solución salina tamponada con fosfato más 0.5% tween 20
TGF.....	<i>Transforming growth factor</i> (Factor de transformación del crecimiento)
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i> (Factor de necrosis tumoral)
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> (lipoproteína de muy baja densidad)
VOC	Canales de calcio dependientes de voltaje

OBJETIVO

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo occidental. Entre estas enfermedades se encuentra la aterosclerosis caracterizada por un deterioro progresivo de las arterias grandes o de capacitancia. En los pacientes afectados, estas lesiones están compuestas de células musculares lisas, matriz extracelular procedente de estas células, cantidades variables de lípidos y menor número de macrófagos/monocitos (Ross, 1993, 1999).

La elevada concentración plasmática de colesterol, especialmente de lipoproteínas de baja densidad (LDL), se considera como el primer gran paso que conduce al desarrollo de la aterosclerosis (Steinberg y cols., 1989; Witztum, 1994). Por otra parte, hay claras evidencias de que la relajación mediada por el factor derivado de endotelio, óxido nítrico (NO), está disminuida en arterias procedentes de animales hipercolesterolémicos y ateroscleróticos (Verbeuren y cols., 1986; Shimokawa y Vanhoutte, 1989b).

El ajo (*Allium sativum* L.) ha sido ampliamente usado durante años no sólo como condimento sino también como medicina popular. Sus conocidos efectos beneficiosos incluyen una acción antimicrobiana (Cellini y cols., 1996), antitrombótica (Bordia y cols., 1996), antihipertensiva (McMahon y Vargas, 1993; Fallon y cols., 1998; Al-Qattan y cols., 1999; Ali y cols., 2000b), antihiperlipidémica (Eilat y cols., 1995; Ismail y cols., 1999) e inhibición de la proliferación celular (Lee y cols., 1994; Orekov y cols., 1995; Knowles y Milner, 2000). El ajo también activa la síntesis de NO en homogenizado celular (Das y cols., 1995 a y b) y diversos investigadores han demostrado que el ajo es un potente vasodilatador (Siegel y cols., 1991; Siegel y cols., 1999).

Sin embargo, otros investigadores han demostrado un mecanismo dual del ajo. Fallon y cols. en 1998, demostraron que el extracto acuoso de ajo usado en su estudio, causaba una relajación dosis-dependiente en arteria pulmonar, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de la enzima óxido nítrico sintasa, y en

arterias con o sin endotelio, si bien, en presencia de L-NAME (inhibidor de la oxido nítrico sintasa) o en arterias sin endotelio, la relajación obtenida era menor. Lo que demostraba que el principal efecto del ajo sobre el músculo liso vascular estaba mediado por la producción de óxido nítrico en las células endoteliales, pero que sin embargo, existía también un efecto directo sobre las células del músculo liso vascular. Este descubrimiento, coincide con estudios que demuestran que el ajo puede producir vasodilatación vía hiperpolarización de la membrana de las células musculares lisas y/o inhibición de la apertura de los canales de calcio (Siegel y cols., 1992).

Sin embargo, existe una gran controversia acerca de las propiedades farmacológicas del ajo, siendo sus efectos muy diferentes dependiendo de la composición del extracto utilizado, y su forma de elaboración.

En esta tesis doctoral nos propusimos como objetivos:

- 1.- Comprobar los posibles efectos beneficiosos en un estudio crónico *ex vivo* de diferentes extractos y fracciones de ajo sobre la alteración de la respuesta vascular que se produce en ratas alimentadas durante 4 meses con una dieta rica en colesterol, así como estudiar los posibles efectos sobre los niveles plasmáticos de colesterol y si existe alguna relación entre ambos.
- 2.- Elucidar un posible mecanismo de acción de las fracciones y extractos estudiados realizando un estudio *in vitro*.
- 3.- Estudiar en cultivo celular el posible efecto antiproliferativo de las fracciones y extractos de ajo estudiados sobre células musculares lisas procedentes de aorta de rata.

INTRODUCCIÓN

I.- EL AJO

I.1.- HISTORIA

El ajo, perteneciente al mismo grupo de plantas de la cebolla, es de tal antigüedad que es difícil saber con certeza su país de origen. De Candolle, en su tratado “*Origen de las plantas cultivadas*” de 1896, consideró que fue aparentemente indígena del sudoeste de Siberia, desde donde se extendió al sur de Europa, donde se aclimató. Es ampliamente cultivado en los países latinos del mediterráneo. Alejandro Dumas describió el aire de Provenza como “ *particularmente perfumado por la refinada esencia de ese mítico y atractivo bulbo*”.

Las propiedades medicinales del ajo (*Allium sativum*), se conocen desde la antigüedad (Harris, 1995). Chinos y Egipcios ya lo utilizaban en la más remota antigüedad: Alimentaban con ajos a los esclavos que construían las pirámides porque creían que el ajo les aportaba energía. También se empleaba en el proceso de momificación y como moneda. El naturalista romano Plinio “el viejo” citó numerosos usos terapéuticos del ajo y la cebolla que eran invocados como deidades por los Egipcios en la toma de juramentos. En el año 1550 a.C. se dan recetas curativas en el papiro egipcio de Ebers. Este papiro incluye 800 fórmulas magistrales de las cuales 22 hacen referencia al ajo. Se recomienda contra las infecciones, los tumores, enfermedades cardíacas, dolores de cabeza, mordiscos y parásitos intestinales.

Fue más tarde comida habitual de los trabajadores y soldados romanos. Celso, un famoso médico romano, lo utilizaba contra la desnutrición y en fiebres intermitentes antes de la subida de ésta. Sin embargo, fue rechazado por la clase alta por su fuerte olor. Tanto Hipócrates como Dioscórides mencionaron su importancia para la medicina. En Grecia y en Roma se consideró un potente afrodisíaco. Los antiguos griegos lo colocaban sobre montones de piedras en los cruces de caminos como ofrenda a Hécate. Sin embargo, Horacio hizo constar su desprecio por el ajo cuyo olor consideraba un signo de vulgaridad. Entre los antiguos griegos aquel que tomaba parte de él no se le permitía su entrada en los templos de Cibele. Homero, sin embargo, relata cómo gracias

a las virtudes del “ajo amarillo” Ulises escapó de ser convertido por Circe en un cerdo, como el resto de sus compañeros.

En la época medieval se usó el ajo para librarse de brujas, vampiros y malos espíritus. El ajo es mencionado en numerosos vocabularios antiguos ingleses de plantas desde el siglo X hasta el XV, y es descrito por los herbolistas del siglo XVI desde Turner (1548) en adelante.

También fue conocido en la Inglaterra del siglo XVI, y mencionado en las obras de Shakespeare. Muchos escritores alaban al ajo como medicina, aunque otros son escépticos respecto a sus poderes. Plinio dio una larga lista de razones en la que el ajo era considerado beneficioso y Galeno lo elogia como “terapia rústica” o “cura-todo”.

En el siglo XIX durante la lucha Argentina por la independencia, San Martín observó que la administración de ajo a sus soldados mientras cruzaban los Alpes, contrarrestaba los efectos de la altitud (Harris, 1995). También Luis Pasteur en 1858 habla de las propiedades antibacterianas del ajo.

Un escritor del siglo XX -Alexander Neckman- lo recomienda como un paliativo para las posibles insolaciones en los campos de trabajo, y en un libro de viaje escrito por Mountstuart Elphinstone hace cien años dice que *“la gente en lugares donde el Simun (viento del desierto) es frecuente, come ajo y frota sus labios y su nariz con él cuando salen al calor del verano para prevenir el sufrimiento del Simun”*

El aceite volátil del ajo tiene propiedades antisépticas que previenen la formación de bacterias, así como propiedades curativas de infecciones del intestino. En las ciudades donde el tifus y el cólera son endémicos, casi toda la población añade pequeñas cantidades de ajo a su comida como medida preventiva.

Durante la II Guerra Mundial se repartía a los soldados para que tuvieran un remedio contra las heridas. Hay una curiosa superstición en algunas partes de Europa: si un bocado del bulbo es masticado por un hombre que corre una carrera evitará que sus competidores le adelanten. Así algunos jockeys Húngaros sujetan un diente de ajo al bocado de sus caballos en la creencia de que cualquier otro caballo que corra cerca caerá al oler el ofensivo olor.

El nombre del ajo (*garlic*) tiene un origen anglosajón, derivando de *gar* (lanza) y de *leac* (planta), en referencia a la forma de sus hojas. El nombre botánico es *Allium sativum* que deriva de la palabra Céltica *al* que significa áspero o abrasivo, y de *sativum* que significa plantado, cultivado o sembrado.

I.2.- DESCRIPCIÓN

Pertenece a la familia de las Liliáceas, el ajo es una planta herbácea que puede alcanzar una altura de unos setenta centímetros. La planta está provista de un bulbo generalmente prolifero, formado a su vez por otros pequeños bulbos o dientes, cubiertos de una membrana de color blanquecino. El olor característico está presente en toda la planta, pero es más intenso en el bulbo. Las flores reunidas en umbela son blanco-verdosas y la floración tiene lugar de junio a julio. Las hojas son largas, estrechas y planas. El fruto es una pequeña cápsula (Figura 1).

El ajo ha sido cultivado durante tantos siglos que es dudoso que se pueda encontrar creciendo de forma salvaje, excepto aquellos que se hayan “escapado” de alguna zona de cultivo. Aunque sólo el ajo cultivado es usado por sus propiedades medicinales, todas las demás variedades tienen propiedades similares en un mayor ó menor grado:

- *Allium vineale*: Son frecuentes en los pastos, que al ser ingeridos por las vacas comunican su sabor rancio a la leche y la mantequilla. Sus bulbos son muy pequeños.
- *Allium ursinum*: Crecen en bosques y tienen un sabor y olor acre. También posee bulbos muy pequeños.
- *Allium oleraceum*: Es una planta rara. Tanto esta especie como *Allium vineale* se usan ocasionalmente como condimentos.
- Existen algunas especies de *Allium* que crecen en jardines, con flores de olor agradable (*A. Odorum* y *A. Fragans*), pero son excepcionales, e incluso éstas tienen aroma a ajo en sus hojas y raíces.



Figura 1.- Allium sativum

1.3.- COMPOSICIÓN

A pesar de que existe abundante información sobre los componentes químicos del ajo y de su estructura, aún no hay una evidencia total de cuál/es de estos componentes es el responsable de las múltiples acciones farmacológicas del ajo (Jansen y cols., 1989; Ali y cols., 2000b). Los componentes principales son:

- **Fósforo, potasio, azufre y zinc:** Altos niveles.
- **Selenio y vitamina A y C:** Niveles moderados.
- **Calcio, magnesio, sodio, hierro, manganeso y complejo vitamínico B:** Bajos niveles.
- **Hormonas:** Actúan de forma similar a las hormonas sexuales masculinas y femeninas.
- **Otras sustancias:** Fermentos, colina, ácido hidrorodánico y yodo.
- Se han aislado hasta 17 **aminoácidos** entre ellos: Alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano y valina.
- Se han aislado 33 **compuestos azufrados**. Entre los compuestos azufrados más relevantes se encuentran los siguientes (Figura 2):

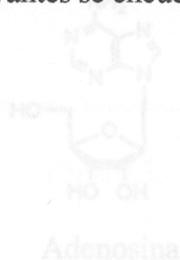


Figura 2.- Principales componentes azufrados del ajo. BIBLIOTECA

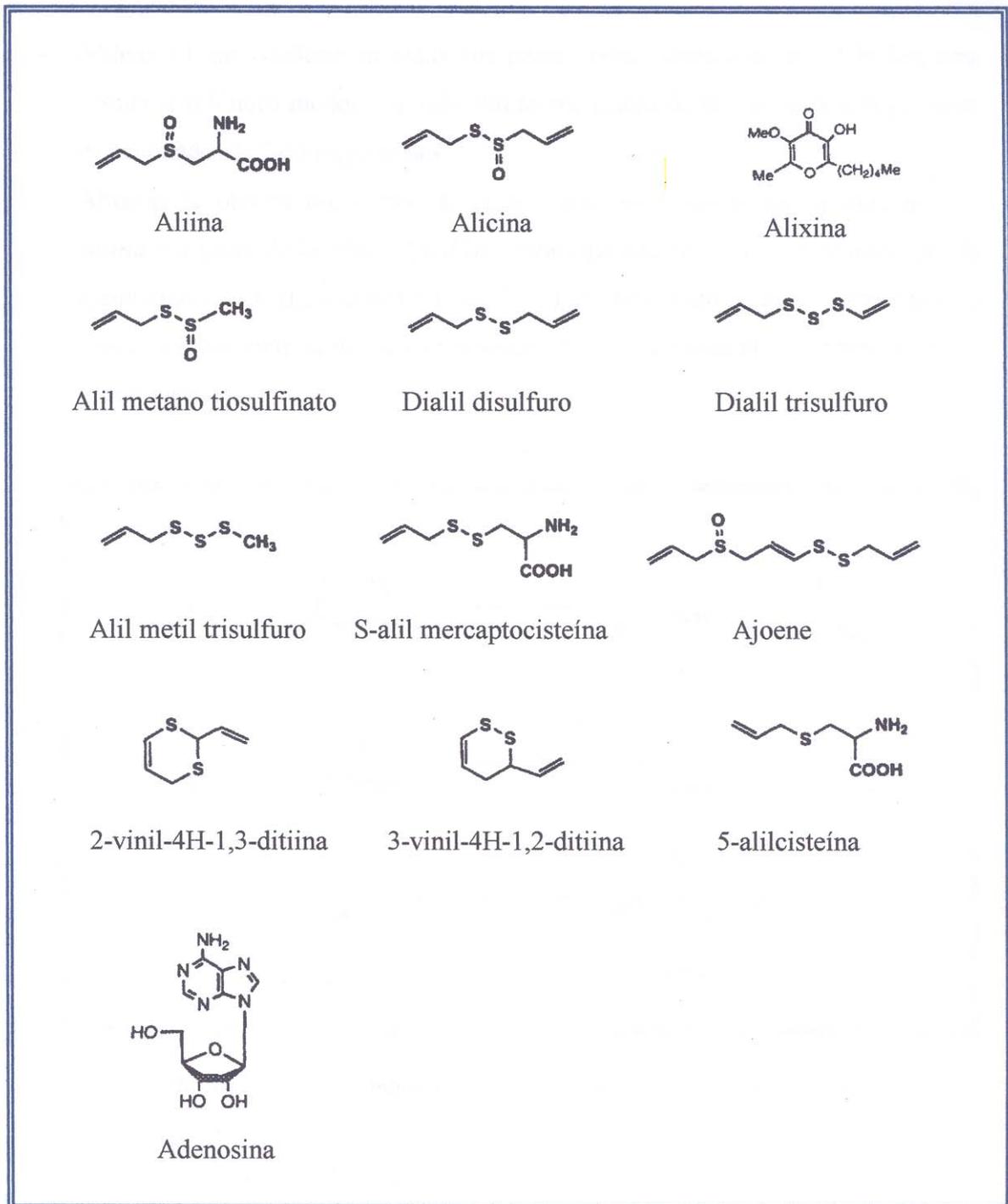


Figura 2.- Principales componentes azufrados del ajo.

- **Aliina:** El ajo contiene en todas sus partes, pero, sobre todo en el bulbo, una sustancia sulfurada inodora llamada *Aliina* precursora de la *Alicina*, y está presente en cantidades de 5-14 mg/g de ajo.
- **Alicina:** Se obtiene por acción de un fermento contenido en los propios ajos, la *Aliinasa* a partir de la *Aliina*. La *Aliina* está separada de la enzima *Aliinasa* por la membrana celular (Lancaster y Collin, 1981); cuando el ajo se trocea o machaca, la *Aliinasa* actúa sobre la *Aliina* y se produce *Alicina* que posee el característico olor a ajos (Figura 3):

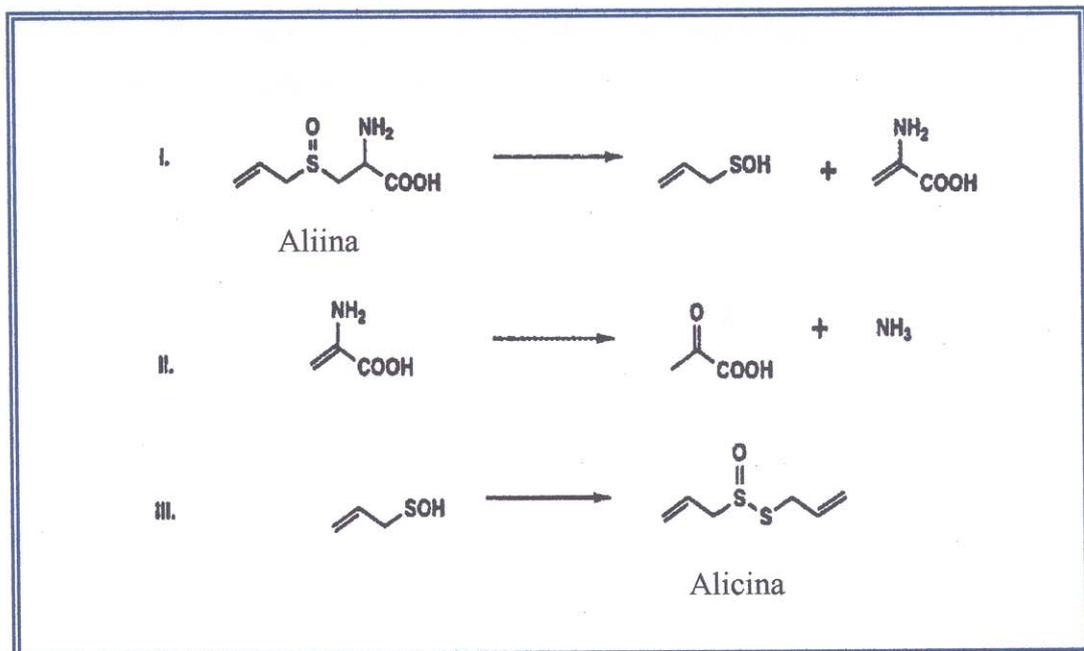


Figura 3.- Transformación de la Aliina en Alicina al trocear el ajo.

- **Ajoene:** Se forma a partir de la alicina (Block y cols., 1984), es una sustancia incolora e inodora
- **Adenosina:** Makheja y Bailey en 1990 demostraron que extractos acuosos de ajo contenían adenosina. Muchos tejidos sintetizan continuamente adenosina, incluyendo el endotelio vascular (Nees y Gerlach, 1983) y las plaquetas (Agarwal, 1991).

- **Inhibidores de la adenosin desaminasa:** Algunos estudios demuestran que el extracto de ajo tiene una actividad inhibidora de la adenosin desaminasa (Koch y cols., 1992). La presencia de inhibidores de la adenosin desaminasa en el ajo, podría explicar su acción antitrombótica y vasodilatadora.
- **Inhibidores del AMPc fosfodiesterasa:** Investigaciones realizadas por Agarwal en 1991, reflejan que el ajo contiene algún compuesto que inhibe la actividad del AMPc fosfodiesterasa, y que potencia la acción de la adenosina.

En general, aunque se detallará más adelante en el apartado I.4, podemos resumir en la siguiente tabla los efectos más significativos de los diferentes componentes del ajo (Tabla 1):

Ajoene		Dialil disulfuro
(-)-N-(1'-deoxi-1'-β-D-fructopiranosil)-S-alil-L-cisteinsulfóxido	cisteína	Alil mercaptano
Adenosina		Dialil sulfuro
		Ajoene
		Dimetil disulfuro
		Alisina
<i>Inhibidores específicos de enzimas:</i>		
inhibidor de Adenosin desaminasa		
inhibidor de AMPc fosfodiesterasa		

Tabla 1.- Efectos más significativos de los diferentes componentes del ajo

<i>Antitrombótico</i>	<i>Hipolipemiente</i>	<i>Anticancerígeno</i>
Aliina	Aliina	Aliina
Alicina	Alicina	Alicina
Dialil disulfuro	Dialil disulfuro	Dialil disulfuro
Dialilo trisulfuro	Dialil trisulfuro	Dialil trisulfuro
Metil alil trisulfuro	Alil propil disulfuro	Dimetil trisulfuro
1,5-Hexadienil trisulfuro	Sulfóxido de S-metil	Dipropil disulfuro
2-vinil-1,3-ditieno	cisteína	Alil mercaptano
3-vinil-1,2-ditieno	Ajoene	S-alil cisteína
S-alil-2-propeno tiosulfinato		Alil propil disulfuro
Alil-1,5-hexadienil trisulfuro		Dialil sulfuro
Ajoene		Ajoene
(-)-N-(1'-deoxi-1'-β-D-fructopiranosil)-S-alil-L-cisteinsulfóxido		Dimetil disulfuro
Adenosina		Alixina
<i>Inhibidores específicos de enzimas:</i>		
Inhibidor de Adenosin desaminasa		
Inhibidor de AMPc fosfodiesterasa		

Tabla 1.- Efectos más significativos de los diferentes componentes del ajo

I.4.- ACCIONES FARMACOLÓGICAS DEL AJO

Además de su utilización como condimento, el ajo (*Allium sativum*), es usado desde la antigüedad por sus propiedades nutritivas y farmacológicas (Abdullah y cols., 1988). Sus estudiados efectos beneficiosos incluyen entre otros efectos antioxidantes (Yamasaki y cols., 1994), antifúngicos (Ghannoum, 1990), propiedades antibacterianas (Nagai, 1973; Kumar y Berwal., 1998), supresión de tumores (Surh y cols., 1999), propiedades hipoglucémicas (Bordia y Bansal, 1973; Ahmed y Sharma, 1997) y prevención de enfermedades cardiovasculares.

Algunos datos experimentales y clínicos sugieren que una dieta rica en ajo produce un efecto antiaterogénico que es debido predominantemente a su acción sobre los factores de riesgo cardiovasculares: Ha sido demostrado que el ajo altera los lípidos sanguíneos (Bordia y cols., 1987; Lau y cols., 1987; Phelps y Harris, 1993; Ali y cols., 2000b) así como la oxidación de las LDL, disminuye la coagulación de la sangre (Legnani y cols., 1993; Rahman y Billington, 2000), produce hipotensión (Martin y cols., 1992; Al-Qattan y cols., 1999; Ali y cols., 2000b), e inhibe la proliferación celular (Lee y cols., 1994; Orekov y cols., 1995).

I.4.1.- EFECTO DEL AJO SOBRE LOS FACTORES DE RIESGO EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en Europa, Estados Unidos y Japón. La enfermedad coronaria cardíaca, la más común de las enfermedades cardiovasculares, es causada por la obstrucción de las arterias con depósitos grasos y coágulos sanguíneos. Uno de los factores de riesgo para el ataque cardíaco y el infarto cerebral son los altos niveles de colesterol y triglicéridos en sangre. Esto se confirma con el famoso estudio del corazón de Framingham que mostró que las personas con un nivel de colesterol por debajo de 150 mg/dl no sufrían ataques cardíacos (Castelli, 1984). De hecho, los porcentajes de muerte por

enfermedades cardiovasculares aumenta por encima de valores de colesterol de 168 mg/dl (Stamler y cols., 1986).

I.4.1.A.- Efecto sobre los lípidos sanguíneos

Existe una gran controversia sobre la existencia de propiedades beneficiosas del ajo sobre los niveles de colesterol. Mientras que muchos autores han demostrado los efectos antilipidémicos del ajo en estudios llevados a cabo en humanos (Arora y Arora, 1981; Bordia, 1981; Lau y cols., 1987; Zimmerman y Zimmerman, 1990; Jain y cols., 1993), así como en animales, incluyendo ratas (Augusti y Mathew., 1973; Chang y Johnson, 1980; Chi, 1982; Chi y cols., 1982; Ali y cols., 2000b), conejos (Bordia y cols., 1975; Bordia y Verma, 1980; Ismail y cols., 1999), pollos (Qureshi y cols., 1983 a y b) y cerdos (Qureshi y cols., 1987), otros son más escépticos a la hora de afirmar esto (Isaacsohn y cols., 1998; Byrne y cols., 1999). Estos resultados inconstantes reflejan variaciones en el diseño del protocolo de estudio, en las dosis utilizadas, el modelo y la preparación de ajo utilizada.

Como se mencionó anteriormente, el ajo contiene una gran variedad de componentes azufrados, además de aminoácidos, vitaminas y minerales (Block, 1985). Aunque algunos de estos componentes azufrados, como la alicina, el sulfóxido de S-metilcisteína y el sulfóxido de S-alilcisteína reducen los niveles de colesterol en el hígado y el plasma (Chi y cols., 1982), no se conocen con certeza el principio o los principios responsable/s de la acción hipolipidémica.

Bordia y cols. en 1975 y 1977, demostraron que el ajo (1g/Kg/día) disminuye el colesterol sérico y el fibrinógeno plasmático en sujetos normales alimentados con una dieta rica en colesterol (0.2g colesterol/Kg/día), mientras que en pacientes con enfermedad coronaria, el ajo aumenta la actividad fibrinolítica pero no tiene efectos sobre los niveles de colesterol. De cualquier forma, se ha observado una disminución de los niveles plasmáticos de LDL, VLDL, triglicéridos y un aumento de las HDL plasmáticas en pacientes hiperlipidémicos alimentados con un suplemento de ajo

(2g/Kg/día) (Bordia y Verma, 1978, 1980), con una disminución de la susceptibilidad a la oxidación de lipoproteínas (Phelps y Harris, 1993).

El ajo, disminuye el colesterol y los triglicéridos de la sangre, que contribuyen a la aterosclerosis (Lau y cols., 1983; Lau y cols., 1987, Mader, 1990). La incubación de cultivos primarios de hepatocitos de rata con un extracto modificado de ajo sin olor, inhibieron la cantidad de [¹⁴C] acetato y [³H] glicerol incorporada al colesterol, ácidos grasos y glicerol comparado con el grupo control, sugiriendo que el efecto hipocolesterolémico del extracto de ajo se debía a una disminución de la colesterogénesis hepática (Yeh y Yeh, 1994).

También se ha observado la supresión de la síntesis de colesterol al inhibir la HMG CoA reductasa, en conejos alimentados con ajo (Gebhardt, 1991), así como un aumento de la excreción intestinal de los productos finales de degradación de los lípidos (sales biliares) debido al ajo, observado en ratas (Chi y cols., 1982).

Lau y cols. (1987) estudiaron también un extracto modificado de ajo sin olor, demostrando que su administración producía en los pacientes hipercolesterolémicos un aumento inicial de los niveles séricos de colesterol y triglicéridos seguida de una disminución de los mismos a partir del tercer mes de tratamiento, aproximándose a niveles normales a partir del sexto mes. Esto también fue demostrado en animales de experimentación (Bordia y cols., 1987; Gebhardt, 1993). En contraste, un tratamiento a corto plazo (6 semanas), con una alta dosis de este extracto, no disminuía de forma significativa los niveles plasmáticos de colesterol. De este modo se concluyó que el periodo de tratamiento es un factor decisivo a la hora de reducir los niveles de colesterol. Esto fue explicado anteriormente por Bordia en 1981 al postular que el ajo “arranca” o moviliza los lípidos de los tejidos donde están depositados, para depositarlos en la circulación sanguínea, aumentando así inicialmente los niveles séricos lipídicos. Con el tratamiento continuado con ajo, éste exceso de lípidos es degradado y excretado por el tracto intestinal. Otros estudios en animales alimentados

con ajo han demostrado similares resultados (Kritchevsky y cols., 1980; Chi y cols., 1982).

Más recientemente, dos meta-análisis investigaron los efectos del ajo sobre el colesterol. Warshafsky y cols. en 1993 informaron de los resultados obtenidos en 5 ensayos en los que el ajo produjo una disminución del colesterol del 9% comparándolo con el placebo. También Silagy y Neil en 1994 (b), presentaron un informe de 16 ensayos en los que se produjo una reducción de un 12% en los niveles de colesterol al compararlo con el placebo. Sin embargo, también existen estudios con resultados negativos realizados en pacientes hipercolesterolémicos con tratamientos de 12 semanas (Isaacsohn y cols., 1998; Berthold y cols., 1998).

Hoy en día se sabe que las LDL o colesterol “malo” no es tan perjudicial si no está oxidado por radicales libres dentro de los vasos sanguíneos. La oxidación de las LDL es considerada el primer evento que ocurre en la aterosclerosis. Los radicales libres pueden ser activados por una gran variedad de factores: tabaco, contaminación ambiental, dietas ricas en grasa, ejercicio vigoroso..., de este modo, la forma de evitar los efectos perjudiciales del colesterol sería evitar en un primer término la oxidación de las LDL. Algunos estudios demuestran que el ajo hace precisamente esto (Lewin y Popov, 1994). La actividad captadora de radicales libres del ajo es bien conocida (Kourounakis y Rezza, 1991; Phelps y Harris, 1993), y por ello el ajo disminuiría la cantidad de LDL oxidadas circulantes y consecuentemente la cantidad de colesterol acumulado por los macrófagos y músculo liso en la pared vascular. Una vez más existen autores que defienden la inexistencia de este efecto (Byrne y cols., 1999).

Al igual que en el caso del colesterol total y los triglicéridos, el tratamiento con ajo produce un incremento inicial de los niveles séricos de LDL y VLDL seguido de una disminución significativa a partir del tercer mes de tratamiento (Lau y cols., 1987).

El colesterol “bueno” o HDL, es mucho más denso y pesado que el colesterol “malo” ó LDL, circula por la sangre y no es probable que se una a la pared vascular; de hecho, se adhiere a las LDL arrancándolas de la pared vascular y transportándolas al hígado donde se degradan y se excretan del cuerpo (Miller y Miller, 1975; Carew y cols., 1976).

El tratamiento con ajo produce un aumento progresivo de HDL (Chi y cols., 1982). Se ha observado que produce un aumento del cociente HDL/LDL (Bordia, 1981).

I.4.1.B.- Efecto sobre la coagulación sanguínea.

Las plaquetas son pequeñas células que circulan en la sangre de los mamíferos y juegan un papel importante en la homeostasis cardiovascular. En el proceso de coagulación las plaquetas se agregan para impedir la pérdida de sangre en caso de lesión; el fibrinógeno de la sangre “trabaja” junto al agregado plaquetario a través de un complicado proceso para impedir el desangrado y favorecer la reconstitución del vaso dañado. Un tercer componente, la plasmina (fibrinolisisina), disuelve los coágulos de fibrina formados cuando su función ya no es necesaria.

Las investigaciones existentes sobre el proceso de coagulación, muestran que aquellas personas propensas a un ataque cardíaco o cerebral tienen una cantidad de fibrinógeno demasiado elevada, y sin embargo, una cantidad disminuida de fibrinolisisina.

Lau en 1989 demostró que el ajo:

- Previene la formación de coágulos.
- Inhibe la agregación plaquetaria.

Un estudio epidemiológico en Jain, una comunidad india, mostró el efecto beneficioso del ajo en la salud del sistema cardiovascular (Sainani y cols., 1976,

1979a, 1979b). Aquellos que toman ajo como parte de su dieta, tienen menos colesterol, triglicéridos y fibrinógeno, así como un tiempo de coagulación mayor y una mayor facilidad para degradar los coágulos en comparación con aquellos que no comen ajo.

Otros estudios han demostrado la capacidad antiagregante plaquetaria del ajo (Bordia, 1978; Vanderhoek y cols., 1980; Apitz-Castro y cols., 1983; Ali y cols., 1999; Rahman y Billington, 2000). Si bien algunos estudios (Vanderhoek y cols., 1980) indican que este efecto es debido a una inhibición de la agregación inducida por el adenosin difosfato (ADP), así como a una inhibición del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa y de la lipooxigenasa, otros estudios sugieren que la actividad de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa no se ve afectada: Así, Schmunk y Lefer en 1982 y Coffier y cols. en 1983, demostraron que la movilización de calcio es un paso temprano en la secuencia de eventos que producen la agregación plaquetaria. Mayeux y cols. en 1988, estudiaron los efectos de la alicina pura sobre la coagulación. Sus datos revelaron su efecto inhibitorio sobre la movilización de calcio en tejido vascular independiente de AMPc. Encontraron también que la alicina inhibía la agregación plaquetaria por un mecanismo independiente de la formación de productos de la ciclooxigenasa incluyendo el TXA₂. Más aún, sus datos demostraban que la alicina no alteraba el metabolismo del ácido araquidónico y PGH₂, sugiriendo que la alicina no tiene efecto sobre la ciclooxigenasa o las enzimas terminales necesarias para metabolizar PGH₂ a PGI₂ y TXA₂.

Otros autores explican que estas propiedades antiagregantes podrían ser debidas a la capacidad de un componente del ajo, el ajoene de alterar las plaquetas mediante su inserción entre las dos monocapas de su membrana plasmática (Jain y Apitz-Castro, 1987). Algunos datos experimentales sugieren que la inhibición de la actividad de la AMPc-fosfodiesterasa es la responsable de esta inhibición de la agregación plaquetaria, ya que al inhibir esta enzima, el ajo potencia la acción

antiagregante de otros inhibidores plaquetarios endógenos como la adenosina, PGD₂, y la prostaciclina (Agarwal, 1996).

Un estudio de 3-6 meses llevado a cabo en 1998 por Steiner y Lin en hombres hipercolesterolémicos a los que trató con un extracto envejecido de ajo, demostró que el estudio de la función plaquetaria depende del ensayo usado, así, mientras se producía una disminución significativa de la agregación plaquetaria inducida por epinefrina y en menor grado por colágeno, la agregación inducida por ADP no se veía afectada.

Como se puede observar, los efectos del ajo sobre la función plaquetaria y su papel en la iniciación de eventos tromboembólicos, podrían tener cierta importancia clínica. Sin embargo, los mecanismos por los que actúa el ajo en este aspecto, son aún confusos, y quizá deberían llevarse a cabo más estudios clínicos, posiblemente comparando los efectos del ajo con otros inhibidores de la agregación plaquetaria de efectos conocidos, como puede ser la aspirina.

I.4.1.C.- Efecto sobre la presión arterial.

La hipertensión o la presión arterial elevada, es uno de los mayores factores de riesgo de aterosclerosis. Muy pocos fármacos antihipertensivos carecen de efectos secundarios.

De acuerdo con una publicación de Bolton y cols. en 1982, el ajo ha sido usado para el tratamiento de la hipertensión en China y Japón durante siglos y es reconocido oficialmente con este propósito por la Administración para la Alimentación y los Medicamentos japonesa.

Se ha demostrado un efecto preventivo del aumento de la presión arterial en modelos animales. Ya en 1921 se informó de los efectos beneficiosos del ajo en el control de la hipertensión en humanos (Loeper y Debray, 1921). En 1948 Piotrowski dió a 100 pacientes hipertensos altas dosis iniciales de ajo, luego disminuyó la dosis

gradualmente según progresaba el experimento. Tras sólo una semana de tratamiento, en 40 de ellos se produjo una disminución de la presión arterial de 20 mm Hg ó más. Varios estudios más a pequeña escala han demostrado similares efectos positivos del ajo sobre la hipertensión (Srinivasan, 1969; Barrie y cols., 1987; McMahon y Vargas, 1993).

Un estudio en China implicando a 70 pacientes hipertensos a los que se les daba 50 gramos de ajo crudo al día demostró un éxito del 61.7%: en 33 pacientes la presión arterial disminuyó considerablemente, y en 14 de ellos la disminución fue moderada (Zheziang Institute of Traditional Chinese Medicine, 1986).

En un intento más por demostrar los efectos beneficiosos del ajo se desarrollaron estudios en Bulgaria implicando tanto a animales como humanos: se administraron inyecciones intravenosas de ajo fresco a gatos; a dosis altas éstos experimentaron sólo una pequeña y temporal disminución de la presión arterial, pero cuando el ajo había sido preparado y almacenado durante 7-12 meses, la presión sanguínea disminuía significativamente. Se postuló que el almacenamiento permitía a algunas enzimas liberar los componentes activos del ajo. Después probaron distintos extractos derivados de la hoja del ajo en 21 pacientes hipertensos. Los sujetos experimentaron una disminución de la presión sistólica de 20-30 mm Hg y de 10-20 mm Hg en la diastólica (Petkov, 1949, 1950, 1953, 1962, 1979; Petkov y cols., 1965). Así mismo, un estudio realizado en perros y ratas, obtuvo al usar una inyección intravenosa de ajo, resultados de hipotensión y bradicardia similares a la acetilcolina (o sustancias similares), pero este efecto no era inhibido por la atropina (antagonista muscarínico), sin embargo, desplazaba la curva del isoproterenol a la derecha por lo que podría atribuirse al ajo un efecto beta-antagonista; también observaron inotropismo negativo y cronotropismo negativo (Martin y cols., 1992). Sendl y cols., en 1992 revelaron la capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) del ajo salvaje (*Allium ursinum*) y de *Allium sativum*.

Más recientemente Isaacsohn y cols. en 1998, observaron en un estudio doble ciego, randomizado, y multicéntrico, que el ajo (900 mg/día), al administrarse durante 12 semanas a pacientes hipercolesterolémicos, producía una disminución de la presión sanguínea que era independiente de la modificación de las lipoproteínas plasmáticas. Los resultados de otros estudios realizados en animales coinciden al describir los efectos antihipertensivos del ajo (Fallon y cols., 1998; Al-Qattan y cols., 1999; Ali y cols., 2000b).

En contraste, también existen estudios que no revelaron estas propiedades antihipertensivas al estudiar ajo en pacientes sanos o hipercolesterolémicos (Simons y cols., 1995; McCrindle y cols., 1998). Una revisión publicada por Silagy y Neil. en 1994 (a), concluye que el ajo podría tener algún uso clínico en sujetos con hipertensión moderada. Los autores, sin embargo, advierten que deberían llevarse a cabo más estudios doble ciego y a gran escala.

I.4.1.D.- Efecto sobre la placa de ateroma.

Estudios llevados a cabo en conejos con un extracto modificado sin olor, demostraron su efecto antiaterogénico, tanto por el efecto reductor del tamaño, como por los cambios producidos en la apariencia histológica de la placa fibrosa grasa en la arteria carótida derecha. De igual modo, se observó una disminución de la formación de las estrías grasas y de la acumulación del colesterol en la aorta torácica. Estos efectos se observaron independientemente de cualquier cambio en los niveles de colesterol total (Efendy y cols., 1997). Asimismo, ese extracto, redujo la cantidad de LDL oxidada circulante, y consecuentemente, la cantidad de colesterol acumulada en los macrófagos y en el músculo liso de la pared vascular. También fue observado que el contenido de colesterol en la aorta de animales hiperlipidémicos se reducía significativamente con el extracto de ajo mientras que el contenido de colesterol plasmático permanecía elevado.

Otros autores al estudiar un modelo de ratas ateroscleróticas, observaron una disminución del grosor de la neointima al administrarlas una dieta rica en ajo, así como una reducción del contenido de colágeno tipo I y IV (Heinle y Betz, 1994).

Orekov y Tertov en 1997, realizaron estudios *in vitro* de células aórticas aisladas de placas ateroscleróticas y sugirieron que el ajo inhibía la captación de LDL modificadas y producía una reducción de la acumulación intracelular de ésteres de colesterol. Explicaron estos efectos por una inhibición de la Acil CoA. También en el mismo año (1997) Ide y Lau demostraron que el ajo podía proteger a las células endoteliales del daño producido por las LDL oxidadas.

En un estudio clínico realizado en 152 pacientes, randomizado y doble ciego, en el que se les hizo consumir polvo de ajo durante un periodo de 48 meses, se observó una reducción de las placas ateroscleróticas de un 5-18% (Koscielny y cols., 1999).

I.4.1.E.- Efecto sobre la contractilidad vascular.

Como se menciona anteriormente, diversos investigadores han demostrado que el ajo es un potente vasodilatador (Siegel y cols., 1991; Agel y cols., 1991), y que esta acción podría deberse a una activación de la enzima NO sintasa.

Sin embargo, otros investigadores han demostrado un mecanismo dual del ajo. Fallon y cols. en 1998, demostró que el extracto acuoso de ajo usado en su estudio, causaba una relajación dosis-dependiente en arteria pulmonar, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de la enzima óxido nítrico sintasa, y en arterias con o sin endotelio, si bien, en presencia de L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintasa) o en arterias sin endotelio, la relajación obtenida era menor. Lo que demostraba que el principal efecto del ajo sobre el músculo liso vascular estaba mediado por la producción de óxido nítrico en las células endoteliales, pero que sin embargo, existía también un efecto directo sobre las células del músculo liso

vascular. Este descubrimiento, coincide con estudios que demuestran que el ajo puede producir vasodilatación vía hiperpolarización de la membrana de las células musculares lisas y/o inhibición de la apertura de los canales de calcio (Siegel y cols., 1992).

I.4.1.F.- Efecto sobre la diabetes.

La diabetes es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la aterosclerosis; en 1958, investigadores indios encontraron que los niveles de azúcar en sangre disminuían en pacientes que tomaban ajo (Jain y cols., 1973). Casi tres décadas más tarde investigadores del “Royal Medical college” de la India indujeron diabetes a conejos mediante inyecciones intravenosas de aloxan. Cuando a estos animales se les alimentaba con ajo, su elevada glucosa en sangre disminuía casi tanto como cuando eran tratados con fármacos antidiabéticos. Se postuló que el ajo aumentaba el efecto de la insulina (Bordia y Bansal, 1973; Jain y Vyas, 1975), por dos posibles mecanismos: Por un aumento de la secreción pancreática de insulina o de la liberación de insulina controlada desde un depósito. Más recientemente se demostró que los aminoácidos con grupos sulfuro del ajo son los que controlan la diabetes en ratas tan efectivamente como los antidiabéticos orales y la insulina. Mientras que los fármacos antidiabéticos y la insulina aumentan el colesterol hepático, el ajo no (Sheela y cols., 1995).

Otros estudios hablan de la posibilidad de administrar ajo para mejorar las complicaciones cardiovasculares que acompañan a la diabetes (Patumraj y cols., 2000)

En resumen, y a pesar de la controversia suscitada por este compuesto natural, se han propuesto los siguientes mecanismos por los que el ajo influiría sobre el sistema cardiovascular, (Tabla 2):

<i>El ajo aumenta</i>	<i>El ajo disminuye</i>
HDL	Colesterol
Actividad fibrinolítica	Triglicéridos
Tiempo de coagulación	LDL/VLDL
Disponibilidad de insulina	Fibrinógeno plasmático
Oxido nítrico	Agregación plaquetaria
	Elevada presión arterial
	Lesiones ateromatosas

Tabla 2.- Efectos del ajo sobre los factores de riesgo cardiovascular

1.4.2.- EFECTOS DEL AJO SOBRE LA FUNCIÓN HEPÁTICA.

El hígado, es normalmente el encargado de la detoxificación del organismo. Además de regular la glucemia y de metabolizar los lípidos y las proteínas, el hígado detoxifica al organismo del alcohol, fármacos y otros productos químicos que penetran en nuestro interior. Cuando las células hepáticas se degradan, el hígado pierde su función.

El ajo protege al hígado del posible daño celular hepático:

Estudios publicados por la compañía farmacéutica Wakunaga de Japón, revelaron que cuatro de los seis componentes azufrados aislados del ajo protegían los hepatocitos del daño causado por tetracloruro de carbono (CCL₄). El estudio fue llevado a cabo en cultivo celular (Nakagawa y cols., 1985).

Esto fue confirmado por Hikino y cols. en 1986, encontraron que un aceite volátil de ajo y dos aminoácidos azufrados, S-alilmercapto cisteína y S-

metilmercaptocisteína extraídos del ajo, prevenían el daño celular hepático producido por dos potentes toxinas hepáticas, CCl₄ y D-galactosamina. El estudio indicaba que ejercían este efecto protector inhibiendo la generación de radicales libres, previniendo la oxidación de peróxidos lipídicos, y de este modo actuando como un potente antioxidante.

Un tercer estudio llevado a cabo por Kagawa y cols. en 1986, se centró sobre el efecto terapéutico del ajo en el daño celular hepático. A las seis horas de administrar CCl₄ a ratones, se les dio ajo vía oral. El CCl₄ daña las células hepáticas dando lugar al “hígado graso”. La administración de ajo incluso a las seis horas de producirse el daño hepático producía una inhibición significativa de la formación del “hígado graso”.

1.4.3.- EFECTOS DEL AJO SOBRE EL CÁNCER.

Los compuestos organosulfuros derivados del ajo han demostrado una importante capacidad inhibitoria de los tumores inducidos en animales de laboratorio (Hussain y cols., 1990; Hong y cols., 1992; Dirsch y cols., 1998; Surh y cols., 1999).

Además, estudios epidemiológicos, han sugerido que los individuos que consumen ajo de manera regular tienen una menor incidencia de cáncer (You y cols., 1989; Buiatti y cols., 1989; You y cols., 1998).

La glutatión-S-transferasa (GST) es una enzima importante detoxificante, que elimina los electrófilos dañinos al conjugarlos con el glutatión (Jakoby, 1978). Por tanto, la GST es una enzima que podría jugar un papel muy importante detoxificante en el metabolismo de la carcinogénesis de naturaleza electrófila. Así, cualquier sustancia que incremente los niveles de GST podría tener un efecto protector o preventivo ante la aparición del cáncer. Han sido numerosos los estudios sobre el ajo y su relación con los niveles de GST. Saprnins y cols. estudiaron el efecto de la administración oral de alil metil trisulfuro (un componente del ajo), sobre los niveles

de GST en el hígado, estómago, intestino delgado y pulmón de ratones. Al cabo de 96 horas, la actividad de la GST había aumentado considerablemente, además la inducción de tumores estomacales debida a benzo(a)pireno había disminuído. También estudiaron otros tres compuestos: Alil metil disulfuro, dialil trisulfuro y dialil disulfuro que también estimularon la GST en todos los órganos (Sparnins y cols., 1986, 1988). Esto coincide con estudios realizados por Manson y cols. en 1997. También se ha sugerido la implicación de otras enzimas detoxificantes: NADPH quinona oxidoreductasa y N-acetiltransferasa en la acción protectora del ajo (Singh y cols., 1998; Chung y cols., 1998).

I.4.3.A.- Efecto sobre el cáncer de estómago

Un estudio epidemiológico llevado a cabo en China (Mei y cols., 1982), demostró que el ajo protegía frente a la formación de nitritos -un precursor de carcinogénesis- en los jugos gástricos, y de este modo daba protección frente al desarrollo de cáncer de estómago. Esto fue también comprobado por Shenoy y Choughuley en 1992. Así mismo, la actividad antibacteriana de la alicina podría prevenir la conversión de nitratos a nitritos en el estómago, y así limitar la formación de nitrosaminas potencialmente carcinógenas (Steinmetz y cols., 1994).

You y cols. en 1989, encontraron que el consumo de ajo era inversamente proporcional al riesgo de desarrollar cáncer de estómago. Casi diez años más tarde, en 1998, encontraron que el consumo de ajo reducía la incidencia de lesiones gástricas precancerosas.

El efecto del ajo y del dialiltrisulfuro(un componente del ajo) en el crecimiento de dos tipos de cánceres de estómago fue estudiado por Pan en 1985 en cultivo celular, encontrando que el ajo y su componente inhiben el crecimiento de células cancerosas tan efectivamente como algunos fármacos quimioterápicos.

Investigadores de la Universidad de Minesota estudiaron a ratones con cáncer de estómago inducido por benzopireno. La administración de alil metil trisulfóxido, un componente del aceite de ajo, redujo un 70% de los tumores durante el experimento (Sparnins y cols., 1986). De acuerdo con estos investigadores, un componente del ajo estimula un enzima que protege el estómago de los efectos del carcinógeno.

Entre los componentes del ajo responsables de la actividad antitumoral, el dialil sulfóxido ha sido repetidamente el más activo frente a la inducción de tumores en animales de experimentación (Belman, 1983; Schaffer y cols., 1996). Probablemente este efecto se deba a la modulación de este compuesto de enzimas antioxidantes.

I.4.3.B.- Efecto sobre el cáncer de hígado

La aflatoxina, producida por el moho *Aspergillus*, que contamina los cacahuetes, el arroz, los granos de cereales, el maíz y las judías, está ligada con el cáncer de hígado y posiblemente con otros tipos de cáncer. La aflatoxina es un procarcinógeno que se convierte en carcinógeno sólo cuando es metabolizado u oxidado en su forma epóxido en nuestro organismo, y es en ésta forma cuando se une al DNA o RNA o moléculas proteicas de las células provocando una mutación y la formación de cáncer. Hoy se sabe que nuestro organismo tiene varias formas de prevenir el progreso de este proceso:

1. Inhibe la oxidación de la aflatoxina a su forma epóxido.
2. Si el epóxido se forma, inhibe su unión al DNA.
3. Transforma el epóxido en un componente soluble y lo elimina.

El ajo puede prevenir la formación de cáncer de hígado al intervenir en estos tres pasos, inhibe el metabolismo de la aflatoxina, su unión al DNA y aumenta los

metabolitos solubles para su posterior eliminación (Tadi y cols., 1990; Tadi y cols., 1991).

I.4.3.C.- Efecto sobre el cáncer de vejiga

Algunos trabajos publicados muestran que el tratamiento con un extracto líquido de ajo administrado directamente en la vejiga, producía una menor incidencia de cáncer (Lau y cols., 1986; Marsh y cols., 1987). El ajo actúa estimulando el sistema inmune, más concretamente aumentando los macrófagos y linfocitos que destruyen las células cancerosas. Los mejores resultados se producían cuando el ajo era aplicado directamente en el lugar del tumor.

I.4.3.D.- Efecto sobre el cáncer de colon y rectal

Hu y cols. en 1991 demostraron que los vegetales verdes y el ajo tienen un potente efecto protector contra el cáncer de colon y rectal. Otro estudio epidemiológico llevado a cabo en mujeres mostró que aquellas que incluían ajo en sus dietas tenían menos riesgo de desarrollar cáncer de colon (Steinmetz y cols., 1994). Marchand y cols. y Levi y cols. en 1997 y 1999 respectivamente, observaron que el ajo estaba relacionado inversamente con el riesgo a padecer cáncer colorectal.

También ha sido demostrado que los sulfatos orgánicos, incluyendo el dialil sulfato(ito), inhiben el desarrollo de la carcinogénesis inducida por la dimetil hidracina en el cáncer de colon (Wargovich y Goldber, 1985; Wargovich, 1987).

I.4.3.E.- Efecto sobre el cáncer de pulmón

Steinmetz y cols. en 1993 investigaron la relación de algunas frutas y vegetales (incluido el ajo) con el desarrollo del cáncer de pulmón. El estudio reveló un efecto protector tanto en ex fumadores como en no fumadores, pero no en

fumadores. Otros estudios también confirmaron una falta de efecto protector del ajo en fumadores (Swanson y cols., 1992; Dorant y cols., 1994).

I.4.3.F.- Efecto sobre el cáncer de laringe

Zheng y cols. en 1992 observaron que el riesgo de padecer cáncer de laringe disminuía al asociar vegetales verdes o amarillos con ajo.

I.4.3.G.- Efecto sobre el cáncer de piel

Belman en 1983, mostró que la aplicación tópica de aceite de ajo previene el cáncer de piel inducido por dimetil benzantraceno. También en 1998 Singh y Shukla estudiaron un modelo de ratón con carcinogénesis en la piel, observando que el dialil sulfuro presente en el ajo podía retrasar el comienzo de la carcinogenesis así como reducir el número de tumores en cada ratón.

I.4.3.H.- Efectos sobre otros tipos de cáncer

Otros estudios en animales han demostrado que algunos componentes del ajo detienen el crecimiento del cáncer de pecho, esófago, útero y próstata (Hussain y cols., 1990; Liu y cols., 1992; Ip y cols., 1992; Wargovich y cols., 1992; Key y cols., 1997; Challier y cols., 1998).

En resumen, hace casi cuarenta años que las propiedades anticancerosas del ajo eran ya conocidas por algunos investigadores que concluían que el extracto de ajo prevenía el crecimiento tumoral al inactivar los componentes sulfidrilos de las células tumorales (Weisberger y Pensky, 1957; Weisberger y Pensky, 1958). Estudios más recientes como los mencionados anteriormente, hablan del posible doble papel del ajo, interfiriendo con el metabolismo de la célula cancerosa por una parte, y estimulando la función inmune por otra. Estos estudios muestran que el ajo

podría prevenir varios tipos de cáncer inducidos, así como detener el crecimiento de células tumorales; en otras palabras, el ajo podría ser prometedor tanto para la prevención como el tratamiento del cáncer.

I.4.4.- EFECTOS SOBRE LA FUNCIÓN INMUNE.

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos y macrófagos son atraídos al lugar donde el ajo era inyectado. Otros investigadores también han observado que el ajo atrae las células inmunes (Fujiwara y Nakata, 1967; Nakata y Fujiwara, 1975; Aboul-Enein, 1986).

I.4.4.A.- Ajo y macrófagos

Los macrófagos llevan a cabo su función antimicrobiana y antitumoral al ingerir las sustancias extrañas y destruirlas mediante intermediarios activos de oxígeno. Lau y cols. en 1991 compararon cuatro extractos diferentes de ajo y se encontró que dos de ellos aumentaban significativamente este proceso.

I.4.4.B.- Ajo y linfocitos T

La luz ultravioleta (UV) es marcadamente carcinógena además de producir una acumulación de linfocitos T supresores en el lugar de la irradiación. Estas células suprimen la respuesta inmune que normalmente controlaría el crecimiento de tumores (Fisher y Kripke, 1977; Fisher y Kripke, 1982). También produce un enrojecimiento y un engrosamiento de la piel.

Sin embargo, un tratamiento con ajo disminuye este engrosamiento y protege contra el daño por la luz UV. Los ratones expuestos a luz UV no exhiben una hipersensibilidad, debido a una supresión inmune (ya que la luz UV recluta linfocitos T supresores). Una dieta con ajo restaura la hipersensibilidad lo que demuestra que se produce un aumento de la función de los linfocitos T (Reeve y cols., 1993).

También se ha observado un aumento de interleukina-2, una citoquina sintetizada por los linfocitos T-helper (Morioka y cols., 1993).

I.4.4.C.- Ajo y células asesinas (killer)

Un estudio llevado a cabo en humanos, demostró que el tratamiento con ajo durante un periodo de tres semanas tras las cuales se usaba la sangre de los voluntarios sobre células tumorales, producía un incremento considerable de muerte entre las células cancerosas (Kandil y cols., 1987; Abdullah y cols., 1988).

También se han realizado estudios sobre pacientes con SIDA observándose que un tratamiento de 12 semanas con ajo producía un aumento de la actividad de las células asesinas y del cociente helper(colaboradoras)-supresoras, ambos signos de una mejora de la actividad inmune (Abdullah y cols., 1989).

I.4.5.- EFECTOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Estudios in vitro realizados por Efendy y cols. en 1997 mostraron que el ajo inhibe directamente la proliferación de células del músculo liso. Esto concuerda con los experimentos llevados a cabo por Orekhov y cols. en 1995 con un extracto acuoso de ajo sobre cultivos de células musculares lisas de placas ateroscleróticas, en los que observó una inhibición de la proliferación celular. Al inhibir el ajo la agregación plaquetaria (Aplitz-Castro y cols., 1992; Lawson y cols., 1992), prevendría la liberación de factores de crecimiento (ej. PDGF), y las sustancias quimiotácticas de las plaquetas (Ross y cols., 1974; Asada y cols., 1992), y esto produciría una disminución de la respuesta hiperplásica de las células musculares lisas secundaria al daño vascular.

Análisis de cinética celular mediante citometría de flujo, llevados a cabo en células tumorales desvelaron que el ajo prevenía la progresión de las células de la

fase G₁ a la fase S, y que por tanto se producía una acumulación de las células en la fase G₁ (Xie y cols., 1992). Sin embargo también existen estudios más recientes que proponen la habilidad de los alil sulfuros de bloquear las células en la fase G₂/M (Knowles y Milner, 2000).

También Lee y cols. en 1994 observaron el efecto inhibitorio de dos compuestos del ajo, S-alilcisteína (SAC) y S-alilmercaptocisteína (SAMC), y concluyeron que SAMC inhibía la proliferación de células musculares lisas y endoteliales., y que a su vez afectaba profundamente la fosforilación de varias proteínas del musculo liso incluyendo cambios en las fosfotirosinas. La proteína p34^{cdc2} que forma un complejo con la ciclina B, es una protein-kinasa importante en la activación de la mitosis, pero si esta proteína se fosforila, se inactiva el complejo y para las células en fase G₁ (Parker y Piwnica-Worms, 1992). Este aumento de la fosforilación se ha observado con SAMC, y esto podría explicar la reducción de la proliferación celular producida por este compuesto.

1.4.6.- EFECTOS SOBRE LOS RADICALES LIBRES.

En la pasada década se ha empezado a reconocer que muchas enfermedades agudas y crónicas en el hombre son el resultado de un exceso de radicales libres producidos por nuestro organismo. Entre estas enfermedades se encuentran la aterosclerosis, alergias, alteraciones de la presión arterial, cáncer, SIDA, enfermedades inflamatorias, enfermedades crónicas degenerativas y envejecimiento (Reddy y cols., 1991; Halliwell, 1993; Martin y cols., 1993; Gross y cols., 1994; Halliwell, 1995; Hollan, 1995). En el caso del SIDA se ha indicado que los radicales libres hacen a los linfocitos T susceptibles al daño producido por el virus VIH. Se ha sugerido incluso que si el sistema antioxidante en estas células es eficiente, el virus no podría hacer mucho daño (Sappey y cols., 1994; Buhl, 1994; Geng y cols., 1997). La elevada presión arterial también podría ser causa de una acumulación de radicales libres que dañarían la pared vascular (Sagar y cols., 1992; De Bruyn y cols., 1994).

Los radicales libres o radicales oxígeno son moléculas altamente reactivas e inestables. Tienen oxígeno como parte de su estructura con un electrón extra desapareado. Este electrón hace que éste radical tienda a unirse ávidamente con las moléculas biológicas de nuestro organismo tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Una vez unidos, oxidan y dañan estas moléculas. Ejemplos de radicales libres de oxígeno son el radical superóxido O_2^- , el peróxido de hidrógeno H_2O_2 y el radical hidroxilo $OH\cdot$.

En condiciones normales, nuestro organismo toma oxígeno y alimentos del exterior con el fin de producir energía en forma de adenosin trifosfato (ATP). Durante este proceso, se producen cantidades normales de radicales libres. Nuestro cuerpo está dotado de un eficiente sistema antioxidante que elimina el exceso de radicales libres o los convierte en sustancias inofensivas como oxígeno o agua que son reciclados por el organismo. Vitaminas como el β -caroteno, vitamina C y vitamina E son excelentes *scavengers* (barredores) de radicales libres, inactivándolos o eliminándolos. Enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasas, glutathion peroxidasa, glutathion reductasa y metionina reductasa pueden convertir los radicales libres en en productos inofensivos.

Sin embargo, pequeñas cantidades de radicales libres son beneficiosas para el organismo. Para luchar contra bacterias, virus y células cancerosas, nuestro sistema inmune (neutrófilos y macrófagos) usan los radicales libres como “munición”. Sólo cuando están en cantidades excesivas, dan problemas.

El incremento de radicales libres se produce principalmente por cuatro tipos de estrés:

- Estrés físico: traumas o heridas.
- Estrés químico: por productos químicos a los que estamos expuestos: metales pesados como el plomo o el mercurio, pesticidas, radioactividad, fármacos, alcohol, cafeína, tabaco...

- Estrés psicosocial: debido a las relaciones interpersonales.
- Estrés microbiano: por infecciones.

Para evitar el daño producido por estos radicales libres, habría que o bien reducir el estrés generador de los mismos, o bien aumentar la cantidad de sustancias antioxidantes del organismo.

Hay al menos cuatro tipos de antioxidantes:

1. Enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutathion peroxidasa y metionina reductasa. Estas enzimas convierten los radicales libres de oxígeno en productos inocuos.
2. Vitaminas: A, C y E. Sirven de barredores de radicales libres.
3. Minerales: Selenio, Zinc. Se necesitan como coenzimas para aumentar la actividad de enzimas antioxidantes.
4. Fitoquímicos: Antioxidantes procedentes de plantas. Actúan aumentando y maximizando nuestros mecanismos antioxidantes (Lau, 1995).

Respecto al selenio, el ajo tiene una gran cantidad de este mineral que puede ser utilizado por nuestro organismo.

I.4.6.A.- Ajo como antioxidante

En estudios in vitro, ha sido demostrada la capacidad del ajo para proteger las células endoteliales de los vasos sanguíneos del daño producido por la oxidación por peróxido de hidrógeno (Yamasaki y cols., 1994). Como se mencionó anteriormente, el ajo previene la oxidación de los lípidos.

El glutathion (GSH), es un importante compuesto antioxidante de nuestro organismo, y forma parte del ciclo redox ayudando al enzima GSH peroxidasa a convertir los radicales libres como los peróxidos, en sustancias inofensivas como el agua. Este proceso se puede resumir de la siguiente forma (Figura 4):

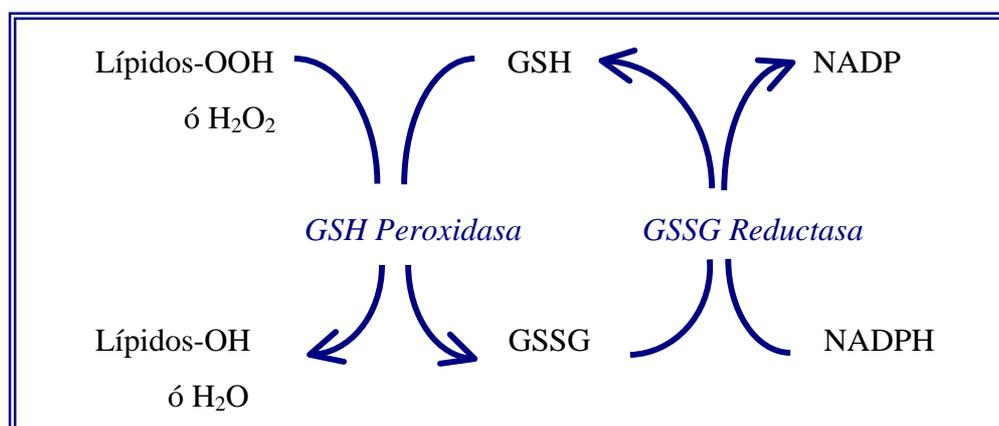


Figura 4.- Transformación de los peróxidos lipídicos en agua. GSH: Glutation, GSSG: Forma oxidada del glutation. NADP: nicotín adenin dinucleótido fosfato; NADPH: nicotín adenin dinucleótido fosfato reducido.

Un estudio llevado a cabo por Geng y Lau en 1997 indica que el ajo puede aumentar los niveles de GSH en las células y al mismo tiempo disminuye los niveles de la forma oxidada del glutation (GSSG), se cree que debido a un aumento de la actividad de la GSSG reductasa. Además el ajo también aumenta la actividad de otro enzima antioxidante llamada superóxido dismutasa (SOD) en las células. Otros investigadores han estudiado el efecto antioxidante del ajo demostrando que protege la membrana celular de los hepatocitos de la peroxidación lipídica (Horie y cols., 1989). Identificaron 5 compuestos azufrados en el extracto de ajo con potente actividad antioxidante (Horie y cols., 1992). Estudios posteriores demostraron que los componentes del ajo actúan como “barredores” capaces de deshacerse de los radicales libres (Imai y cols., 1994).

Phelps y Harris en 1993 también demostraron este efecto barredor de radicales de oxígeno y antioxidante, en un estudio doble ciego de 2 semanas en el que administraba diariamente 600 mg de ajo a los pacientes. También dos estudios

de Ide y Lau en 1997 concluyeron que el ajo prevenía los daños producidos por las LDL oxidadas, como el daño en las membranas y la pérdida de viabilidad celular en células del endotelio vascular. Sin embargo, Simons y cols. en un estudio doble ciego y randomizado de 12 semanas, no encontraron ningún efecto del ajo sobre la oxidación de las LDL

I.4.6.B.- Efectos del ajo sobre el envejecimiento

Los radicales libres, especialmente los radicales de oxígeno, están implicados en una gran variedad de procesos biológicos, entre ellos el envejecimiento (Harman, 1956; Harman, 1981). Mientras que no ha sido concluyentemente determinado si los radicales libres son una causa o un efecto del envejecimiento, está claro que algunos daños característicos producidos por los radicales libres aumentan con la edad. De acuerdo con la teoría del envejecimiento por radicales libres, el sistema de defensa antioxidante está debilitado al aumentar la edad, causando una acumulación de radicales libres en el organismo (Harman, 1956).

La propiedad antioxidante está estrechamente unida a la actividad anti-envejecimiento (Reddy y cols., 1991; Martin y cols., 1993). El ajo tiene propiedades antioxidantes (Imai y cols., 1994; Popov y cols., 1994; Lewin y Popov, 1994), protege contra la aterosclerosis (Lau y cols., 1983; Lau, 1989a) y aumenta la función inmune (Lau y cols., 1991; Morioka y cols., 1993). La aterosclerosis y la disminución del sistema inmune son factores ligados al proceso del envejecimiento.

Así mismo varios estudios publicados muestran la capacidad del ajo para restaurar la pérdida de memoria en animales envejecidos, así como la facultad de prolongar la vida (Moriguchi y cols., 1994a; Moriguchi y cols., 1994b; Zhang y cols., 1994).

1.4.7.- EFECTOS SOBRE EL ESTRÉS.

Existen distintos tipos de estrés: ambiental, físico y psicosocial entre ellos. Distintas publicaciones explican cómo el estrés disminuye la actividad del sistema inmune, siendo más difícil luchar contra las infecciones e incluso contra el cáncer (Ader, 1981; Riley, 1981; Marx, 1985).

En experimentos llevados a cabo en animales se vio que el ajo producía una disminución del estrés físico y ambiental (Takasugi y cols., 1984; Takasugi y cols., 1986; Yokoyama y cols., 1986), así como un aumento de la resistencia al cansancio (Saxena y cols., 1980).

También se han realizado estudios clínicos en los que se apreció una disminución de la fatiga, la depresión y la ansiedad (Hiroshima University Group, 1982), así como una menor incidencia de efectos secundarios tras la quimioterapia y radioterapia (Tanaka, 1982).

1.4.8.- EFECTOS ANTIFÚNGICOS Y ANTIBACTERIANOS DEL AJO.

Algunos extractos de ajo han sido capaces de prevenir el crecimiento de ciertas bacterias (Kumar y Berwal, 1998) y hongos (Ghannoum, 1990). Incluso algunos han demostrado tener propiedades antivirales (Nagai, 1973). Se ha identificado la alicina del ajo fresco como el agente activo responsable de este efecto (Nagai, 1973; Yamada y Azuma, 1977). Aunque también el ajoene ha demostrado actividad (Yoshida y cols., 1998). El mecanismo por el cual el extracto de ajo actúa es alterando el perfil lipídico de las membranas celulares (Ghannoum, 1990; San-Blas y cols, 1997).

Cándida albicans

Esta levadura es parte de nuestra flora normal, y existe en nuestro organismo en forma oval. Cuando este organismo pasa a una forma alargada, invade los tejidos de su huésped y causa problemas. Esta transformación puede ser causada por la ingesta de antibióticos o por ciertas hormonas entre otros factores. El ajo impide esta transformación.

Algunos estudios en animales han demostrado que el ajo no mata directamente al hongo, sino que aumenta la función de los fagocitos del animal, y son éstos los que realmente eliminan el organismo (Tadi y cols., 1990).

También se ha observado la capacidad del ajo para prevenir la adhesión de la levadura al epitelio bucal (Ghannoum, 1990).

1.4.9.- EFECTOS SOBRE EL SIDA

Se ha sugerido que el ajo podría ayudar a combatir el SIDA por varias razones:

- El ajo puede inhibir el crecimiento de virus (Nagai, 1973; Adetumbi y Lau, 1983; Tsai y cols., 1985; Guo y cols., 1993).
- El ajo aumenta la función de los fagocitos, linfocitos T y células killer (Kandil y cols., 1987; Lau y cols., 1991; Morioka y cols., 1993).
- El ajo anula algunas de las toxinas que disminuyen el sistema inmune (Lau, 1989b).

Los virus, incapaces de reproducirse por si solos, al invadir una célula necesitan sus genes para multiplicarse. Para hacer esto, los genes virales deben primero expresarse. Estudios recientes han revelado que algunos componentes del ajo pueden suprimir el proceso de la expresión de los genes del virus in vitro (Geng y cols., 1997), probablemente por sus propiedades antioxidantes.

II.- ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL

La pared arterial consta de una capa interna o íntima, una central o media y una más externa denominada adventicia (Figura 5).

II.1.- LA ÍNTIMA

Está formada por una monocapa de células endoteliales, que juegan un papel decisivo en el control de la circulación, ya que liberan numerosos compuestos vasoactivos. Los principales agentes vasodilatadores liberados por el endotelio son el factor relajante derivado de endotelio (EDRF), que ha sido identificado como óxido nítrico (NO) (Ignarro y cols., 1987; Palmer y cols., 1987), la prostaglandina I₂ (PGI₂) o prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), cuya identidad es todavía hoy motivo de controversia entre distintos autores (Mombouli y Vanhoutte, 1997; Edwards y Weston, 1998; Ruiz y Tejerina, 1998). El endotelio también libera sustancias vasoconstrictoras, como el factor contracturante derivado de endotelio, anión superóxido (O₂⁻), tromboxano A₂ (TXA₂) y la endotelina-1 (ET-1), si bien esta última puede comportarse también como vasodilatadora.

Las células endoteliales descansan sobre una membrana basal, separada de las células musculares lisas por una lámina elástica interna de estructura reticular, que presenta espacios interlaminares, que permiten el paso de sustancias a su través.

II.2.- LA MEDIA

Está compuesta principalmente por células musculares lisas vasculares (CMLV), que al ser estimuladas se contraen y reducen el diámetro interno de la pared arterial, y la matriz extracelular, que se une a las CMLV dotándolas de una correcta orientación en la pared vascular. La matriz de la capa media, junto con la adventicia, determina las

propiedades mecánicas de la arteria. La elastina y el colágeno son los componentes proteicos más importantes de la matriz. La elastina dota de elasticidad al vaso y es abundante en arterias de conducción como la aorta, y el colágeno permite a la pared de la media mantener su forma, a pesar de la alta presión intraluminal ejercida por la sangre.

II.3.- LA ADVENTICIA

Es la capa más externa de las arterias, y aparece separada de la media por una lámina elástica externa. Esta capa contiene colágeno, fibroblastos y algunas CMLV. En arterias de calibre mediano o grande, la adventicia presenta pequeños vasos sanguíneos (*vasa vasorum*), linfáticos y algunas terminaciones del sistema nervioso autónomo (SNA). En los grandes vasos de conducción, la adventicia es delgada mientras que en pequeñas arterias musculares (arterias de resistencia) es más ancha.

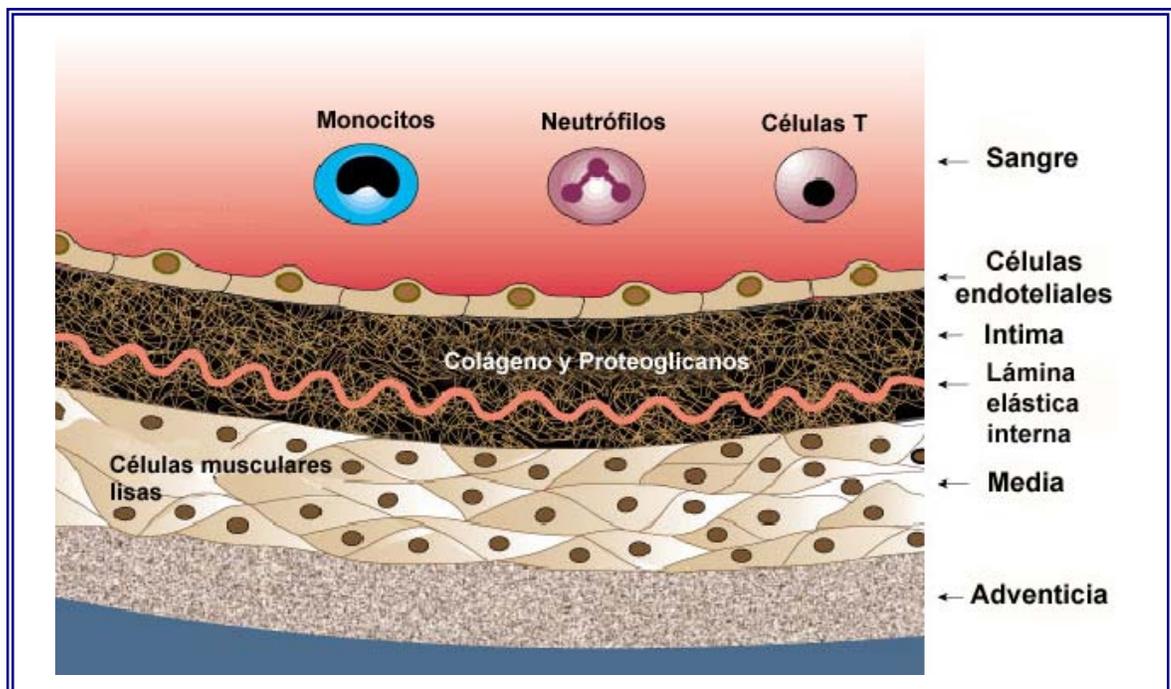


Figura 5.- Esquema de un corte de pared arterial. Modificada de Lasis, 2000.

III.- REGULACIÓN DEL TONO DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

III.1.- MECANISMO DE LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR.

El aumento y la reducción de la concentración de calcio libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), son los principales mecanismos que provocan la contracción y la relajación del músculo liso vascular.

El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ es el resultado de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de la membrana celular y/o de su liberación desde sus depósitos intracelulares, fundamentalmente del retículo sarcoplásmico (RS). Cuando aumenta la $[Ca^{2+}]_i$, este se fija a la calmodulina (CaM) (se unen 4 iones Ca^{2+} por cada molécula de CaM), formándose el complejo Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CaM), el cual se une a la kinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), dando lugar al complejo activo Ca^{2+} -CaM-MLCK (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993). Una vez activada, la MLCK induce la fosforilación de la serina en posición 19 de la cadena ligera (20 kD) de la miosina (MLC). Esta fosforilación permite la unión de la actina y la activación de la ATPasa de la miosina, lo que facilita el establecimiento de los puentes cruzados entre ambas proteínas y el desarrollo de fuerza o acortamiento del músculo liso vascular (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993) (Figura 6).

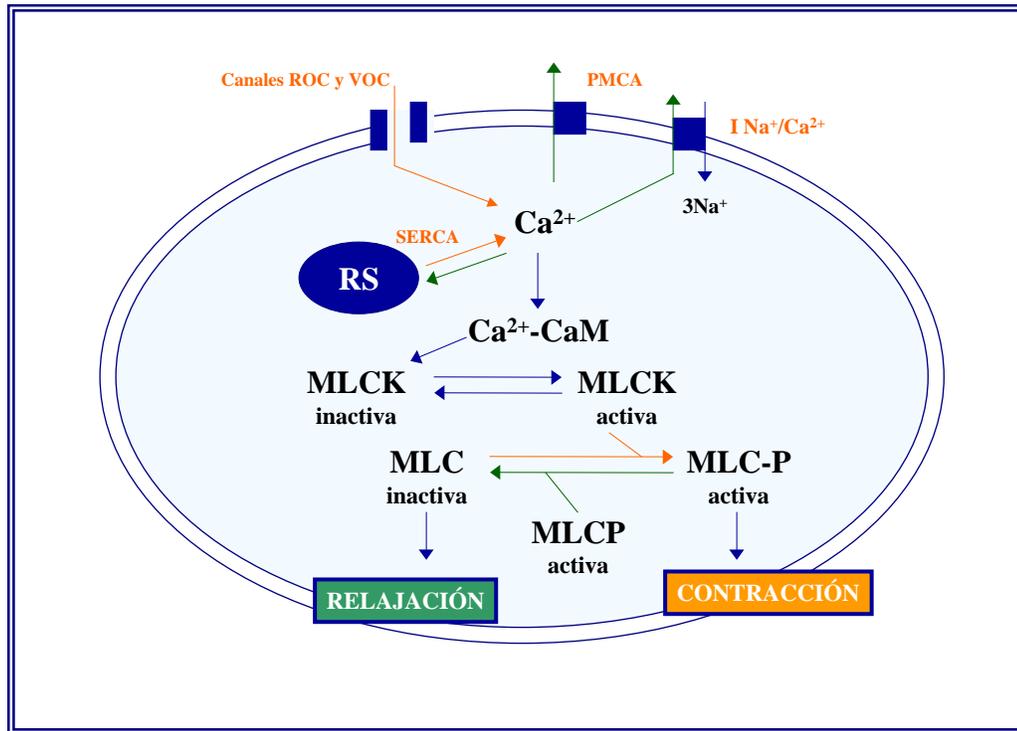


Figura 6.- Esquema de la regulación de la contracción y la vasodilatación por el Ca^{2+} . Las flechas naranjas muestran los mecanismos implicados en el aumento de calcio y la contracción. Las flechas verdes indican los mecanismos implicados en la disminución de calcio y la relajación. PMCA: ATPasa de calcio de la membrana plasmática; Canales ROC y VOC: Canales de calcio dependientes de receptor y Canales de calcio dependientes de voltaje respectivamente; SERCA: ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico; CaM: Calmodulina; MLCK: Kinasa de la cadena ligera de miosina; MLC: Cadena ligera de miosina; MLCP: Fosfatasa de la cadena ligera de miosina.

III.1.1.- ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN

El acoplamiento excitación-contracción implica una cadena de procesos en la que el aumento de Ca^{2+} juega un papel primordial. Se han descrito dos tipos de acoplamiento excitación-contracción dependiendo de si el estímulo es la despolarización

de la membrana (acoplamiento electromecánico) o la acción de agonistas (acoplamiento farmacomecánico) (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993).

El acoplamiento electromecánico, implica cambios en el potencial de membrana de la célula del músculo liso vascular (CMLV). El potencial de reposo de estas células varía entre -50 y -60 mV; cuando estos valores se vuelven menos negativos (despolarización), se activan (abren) los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOC), produciéndose la entrada de calcio y la consiguiente vasoconstricción (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993; Himpens y cols., 1995). De los dos principales canales VOC, el tipo L y el tipo T, el primero tanto por su alta conductancia (18-24 pS) como por su umbral de activación (-40 mV), parece ser el principal responsable de la entrada de Ca^{2+} durante el acoplamiento electromecánico. La entrada de calcio a través de los canales tipo L parece ser asimismo la responsable del componente tónico de la contracción durante una despolarización mantenida de la membrana celular (p.ej. tras aumentar la concentración de K^+ extracelular). La corriente de entrada de calcio activada durante la despolarización puede poner en marcha el mecanismo que se conoce como *liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}* , que consiste en la activación por parte del Ca^{2+} de los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico (RS) y la consiguiente liberación de Ca^{2+} del RS (Iino, 1989; Somlyo y cols., 1991). Aunque este mecanismo juega un importante papel en el músculo liso cardíaco, su existencia en el músculo liso vascular es todavía motivo de controversia (Horowitz y cols., 1996). Los cambios del potencial de membrana hacia valores más negativos (hiperpolarización), producen el cierre de los canales de calcio tipo VOC y disminuyen la concentración de Ca^{2+} intracelular produciendo vasodilatación. La apertura de canales de potasio y la activación de la ATPasa Na^+/K^+ , son dos de los principales mecanismos responsables de la hiperpolarización de la membrana de las células musculares lisas.

El acoplamiento farmacomecánico engloba una serie de mecanismos de señalización celular, que pueden estimular la contracción o la relajación vascular sin

modificar el potencial de membrana de las CMLV (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993). Este acoplamiento también se asocia a un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular procedente en parte del medio extracelular pero, fundamentalmente del RS. El RS es el principal depósito intracelular de calcio en las CMLV. Presenta en su membrana receptores para el inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) que, al activarse, permiten la salida masiva de Ca^{2+} . El IP_3 se genera por distintos agonistas, tales como acetilcolina (ACh), angiotensina II (AII), vasopresina, histamina, serotonina (5-HT), ET-1, catecolaminas y TXA_2 y NA, que actúan sobre sus receptores específicos de la membrana celular, que están acoplados a fosfolipasa C a través de las subunidades α de las proteínas Gq (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993; Himpens y cols., 1995; Karaki y cols., 1997) La fosfolipasa C hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2), siendo el IP_3 uno de los productos de la reacción.

Van Breemen y cols. en 1995 sugirieron que el RS se comporta como una barrera amortiguadora (*buffer barrier*) del Ca^{2+} que entra en la célula. Según estos autores, el Ca^{2+} que entra en la célula se acumularía en un espacio submembranoso restringido, donde sería parcialmente secuestrado por el RS, lo que impediría su paso al espacio citoplasmático central, que alberga los elementos contráctiles responsables de la contracción. Este proceso puede ser modulado por distintos agentes. Los vasodilatadores, que aumentan los niveles de nucleótidos cíclicos, incrementarían la capacidad amortiguadora del RS y disminuirían el paso de calcio al espacio citoplasmático central, mientras que los vasoconstrictores aumentarían los niveles de IP_3 y reducirían la barrera amortiguadora aumentando el paso de Ca^{2+} al espacio citoplasmático central. Este aumento de IP_3 sería de especial importancia a nivel del denominado “*junction space*”, o zona donde el RS y la membrana plasmática están más íntimamente acoplados. A este nivel el IP_3 activaría sus receptores específicos localizados en la superficie del RS; el resultado es un incremento de la concentración de calcio intracelular a nivel de las proteínas contráctiles y un aumento del tono vascular.

Los agonistas pueden, además, inducir la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de la activación de los canales de Ca^{2+} tipo L (Nelson y cols., 1988; Ohya y Sperelakis, 1991) o de los canales dependientes de la activación de receptor (ROC) (Benhan y Tsien, 1987; Ganitkevich e Isenberg, 1990). Los canales ROC también parecen activarse por el estiramiento mecánico (Davies y cols., 1992).

Las características de la respuesta contráctil dependen, por tanto, del tipo de estímulo (despolarización o agonista) (Figura 7) y de la fuente responsable del aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, así:

- Altas concentraciones de K^+ extracelular producen despolarización de la membrana, aumentan la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L y producen una contracción mantenida, que puede suprimirse por los bloqueantes de los canales de calcio tipo L (Sato y cols., 1988; Karaki y cols., 1991).

- Por el contrario, agonistas como la noradrenalina (NA) por un lado estimulan la liberación de Ca^{2+} desde el RS, lo que produce una respuesta contráctil transitoria, ya que la cantidad de Ca^{2+} del RS es limitada (Karaki y cols., 1997), y por otro aumentan la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L y tipo ROC, produciendo una contracción mantenida (Karaki y cols., 1997).

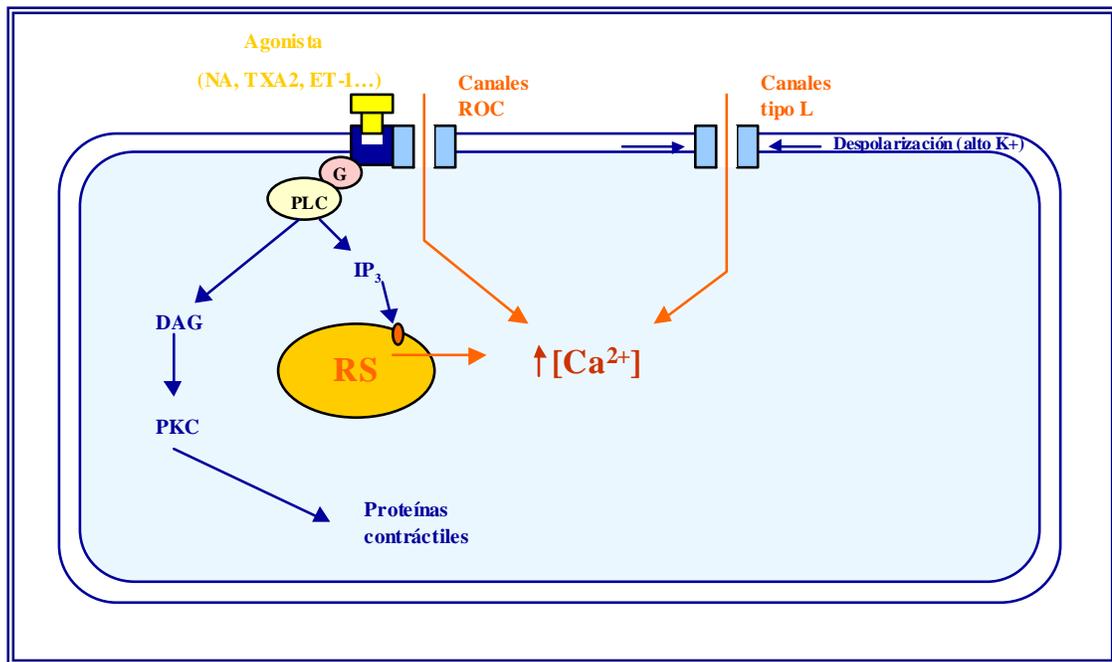


Figura 7.- Esquema de los mecanismos que intervienen en el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y en el desarrollo de la fuerza contráctil inducidos por la despolarización o la acción de un agonista. G: Proteína G; PLC: Fosfolipasa C; IP_3 : Inositol-1, 4,5-trifosfato; DAG: Diacilglicerol; PKC: Proteín kinasa C

III.2.- MECANISMO DE LA RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

La relajación de la CMLV tiene lugar cuando disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ a nivel de las proteínas contráctiles. Esta disminución conlleva la disociación del complejo Ca^{2+} -CaM-MLCK y la regeneración de la apoenzima kinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) inactiva, lo que permite la defosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) a través de la fosfatasa de la MLC (MLCP), produciéndose vasodilatación (Somlyo y Himpens, 1989; Walsh, 1993) (Figura 6). La reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ es el resultado del intercambiador Na^+/Ca^{2+} y de la activación de dos ATPasas activadas por

el Ca^{2+} , localizadas en la membrana celular (PMCA) y en el RS (SERCA). Estas dos ATPasas pueden ser reguladas mediante la fosforilación inducida por las proteínas kinasas C (PKC), A (PKA) y G (PKG); además, la PMCA se activa por la CaM, mientras que la SERCA se regula por el grado de fosforilación de una proteína denominada fosfolambano. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ presenta una baja afinidad por el Ca^{2+} y su acción parece estar limitada a aumentos locales de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a nivel submembranoso.

III.3.- REGULACIÓN ENDOTELIAL DEL TONO VASCULAR

El endotelio vascular es una fina película del grosor de una célula que recubre la superficie luminal de todos los vasos sanguíneos. A pesar de su aparente fragilidad, desempeña un papel crucial en el control del sistema vascular, tanto en la permeabilidad (como barrera separando la sangre de la pared del vaso), como siendo un órgano importante implicado en procesos vasoactivos, metabólicos e inmunes.

El endotelio, además de llevar a cabo diversas actividades metabólicas y de participar en la coagulación sanguínea, puede liberar sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras, que modulan el tono de los vasos. El endotelio vascular puede interactuar mediante dos grandes mecanismos con las células que lo rodean; por una parte, puede liberar sustancias difusibles al líquido extracelular y a la sangre, y por otra puede establecer contactos directos ó *gap-junction* con otras células vasculares y con ciertas células circulantes (monocitos, macrófagos y granulocitos) (Davies y cols, 1988).

A pesar de su posición anatómica estratégica, separando la sangre circulante de las células musculares lisas de la pared vascular, el endotelio no captó la atención de los investigadores hasta que en el año 1977 Moncada y su equipo demostraron que las células endoteliales sintetizaban gran cantidad de prostaciclina (Moncada y cols., 1977). Posteriormente en el año 1980, Furchgott y Zawadzki mostraron que además estas

células eran capaces de liberar un potente factor relajante en respuesta a su estimulación con acetilcolina. Se sugirió que este factor difundía hasta el músculo liso vascular produciendo la relajación de éste. Este factor fue inicialmente denominado factor relajante dependiente de endotelio (EDRF)(Furchgott, 1984).

En condiciones fisiológicas, el endotelio libera mediadores químicos que modulan las respuestas de numerosas células incluyendo células musculares lisas, plaquetas y leucocitos manteniendo así el equilibrio entre sustancias vasoactivas, coagulantes y mitógenas. De esta forma contribuye al mantenimiento del tono vascular, la resistencia periférica, la coagulación y el desarrollo celular.

III.3.1.- FACTORES RELAJANTES DERIVADOS DE ENDOTELIO

En la actualidad, el término genérico de factor relajante derivado de endotelio (EDRF) se asocia de forma general a los mediadores relajantes liberados por las células endoteliales, y no a uno en particular como se ha considerado históricamente al óxido nítrico (NO). Así, hay también que considerar derivados prostanoideos como la prostaciclina (PGI₂) y el factor hiperpolarizante (EDHF), cuya naturaleza es en la actualidad objeto de estudio (Figura 8).

III.3.1.A.- Óxido nítrico (NO)

En 1980, Furchgott y Zawadzki demostraron que la acetilcolina relajaba los vasos sanguíneos aislados, sólo cuando el endotelio estaba intacto. Posteriormente se demostró que la vasodilatación producida por la acetilcolina y otras sustancias (bradikinina, sustancia P, ATP) requería la liberación, por las células endoteliales, de una sustancia difusible responsable de la relajación del músculo liso adyacente. Esta sustancia, que se denominó EDRF (factor relajante derivado de endotelio), no era una prostaglandina, ya que la inhibición de la ciclooxigenasa con indometacina no bloqueaba la respuesta vasodilatadora de la acetilcolina.

Finalmente, este factor fue identificado como óxido nítrico (NO) y como el responsable de la actividad vasodilatadora y antiagregante plaquetaria del EDRF (Ignarro y cols., 1987; Palmer y cols., 1987).

El NO que presenta propiedades vasodilatadoras, antiagregantes y antiproliferativas, se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima NO sintasa (NOS), que cataliza la oxidación de este aminoácido a L-citrulina, liberándose el NO a partir del átomo guanidín terminal de la L-arginina.

La NO sintasa existe en tres isoformas: NOSe, que es constitutiva de las células endoteliales, NOSn, isoforma neuronal constitutiva, presente en el tejido nervioso y en la médula renal y NOSi, que es inducible y se encuentra en macrófagos y células musculares lisas. Las dos primeras, son consideradas enzimas constitutivas y liberan NO por cortos períodos en respuesta a un receptor o a una estimulación física, mientras que NOSi está regulada mayoritariamente por citoquinas, ya que se induce durante la respuesta inmune y sintetiza NO durante largos períodos, teniendo como consecuencia una vasodilatación patológica y un daño tisular.

En condiciones fisiológicas, existe una liberación basal de NO que proporciona un continuo tono vasodilatador en las células del músculo liso vascular. Pero el NO también se libera en respuesta a fuerzas físicas (cizallamiento, presión) y humorales (ACh, bradikinina, catecolaminas, angiotensina II, ET-1, vasopresina, trombina, ATP y ácido araquidónico, entre otros) y difunde libremente hacia las CMLV, donde estimula a la guanilato ciclasa soluble y aumenta los niveles intracelulares de GMPc, produciendo vasodilatación (Rubanyi y Vanhoutte., 1986). Este nucleótido cíclico es el principal mediador de la respuesta vasodilatadora del NO, aunque el NO puede producir vasodilatación a través de otros mecanismos independientes del GMPc (Plane y cols., 1998).

Así, el NO produce hiperpolarización de las CMLV a través de la activación de diversos canales de potasio: canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} o K_{Ca} (Archer y cols., 1994; George y Shibata, 1995), que presentan rectificación tardía o K_v (Zhao y cols., 1997) y canales de K^+ dependientes de ATP o K_{ATP} (Garland y McPherson, 1992; Murphy y Brayden, 1995). Los fármacos donadores de NO, como el nitroprusiato sódico (NPS) y la nitroglicerina, producen también activación de los canales K_{Ca} (Bychkov y cols., 1998).

Aparte de la activación de los canales de potasio, se han descrito numerosos mecanismos por los que el GMPc produce vasodilatación: activación de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA) (Khan y cols., 1998; Cohen y cols., 1999) y de la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) (Barnes y Liu, 1995), activación de la ATPasa Na^+/K^+ (Rapoport y cols., 1985; Tamaoki y cols., 1997), cierre de canales de Ca^{2+} tipo L (Ruiz-Velasco y cols., 1998) e inhibición de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico inducida por inositol trifosfato (IP_3) (Hirata y cols., 1990).

Además de todos estos mecanismos que reducen la $[Ca^{2+}]_i$, la disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el Ca^{2+} también parece estar involucrada en la relajación que sigue a la activación de la vía del GMPc (McDaniel y cols., 1992; Karaki y cols., 1997).

III.3.1.B.- Factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF)

Estudios realizados en una gran variedad de lechos vasculares y vasos sanguíneos aislados evidencian la existencia de un factor hiperpolarizante derivado de endotelio. Este factor se considera diferente del NO por distintos motivos, entre los que se encuentra, la incapacidad de los inhibidores de la NOS para prevenir las acciones del EDHF, la incapacidad del NO exógeno o de los donadores de NO para reproducir las

acciones del EDHF y la aparente falta de participación del GMPc, principal mediador intracelular de la acción del NO.

Las propiedades relajantes e hiperpolarizantes del EDHF han sido bien estudiadas (Garland y cols., 1995; Mombouli y Vanhoutte, 1997; Ruiz y Tejerina, 1998) pero, sin embargo, aún no se conoce su identidad ni el mecanismo por el que hiperpolariza el músculo liso vascular.

La hiperpolarización de las células musculares lisas inducida por EDHF está mediada por un incremento en la salida de iones potasio (K^+). El tipo de canal de K^+ involucrado no ha sido definitivamente establecido, pero es más probable que estos canales sean calcio dependientes, que sean dependientes de ATP (Cohen y Vanhoutte, 1995; Vanhoutte, 1996). Al igual que ocurre con el NO, la liberación de EDHF requiere un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} en la célula endotelial.

Observaciones tempranas (Félétou y Vanhoutte, 1988) sugirieron que el EDHF podría estimular la Na^+/K^+ -ATPasa del músculo liso. También se ha sugerido que el EDHF es idéntico al K^+ liberado del endotelio vascular de la arteria hepática de rata cuando este es estimulado por agonistas como la ACh (Edwards y cols., 1998). El K^+ puede ser liberado desde las células endoteliales (Gordon y Martin, 1983), y la vasodilatación e hiperpolarización inducida por K^+ ha sido detectada en diversos vasos (Knot y cols., 1996; Quayle y cols., 1996) siendo la farmacología de estos cambios idéntica a la del EDHF (Edwards y cols., 1999). Otro candidato propuesto como EDHF es la L-citrulina (Ruiz y Tejerina, 1998), producto de la reacción catalizada por la NOS que convierte la L-arginina en NO y L-citrulina.

La contribución de la hiperpolarización en la relajación vascular dependiente de endotelio varía en relación al tamaño de las arterias y es mayor en los vasos de resistencia. En arterias grandes, ambos mediadores pueden contribuir a las relajaciones

dependientes de endotelio, pero la acción del NO es la predominante en circunstancias normales (Nakashima y cols., 1993; Campbell y cols., 1996).

III.3.1.C.- Prostaglandina I₂ o prostaciclina (PGI₂)

La PGI₂ se sintetiza a partir del ácido araquidónico (AA) por acción de la enzima ciclooxigenasa que conduce a la formación del endoperóxido cíclico (PGG₂ y PGH₂). Este, por acción de la PGI₂ sintetasa da lugar a la formación de PGI₂. Esta se sintetiza mayoritariamente en las células endoteliales pero también en la media y en la adventicia en respuesta al cizallamiento, hipoxia y distintos mediadores. Su liberación depende principalmente de la salida de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares (Parsaee y cols., 1992).

Presenta propiedades vasodilatadoras y antiagregantes plaquetarias, al activar la adenilato ciclasa e incrementar la producción de AMPc en las células musculares lisas y en plaquetas. Además actúa regulando la producción de endotelina (Lüscher y cols., 1993). La PGI₂ se libera junto con el NO como respuesta a la estimulación de las células endoteliales con agonistas como bradikinina, ACh y ATP (Busse y cols., 1984). Parece ser que la PGI₂ juega un papel modulador del tono vascular, oponiéndose a la acción vasoconstrictora de otros derivados del AA.

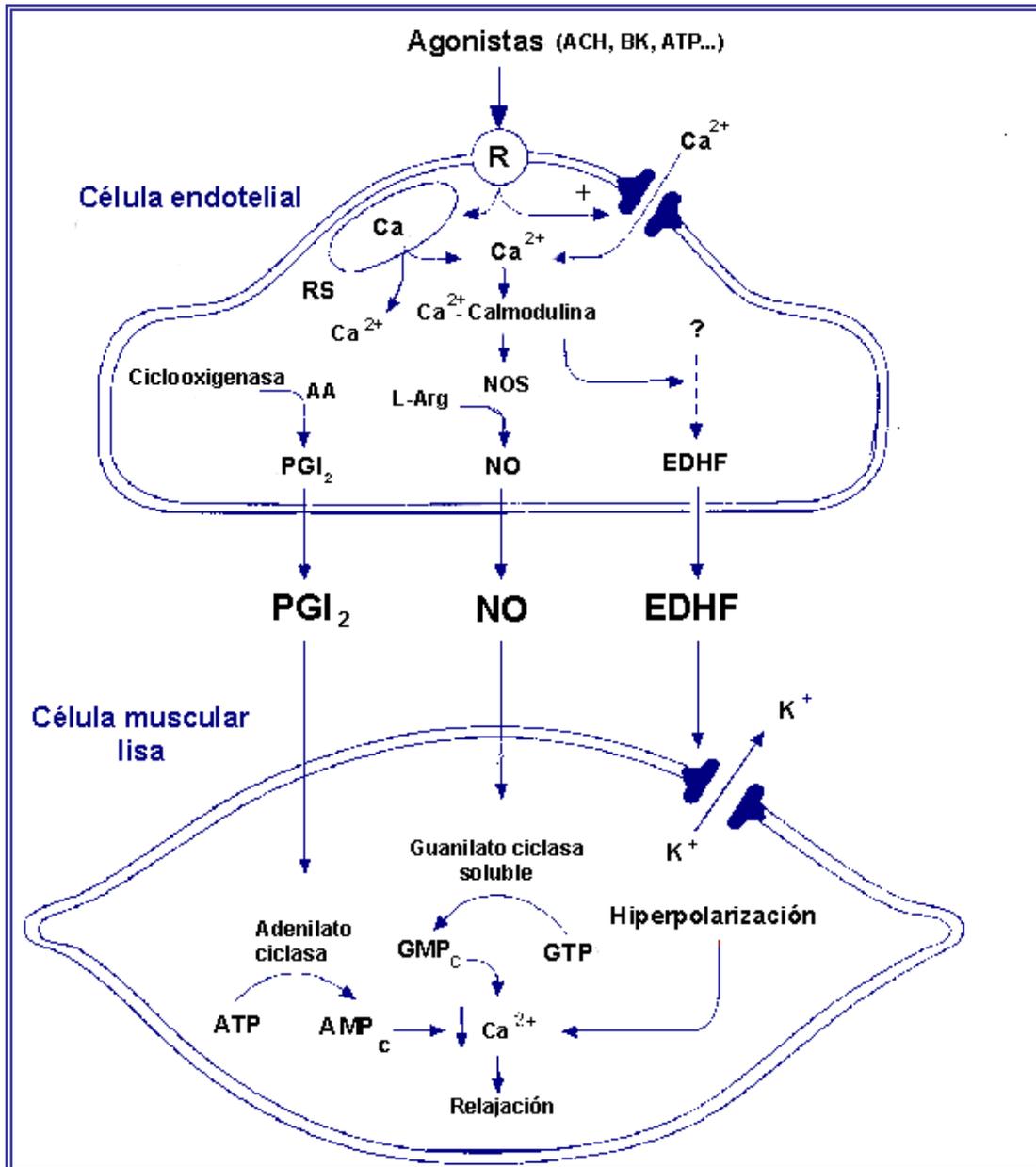


Figura 8.- Esquema de la liberación de factores relajantes desde las células endoteliales y su efecto sobre las células musculares lisas vasculares (Modificado de Vanhoutte, 1997). RS: retículo sarcoplásmico, AA: ácido araquidónico, NOS: óxido nítrico sintasa.

III.3.2.- FACTORES CONTRACTORES DERIVADOS DE ENDOTELIO

Las células endoteliales también pueden inducir la contracción de las células musculares lisas vasculares, por falta de liberación de factores relajantes, en particular NO, o por producción de sustancias vasoconstrictoras (Vanhoutte, 1993). Entre estos factores se encuentran los aniones superóxido (O_2^-), que actúan como secuestradores de NO (Rubanyi y Vanhoutte, 1986) y los derivados de la ciclooxygenasa, como el endoperóxido cíclico (PGH_2) y el tromboxano A_2 (TXA_2). Por último, se encuentra el péptido endotelina-1 (ET-1), que juega un papel más importante en la regulación del tono vascular a largo plazo, que en cambios inmediatos en el grado de contracción (Yanagisawa y cols., 1988; Schini y Vanhoutte, 1991; Masaki y cols., 1992) (Figura 9).

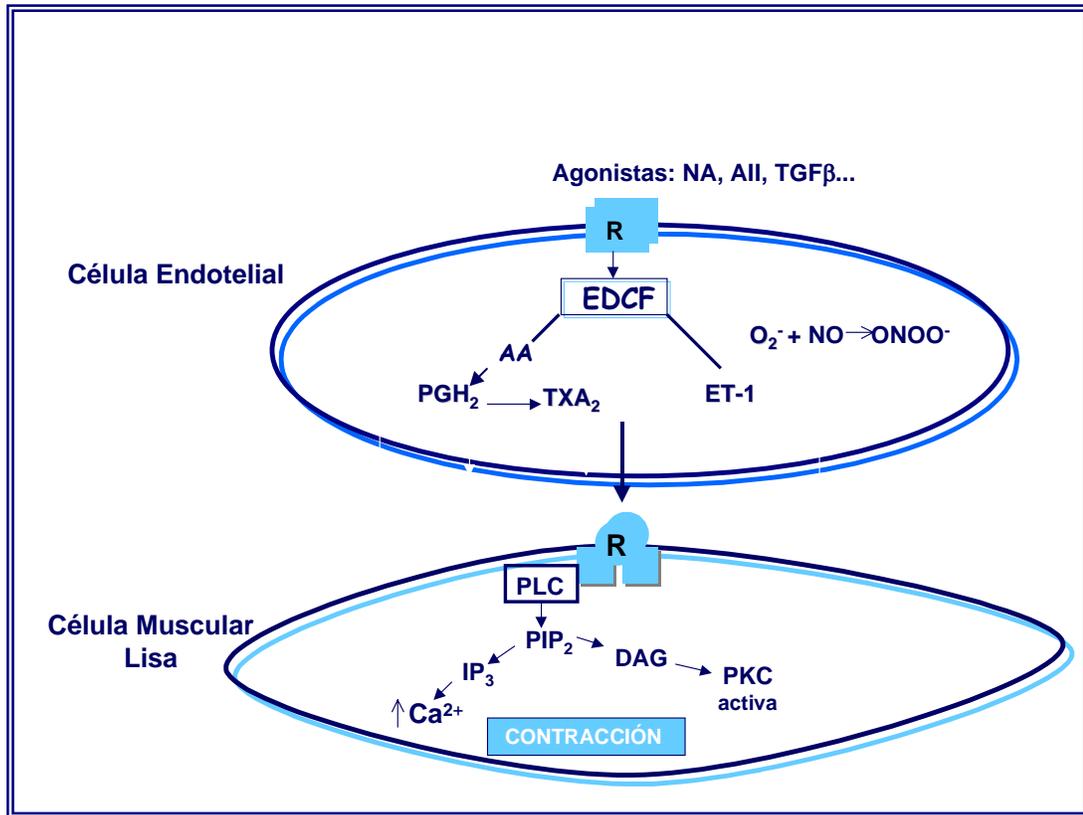


Figura 9.- Factores contractores de endotelio, y su efecto sobre el músculo liso. R: receptor, EDCF: factores contractores derivados de endotelio, AA: ácido araquidónico, PGH₂: prostaglandina G₂, TXA₂: tromboxano A₂, ET1: endotelina 1, PLC: fosfolipasa C, PIP₂: fosfatidilinositol difosfato, IP₃: inositol trifosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteinquinasa C.

Estos factores contractores derivados de endotelio tienen un papel fundamental en patologías como la hipertensión y la aterosclerosis, caracterizadas por un desequilibrio entre los factores contractores y relajantes derivados por el endotelio.

III.3.2.A.- Factores derivados de la ruta de la ciclooxigenasa

La activación de la ruta de la ciclooxigenasa endotelial lleva a la formación de distintos factores contractores como TXA₂, PGH₂ y O₂⁻.

El TXA₂ se forma a partir de endoperóxidos por acción del enzima tromboxano sintetasa. La PGH₂ se puede formar directamente a partir del AA o a partir del ácido 20-hidroxiieicosatetraenoico (20-HETE), el principal producto del ácido araquidónico vía citocromo P450.

Los receptores de PGH₂/TXA₂ son acoplados a proteínas G (Coleman y cols., 1994) y el sistema segundo mensajero que interviene en la acción es la estimulación de la fosfolipasa C (PLC), con la consecuente formación de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) que ocasionan un incremento de la concentración de calcio citosólico. Los endoperóxidos y tromboxanos activan la agregación plaquetaria, reacción vinculada a la activación de la PLC.

En el envejecimiento, la hipertensión y la aterosclerosis están aumentadas las concentraciones de factores contractores dependientes de endotelio relacionados con la ciclooxigenasa y más concretamente la PGH₂ (Lüscher y cols., 1992).

La ruta de la ciclooxigenasa también da lugar a la formación de aniones superóxido (O₂⁻) (Kukreja y cols., 1986), que inactivan el NO, incrementando la contractilidad del músculo liso vascular.

Como resultado de la reacción de NO y O₂⁻ se origina el anión peroxinitrito (ONOO⁻) que es también un relajante vascular pero menos potente que el NO. Así, el mecanismo de inactivación realizado por el anión superóxido sobre el óxido nítrico

consiste en su transformación en elementos vasorrelajantes con una vida media más corta y menos potentes.

El NO es estabilizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) a través de su reacción con los aniones superóxido (Beckman y cols., 1990). Por eso la superóxido dismutasa extracelular (SOD-EC) es un importante mediador que modula la relajación dependiente de endotelio al prevenir la formación de (ONOO⁻) (White y cols., 1994).

El ONOO⁻ es un fuerte oxidante y al protonarse puede disociarse en radical hidroxilo (OH[•]) y dióxido de nitrógeno (NO₂), siendo ambos también potentes oxidantes (Figura 10).

La regulación de la concentración de O₂⁻ extracelular por la enzima SOD-EC es importante para mejorar las respuestas a NO (Umans y Levi, 1995). La SOD-EC está presente en elevadas concentraciones entre el endotelio y el músculo liso y el mantenimiento de estos niveles es fundamental para obtener bajas concentraciones de O₂⁻ extracelular y así prevenir la inactivación del NO mediada por dicho O₂⁻ (Oury y cols., 1996).

Un aumento en la producción de O₂⁻ endotelial en vasos de individuos hipercolesterolémicos e hipertensos (Mügge y cols., 1994) podría conducir a la inactivación del NO y tener un papel importante en la patogénesis de dichas enfermedades debido al mayor desarrollo de contracción del músculo liso vascular, resultando en un incremento de la resistencia vascular y una elevación de la presión sanguínea, así como contribuir al proceso aterosclerótico.

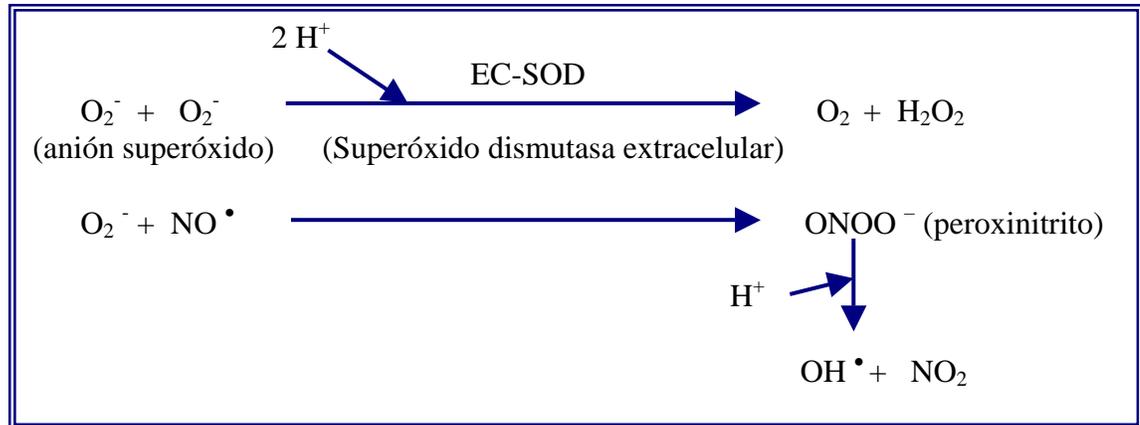


Figura 10.- Dismutación del anión O_2^- vía enzimática por la EC-SOD. El O_2^- puede reaccionar con el NO dando lugar al ONOO^- , que al protonarse se disocia en OH^\bullet y NO_2 que son potentes especies oxidantes.

III.3.2.B.- Endotelina

Las endotelinas (ETs) son una familia de tres isopéptidos (ET-1, ET-2, ET-3) de 21 aminoácidos, codificados por tres genes distintos (Inoue y cols., 1989). El gen que codifica la ET-1 se localiza en el cromosoma 7 y predomina a nivel del endotelio, músculo liso vascular, corazón, pulmón, riñón y páncreas. El gen que codifica la ET-2 predomina en el endotelio y en la musculatura lisa intestinal, corazón estómago, placenta y útero. La expresión de la ET-3 predomina a nivel central, pulmonar, digestivo y renal, pero no tiene lugar a nivel endotelial (Haynes y Webb, 1993). La síntesis y liberación de ET-1 es estimulada por angiotensina II (AII), noradrenalina (NA), trombina, factor de crecimiento tumoral β (TGF β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), ésteres de forbol, interleukina 1- β , vasopresina, hipoxia y fuerzas de cizallamiento vascular (Levin, 1995; Webb, 1997).

Los efectos de la ETs están mediados a través de receptores denominados ET_A (ET-1 = ET-2 > ET-3), ET_B (ET-1 = ET-2 = ET-3) y quizás ET_C (ET-3 > ET-1 = ET-2), que presentan una homología del 66% (Rubanyi y Polokoff, 1994; Levin, 1995).

Ambos receptores, ET_A y ET_B, están acoplados a proteínas G (Rubanyi y Polokoff, 1994; Levin, 1995). La vía de señalización de la respuesta constrictora de las ETs implica la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la hidrólisis del fosfatidil bifosfato (PIP₂) en IP₃ y DAG. El IP₃ aumenta la [Ca²⁺]_i, tanto por facilitar su liberación desde los depósitos intracelulares como por aumentar su entrada a través de la membrana celular. El DAG activa la PKC, lo que aumenta la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca²⁺ (Levin, 1995; Karaki y Matsuda, 1996). La ET-1 también bloquea los canales K_{ATP} (Miyoshi y cols., 1992), por lo que despolariza la membrana y facilita la apertura de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje y aumenta la [Ca²⁺]_i, produciendo vasoconstricción. La ET-1, además, activa la fosfolipasa A₂ (PLA₂), aumentando la síntesis de productos de degradación del AA, que pueden contribuir a sus efectos vasoconstrictores (Toga y cols., 1991).

Los niveles circulantes de ET-1 son reducidos bajo condiciones fisiológicas y causan vasodilatación a bajas concentraciones por activación de los receptores ET_B del endotelio asociados con la liberación de NO, PGI₂ y EDHF. A elevadas concentraciones, la ET-1 produce una contracción sostenida por activación de los receptores ET_A en las células de músculo liso vascular (Lüscher y cols., 1996).

IV.- ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es una enfermedad progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las arterias. Las lesiones tempranas de la aterosclerosis consisten en acumulaciones subendoteliales de macrófagos ricos en colesterol, llamados *células espumosas*. En los humanos, estas lesiones o *estrías grasas* se pueden encontrar en la aorta incluso en la primera década de la vida, en la coronaria en la segunda década, y en las arterias cerebrales en la tercera o cuarta década.

Debido a las diferencias en la dinámica del fluido sanguíneo, hay sitios más propensos para la formación de lesiones en las arterias. Las estrías grasas no son clínicamente significativas, pero son las precursoras de otras lesiones más avanzadas caracterizadas por una acumulación de centros necróticos ricos en lípidos y células musculares lisas (SMCs). Estas lesiones fibrosas tienen una capa fibrosa consistente en SMCs y matriz extracelular que incluye núcleos necróticos ricos en lípidos. Estas placas pueden complicarse mediante una calcificación, ulceración de la superficie luminal, y hemorragias procedentes de los pequeños vasos que crecen dentro de la lesión desde la media de la pared del vaso sanguíneo. Aunque estas lesiones avanzadas pueden crecer suficientemente hasta provocar un bloqueo del flujo sanguíneo, la complicación más importante se produce por una oclusión aguda debida a la formación de trombos o coágulos sanguíneos, provocando un infarto o un accidente vascular. Normalmente esta trombosis se asocia con la ruptura o erosión de la lesión.

Los acontecimientos que ocurren en la aterosclerosis se han estudiado profundamente en modelos animales, incluyendo conejos, cerdos, roedores y primates. El primer cambio que se observa en la pared arterial tras una dieta rica en grasas y colesterol, es una acumulación de lipoproteínas y sus agregados en los sitios más propensos a la lesión de la íntima. Al cabo de días o semanas, se pueden observar los monocitos adhiriéndose a la superficie del endotelio. Los monocitos entonces, emigran a

través de la monocapa endotelial hasta la íntima, donde proliferan y se diferencian en macrófagos captando lipoproteínas y transformándose en células espumosas (Ross, 1993). Con el tiempo, las células espumosas mueren, contribuyendo su contenido lipídico a la formación del núcleo necrótico de la lesión. Algunas estrías grasas subsecuentemente, acumulan SMCs que migran desde la capa media. Con la secreción de elementos fibrosos por las células musculares, estas placas oclusivas fibrosas aumentan de tamaño. Inicialmente, las lesiones crecen hacia la adventicia hasta que se alcanza un punto crítico, a partir del cual, empiezan a expandirse hacia fuera e invaden el lumen. Las lesiones continúan creciendo por la migración de nuevas células mononucleares de la sangre que entran en el vaso; esto va acompañado de proliferación celular, producción de matriz extracelular y acumulación de lípidos extracelulares.

IV.1.- ETIOLOGÍA

Numerosos estudios epidemiológicos han revelado una gran cantidad de factores de riesgo para la aterosclerosis (Tabla 3). Estos se podrían agrupar en factores con un importante componente genético, y en factores con componente ambiental.

<i>Factores con componente genético</i>
Elevados niveles de LDL/VLDL
Niveles bajos de HDL
Elevados niveles de lipoproteína(a)
Presión arterial elevada
Elevados niveles de homocisteína
Historia familiar
Diabetes y obesidad
Elevados niveles de factores hemostáticos
Depresión y otros componentes del comportamiento
Género (masculino)
Inflamación sistémica
Síndrome metabólico
<i>Factores medioambientales</i>
Dieta rica en grasa
Tabaco
Niveles bajos de antioxidantes
Falta de ejercicio
Agentes infecciosos

Tabla 3.- Factores genéticos y medioambientales asociados con la aterosclerosis y la enfermedad coronaria cardiaca.

La relativa abundancia de las diferentes lipoproteínas plasmáticas parece ser de vital importancia, ya que niveles elevados de lipoproteínas aterogénicas es un prerrequisito para la mayoría de las formas de la enfermedad. Con la excepción del género y los niveles de lipoproteína(a), en cada uno de los factores de riesgo genéticos

parecen estar implicados numerosos genes. Esta complejidad puede observarse claramente en los cruces genéticos de animales mantenidos en las mismas condiciones ambientales; los estudios llevados a cabo esos roedores revelaron docenas de factores genéticos que contribuyen a los niveles de lipoproteínas, a la grasa corporal y a otros factores de riesgo (Mehrabian y cols., 1998). Además, existe otro nivel de complejidad en las interacciones entre los factores de riesgo. Frecuentemente, estos no son simplemente aditivos; por ejemplo, los efectos de la hipertensión en la enfermedad coronaria cardíaca se ven considerablemente amplificados si los niveles de colesterol son altos (Lusis y cols., 1998). Goldbourt y Neufeld en 1988 examinaron en varias familias la importancia de la genética y el ambiente en la enfermedad coronaria cardíaca, y concluyeron que la capacidad hereditaria de la aterosclerosis era a veces superior al 50%. Por otra parte, al estudiar las migraciones de la población y su incidencia en el desarrollo de la enfermedad, observaron que el factor medioambiental estaba claramente implicado. Así, la enfermedad coronaria cardíaca resultaría de una combinación de un ambiente no saludable, de la susceptibilidad genética y de nuestra esperanza de vida (Lusis y cols., 1998).

IV.1.1.-LÍPIDOS

Tienen un papel fundamental en el desarrollo de la placa de ateroma. De hecho, un 60% del peso de la placa lo constituye su contenido lipídico. Existen distintos lípidos en la placa de ateroma: el mayor componente son los ésteres de colesterol (47%-55% del total), el colesterol libre supone un 21%-32%, y los fosfolípidos un 15%-20%.

El papel que desempeña el colesterol en la génesis de la placa de ateroma es determinante. Desde las fases más iniciales, se demuestra su presencia en las lesiones arteriales. Por otra parte, la elevación de su concentración en plasma se asocia claramente a aumentos del tamaño de la placa ateromatosa, y una disminución de las concentraciones de colesterol plasmático, reduce la expresividad clínica de la

enfermedad. No obstante, la cardiopatía isquémica no siempre se acompaña de cifras anormales de colesterol. Ahora bien, existen mecanismos en los que las lipoproteínas están involucradas en el desarrollo de la ateromatosis, a pesar de unas cifras normales de colesterol. Así, merece especial consideración todo lo que concierne a la modificación de las lipoproteínas, en concreto de las LDL.

-Lipoproteínas de baja densidad (LDL)-

Muchos estudios han señalado al colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) como la fracción relacionada directamente con la enfermedad arteriosclerótica (Aviram, 2000).

Las LDL, y en particular sus derivados oxidados son lesivos para el endotelio (Steinberg, 1991; Steinberg, 1995), quimiotácticas para los monocitos e inhibitoras de la migración de los macrófagos. Las LDL, pueden sufrir este proceso de oxidación tanto en células endoteliales, musculares lisas como en macrófagos, resultando una lipoproteína llamada LDL oxidada (LDLox). Esta oxidación es llevada a cabo en la pared arterial, y más concretamente en las que presentan un principio de lesión aterosclerótica. A pesar de que se han enunciado varias hipótesis sobre el mecanismo de esta oxidación, éste todavía no está aclarado. Se han implicado en esta reacción a las lipooxigenasas (Parthasarathy y cols., 1989) que han quedado posteriormente descartadas (Sparrow y Olszewski, 1992), al radical superóxido a través de la formación de peroxinitrilo (Christen y cols., 1994) y por último a la actividad fosfolipasa D de los macrófagos que haga las LDL más sensibles a la acción oxidante de los cationes metálicos (Aviram y Maor, 1994).

Las LDLox son captadas por el receptor *scavenger* de los macrófagos, acumulando estas células colesterol éster y convirtiéndose entonces en células espumosas. Además se forman complejos inmunológicos entre LDLox y anticuerpos

anti-LDLox y se produce una disminución en la síntesis de NO endotelial (favoreciéndose la vasoconstricción y la agregación plaquetaria). Como se mencionó anteriormente, la LDLox también es capaz de favorecer la síntesis de factores de crecimiento y moléculas de adhesión que atraen elementos circulantes hacia la pared vascular (Holvoet y Collen, 1994), incrementándose la síntesis de citoquinas o moléculas inflamatorias (Bui y cols., 1996). Por último, las LDLox ejercen una acción quimiotáctica sobre monocitos, atrayéndose más monocitos a la placa ateromatosa. Todos estos eventos contribuyen al desarrollo de la lesión.

-LDL y función vasomotora-

Recientemente se ha comprobado que las LDLox no sólo están implicadas en el origen de los cambios morfológicos que dan lugar a la aterosclerosis, sino que también se encuentran involucradas en muchas alteraciones de la actividad vasomotora que acompaña esta enfermedad.

En pacientes con aterosclerosis, se ha observado la aparición de disfunción vasomotora, asociada principalmente a daño en el endotelio. Así se ha comprobado que mientras la infusión con acetilcolina produce vasodilatación de las arterias de los individuos sanos, en pacientes con aterosclerosis, se produjo una respuesta contráctil (Ludmer y cols., 1986). De hecho, se sugiere que esta disfunción vasomotora es anterior a la aparición de la lesión aterosclerótica y se encuentra directamente relacionada con el incremento de los niveles de colesterol, y más concretamente de LDLox en plasma (Celermajer y cols., 1992). Esta disfunción aparece también en lechos vasculares que no desarrollan lesiones ateroscleróticas (Sellke y cols., 1990; Anderson y cols., 1995a). Tras una terapia que disminuyó la concentración plasmática de lípidos pero no redujo la placa ateromatosa, comenzó a observarse una normalización de la función vasomotora (Treasure y cols., 1995; Anderson y cols., 1995b); del mismo modo, esta mejora se pudo ver en pacientes que habían estado sometidos a un tratamiento con antioxidantes durante

un largo periodo de tiempo (Stewart-Lee y cols., 1994; Keaney y cols., 1994) lo cual evitaría el incremento de LDLox que aparece en la hipercolesterolemia.

Al exponer arterias aisladas a concentraciones patológicamente relevantes de LDLox, se observó que la respuesta a distintos agonistas con acción mediada por el endotelio vascular, se veía seriamente afectada, es el caso de la ACh en aorta aislada de rata (Kugiyama y cols., 1990; Yokohama y cols., 1990) y para serotonina, trombina y plaquetas agregadas en coronaria porcina (Simon y cols., 1990; Tanner y cols., 1991; Ohgushi y cols., 1993; Murohara y cols., 1994).

Este efecto aparecía cuando los vasos sanguíneos eran expuestos a LDLox, pero nunca en presencia de LDL nativa. Sin embargo, la respuesta a otros agonistas como bradikinina no se veía afectada por la presencia de LDLox (Tanner y cols., 1991). Tampoco se afectó la respuesta a fármacos donadores de NO como nitroglicerina, ni apareció citotoxicidad para las células endoteliales provocada por LDLox (Kugiyama y cols., 1990; Tanner y cols., 1991; Plane y cols., 1992).

Las relajaciones más afectadas por LDLox, son aquellas que están mediadas fundamentalmente por la formación de NO. Para explicar este hecho, se han sugerido varios mecanismos:

- Inactivación directa del NO liberado con LDLox (Galle y cols., 1990; Chin y cols., 1992)
- Disminución de la bioactividad del NO liberado (Myers y cols., 1994).
- Disminución de los niveles de ARN mensajero de NO sintasa, y como consecuencia, menor cantidad de NO sintasa proteína (Hirata y cols., 1995).

Al afectar la respuesta endotelial relacionada con NO, la LDLox también es capaz de aumentar la respuesta a agonistas contráctiles como noradrenalina (Galle y

cols., 1990) y el mimético de tromboxanos U46619 (Simon y cols., 1990). De la misma manera, podría disminuir la liberación basal de NO, quedando favorecida la aparición de vasoespasmos, además de dañar la capacidad para relajar arterias.

Las lipoproteínas LDLox, podrían también estimular la liberación de factores con carácter contráctil por parte del endotelio. Se ha comprobado que la estimulación con LDLox favorece la expresión de ARN mensajero de endotelina-1 y su posterior liberación (Boulanger y cols., 1992).

Pero las LDLox no solamente tienen efecto sobre las células endoteliales, se ha visto que son capaces de provocar contracción de arteria femoral de conejo independientemente de la presencia de endotelio (Galle y cols., 1990), sugiriendo una interacción directa con la musculatura vascular.

Este patrón de comportamiento observado en vasos incubados en presencia de LDLox, es el mismo que aparece en los vasos de animales y personas con aterosclerosis. Así, en arterias ateroscleróticas, se ha comprobado que existe mayor sensibilidad a estímulos contráctiles debidos tanto a un efecto directo sobre la movilización de Ca^{2+} en la célula muscular lisa (Miwa y cols., 1994; Stepp y Tulenko, 1994; Cox y Tulenko, 1995), como a una disminución en la síntesis y liberación de NO (Shimokawa y Vanhoutte, 1989 a y b; Lamping y cols., 1994; Golino y cols., 1991).

IV.1.2.- TABACO

El tabaco tiene dos efectos que deben ser considerados: un efecto agudo, que facilita la isquemia aguda, y un efecto crónico que facilita la aterogénesis.

El efecto agudo es debido fundamentalmente a la nicotina. La nicotina es un mediador de la reacción simpático-adrenérgica, lo que produce un mayor consumo de

oxígeno, y un aumento del tono vascular (vasoconstricción por estímulo α -adrenérgico), mientras que el monóxido de carbono reduce la capacidad de transporte de oxígeno de la hemoglobina, y todo ello contribuye a la isquemia.

El efecto crónico está relacionado con la reducción de la cantidad de colesterol transportado por las HDL en relación con el transportado por las LDL, el aumento de la liberación de factores quimiotácticos y mitógenos para las células musculares lisas y el hecho de que el monóxido de carbono es un producto directamente lesivo para el endotelio.

Algunos estudios muestran que los individuos fumadores presentan un mayor riesgo de enfermedad coronaria. En estos estudios, las LDL obtenidas del plasma de individuos fumadores son más susceptibles a sufrir una modificación oxidativa (Harats y cols., 1990; Scheffler y cols., 1990). Además, algunos de los efectos tóxicos de los cigarrillos podrían estar relacionados con la presencia en el humo de radicales libres o sustancias químicas capaces de generar dichos radicales libres.

IV.1.3.- HIPERTENSIÓN ARTERIAL

El exceso de presión puede aumentar la permeabilidad endotelial favoreciendo la incorporación de lípidos. Además, el endotelio, como consecuencia del estrés por presión y cizallamiento, altera sus funciones y secreciones normales, con un predominio del tono vasoconstrictor.

IV.1.4.- DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus se puede considerar, claramente, un modelo de aterosclerosis acelerada. Se relaciona con la aterogénesis por mecanismos muy distintos:

- a) La lesión del endotelio mediada por la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, en su caso.
- b) La modificación de las lipoproteínas por glucosilación, y por oxidación por radicales libres.
- c) La dislipidemia típica del diabético, que suele cursar con aumento de las VLDL, con descenso de HDL, y eventual incremento de las LDL.
- d) La obesidad.
- e) La hipertensión
- f) La resistencia a la insulina e hiperinsulinismo (en la diabetes tipo II)
- g) El trastorno de los factores relacionados con la hemostasia: aumento de los factores de coagulación V, VII, X y fibrinógeno, hiperfunción plaquetaria con aumento de TXA₂, y de productos liberados procedentes de los gránulos plaquetarios.

IV.1.5.- OTROS FACTORES DE RIESGO

Otros determinantes de la aterosclerosis son la edad, el sexo, la obesidad y la historia familiar, ya que también influyen sobre la concentración de colesterol en plasma y sobre la proporción de LDL y HDL.

IV.2.- INTERACCIONES CELULARES Y MOLECULARES

Las células de los mamíferos responden a estímulos que van a activar las distintas señales de transducción dando lugar a una serie de respuestas celulares como la proliferación, parada del crecimiento celular, hipertrofia, diferenciación o apoptosis. Estos estímulos proliferativos activan las denominadas cascadas de quinasa, llamadas proteinquinas activadas por mitógenos o *MAPquinasas*. En las CMLV parecen estar implicadas tres cascadas de *MAPquinasa*, la más estudiada ha sido la cascada de la *ERK* (*ERK1* y *ERK2*), que es activada por los factores de crecimiento, endotelina, vasopresina y angiotensina II. Esta cascada es crítica en los procesos de diferenciación celular así

como en la inducción de hipertrofia. Por otro lado, se ha descrito una segunda cascada de *MAPquinasa* que se ve activada por el estrés celular y se la conoce como *p54 MAPquinasa*, *SAPKs* o *JNK*. La tercera *MAPquinasa* descrita es la *p38*, que igualmente puede ser activada por los mismos estímulos que activan la *SAPKs*.

Las células animales, normalmente, sólo se dividen cuando son estimuladas por factores de crecimiento producidos por otras células. El ciclo celular consta de distintas fases, dentro de estas, la mitosis o división nuclear constituye la fase donde se van a producir más cambios, pasando por distintas subfases (profase, prometafase, metafase, anafase y telofase), seguidamente viene la fase de citoquinesis o ruptura de la célula dando lugar a dos células hijas idénticas. Tanto la mitosis como la citoquinesis constituyen la fase M del ciclo celular, la cual sólo ocupa una pequeña fracción de todo el ciclo. La otra fracción mucho más prolongada es la denominada interfase, que comprende las fases G_1 , S y G_2 . En la fase G_1 , la célula incrementa su tamaño y se prepara para copiar su DNA. Esta copia ocurre en la fase S o fase de síntesis, donde la célula duplica sus cromosomas. Después hay una segunda fase llamada G_2 , durante la cual la célula se prepara para la fase de mitosis (fase M) cuando la célula se dividirá en dos células hijas (Figura 11). Las nuevas células inmediatamente entran en G_1 y pueden seguir un ciclo completo, o bien parar temporal o permanentemente.

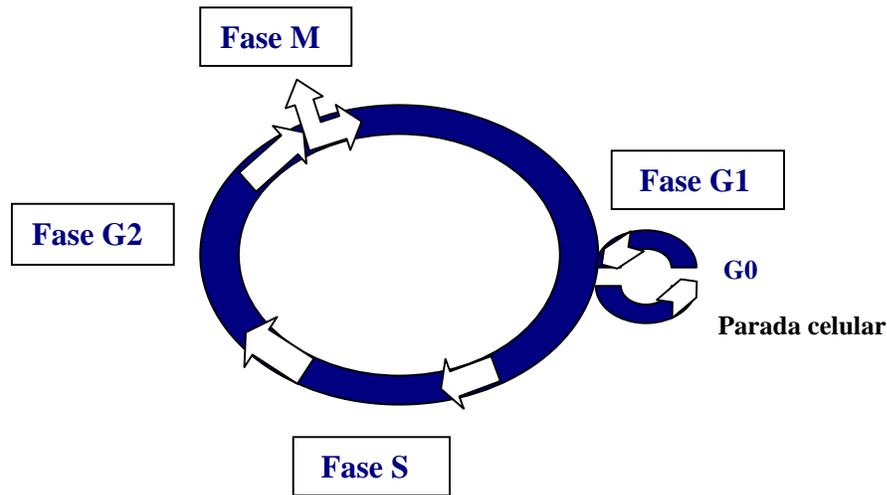


Figura 11.- Esquema de las distintas fases del ciclo celular

En condiciones normales, existe un equilibrio entre la liberación de sustancias promotoras y sustancias inhibitoras del crecimiento, de manera que en los vasos maduros la tasa de replicación de las CML es extremadamente baja (Schwartz y cols., 1990). Sin embargo, en ciertas patologías vasculares, el equilibrio entre la síntesis de factores que favorecen el crecimiento y factores que lo inhiben parece estar desplazado hacia el primero, favoreciéndose el crecimiento del músculo liso vascular, y por lo tanto, el desarrollo de hipertrofia vascular (Dzau y Gibbons, 1991).

Existen numerosos factores que estimulan el crecimiento de las CMLV: el PDGF o factor de crecimiento derivado de plaquetas juega un papel importante en los procesos de migración y proliferación de las CML “in vivo” observados en ciertas patologías vasculares, como la aterosclerosis (Ross y cols., 1986), el FGF o factor de crecimiento fibroblástico que estimula el crecimiento de las células endoteliales y es mitogénico para las CML (Borges y Maciag, 1989; Dzau y Gibbons, 1991), el TGF- β que es un factor multifuncional que induce hipertrofia y poliploidía celular, y estimula o inhibe la proliferación y la migración de las CML (Owens y cols., 1988; Agrotis y cols., 1994), la endotelina-1 el péptido vasoconstrictor más potente conocido y con actividad

mitogénica, ya que estimula la síntesis de DNA mediada por un aumento de la expresión de protooncogenes como el c-fos y c-myc (Simonson y cols., 1989), la angiotensina II que induce crecimiento de las CML aunque los mecanismos subyacentes no están todavía claros (Griffin y cols., 1991; Ko y cols., 1992; Bukenburg y cols., 1992).

Por otra parte, existen moléculas con propiedades inhibitorias del crecimiento celular. Entre ellas se encuentran algunas sustancias producidas por el endotelio, como la heparina, un grupo heterogéneo de glicosaminglicanos y el heparán sulfato, compuesto estructuralmente próximo a la heparina que se localiza en la superficie celular y la matriz extracelular (Clowes y cols., 1984), la PGI₂ y el NO. Estos compuestos inhiben la síntesis de DNA y la proliferación de las CMLV en cultivo (Castellot y cols., 1982; Reilly y cols., 1989), y son capaces de reducir considerablemente la replicación de las CML “in vivo” observada en modelos de aterosclerosis experimental inducida por daño endotelial (Clowes y Clowes, 1986; Majesky y cols., 1987).

Durante la aterogénesis se producen una serie definida de cambios en la pared arterial en los cuales juegan un papel crucial los monocitos/macrófagos. Tras la realización de cultivos tisulares con células vasculares y monocitos/macrófagos, se sugirieron las posibles vías de iniciación y progresión de la enfermedad. La inflamación mediada por el endotelio juega un papel primordial y la acumulación de LDL oxidadas en la íntima contribuye significativamente al reclutamiento de monocitos y la formación de células espumosas. Durante la pasada década, la comprensión de los mecanismos moleculares de la aterogénesis se ha visto revolucionado por los estudios realizados en ratones transgénicos (Smithies y Maeda, 1995), aunque estos estudios son limitados a la hora de extrapolarlos a humanos.

IV.2.1.- INICIACIÓN DE LA LESIÓN

El endotelio ejerce de barrera selectiva permeable entre la sangre y los tejidos. Tiene una función sensorial y ejecutora y puede generar moléculas que regulan la trombosis, la inflamación, el tono y remodelado vascular. Por ejemplo, al quitar el endotelio se produce una migración y proliferación de las células musculares lisas (SMCs) que persiste hasta que el endotelio se regenera (Gimbrone, 1999). Entre las fuerzas físicas que actúan sobre las células endoteliales, está el estrés por presión y cizallamiento del flujo sanguíneo, que incluso modifica la morfología de las células endoteliales. Las células en las zonas tubulares de las arterias, donde el flujo de sangre es uniforme y laminar, son elipsoides y se alinean en la dirección del flujo. Las células en las regiones de ramificaciones o curvaturas de las arterias, donde el flujo es irregular, tienen forma poligonal y carecen de orientación definida. Estas últimas áreas muestran un aumento de la permeabilidad a las macromoléculas como las LDL y son zonas preferenciales para la formación de lesiones (Gimbrone, 1999).

Como se muestra en la Figura 12, el primer evento en la aterosclerosis es la acumulación de LDL en la matriz subendotelial. Esta acumulación es mayor si los niveles de LDL circulante son mayores, y tanto el transporte como la retención de LDL están aumentados. Las LDL difunden pasivamente entre las uniones de las células endoteliales, y su retención en la pared arterial parece que está relacionada con las interacciones entre un constituyente de las LDL, la apolipoproteína B (ApoB), y los proteoglicanos de la matriz (Boren y cols., 1998). Además, otras lipoproteínas que contienen ApoB llamadas lipoproteínas(a) se pueden acumular en la íntima y producir aterosclerosis. Las lipoproteínas(a), partículas parecidas a las LDL pero que contienen un polipéptido adicional que está ligado a la ApoB por un puente disulfuro, parecen ser particularmente aterogénicas debido a sus efectos adicionales sobre la fibrinólisis y el crecimiento de las células musculares (Grainger y cols., 1994).

Las LDL nativas no son captadas suficientemente rápido por los macrófagos para generar las células espumosas, por lo que se ha propuesto que las LDL son, de alguna forma, modificadas en la pared arterial (Goldstein y cols., 1979). Así, las LDL sufren modificaciones incluyendo oxidación, lipólisis, proteólisis y agregación, y estas modificaciones contribuyen a la inflamación y a la formación de las células espumosas. Una de las modificaciones más significativas que producen la lesión temprana de la pared vascular, es la oxidación lipídica como resultado de su exposición a las células vasculares. Estas modificaciones, inicialmente, producen *LDL oxidadas mínimamente*, con capacidad pro-inflamatoria pero que no están suficientemente modificadas para ser reconocidas por los receptores barredores de macrófagos.

Las lipoxigenasas insertan oxígeno molecular en los ácidos grasos poliénoicos, produciendo moléculas como el hidroperoxiéicosatetraénoico (HPETE), que se transfiere a través de la membrana celular para fijar las LDL extracelulares. En los ratones que carecen de 12/15-lipoxigenasa la posibilidad de padecer aterosclerosis disminuye, sugiriendo que este enzima puede ser una fuente importante de especies reactivas de oxígeno en la oxidación de las LDL (Cyrus y cols., 1999).

Las HDL tienen un papel protector contra la aterosclerosis. Su mecanismo de acción es su capacidad de remover el exceso de colesterol de los tejidos periféricos. Pero además, las HDL también protegen al inhibir la oxidación de lipoproteínas. La propiedad antioxidante de las HDL es debida en parte a la paraoxonasa sérica, una estearasa de las HDL, que puede degradar algunos fosfolípidos oxidados biológicamente activos (Hegele, 1999; Shih y cols., 2000).

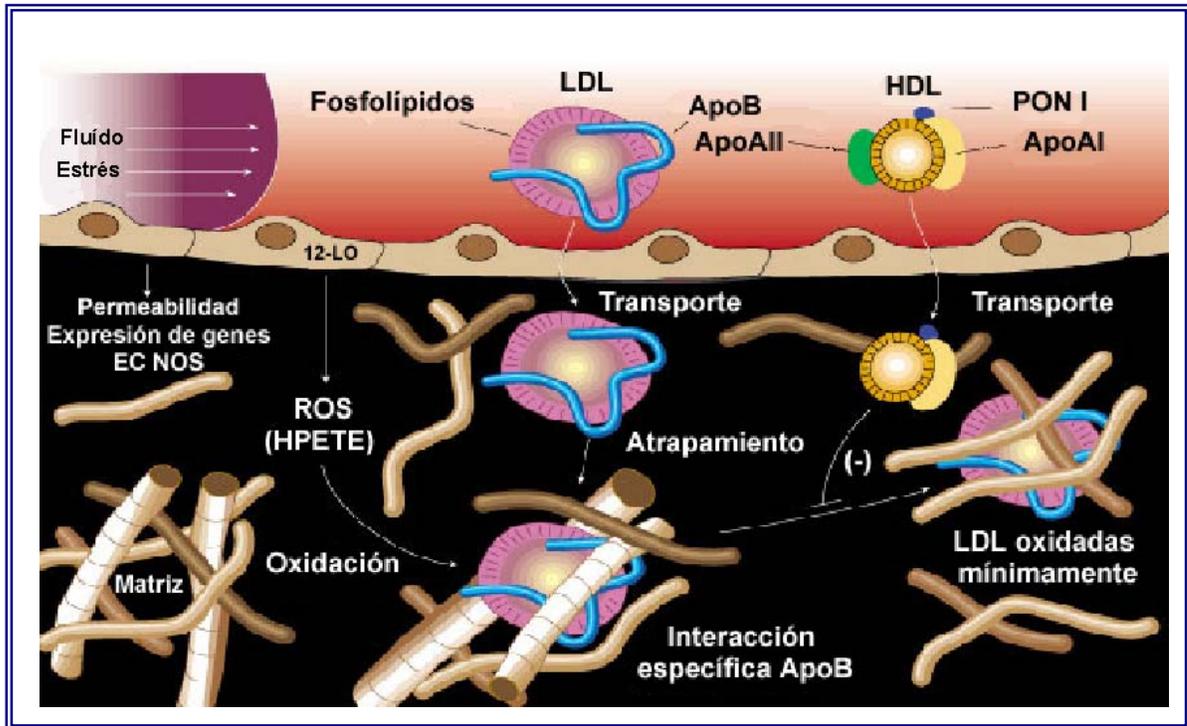


Figura 12.- Lesión inicial. Las fuerzas hemodinámicas actúan sobre las células endoteliales modificando su permeabilidad y la expresión de genes, como el de la NOS. El evento inicial es la retención de LDL y otras lipoproteínas que contienen ApoB como resultado de la interacción con la matriz. Las LDL sufren modificaciones oxidativas como resultado de la interacción con especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyendo productos de la 12/15-lipoxigenasa (12-LO) como el HPETE. La oxidación de las LDL se inhibe por las HDL, que contienen la proteína sérica paraoxonasa (PON1). Figura modificada de Lusic, 2000.

IV.2.2.- INFLAMACIÓN

En el proceso de aterosclerosis se produce un reclutamiento de monocitos y linfocitos pero no de neutrófilos a hacia la pared arterial (Figura 13). Lo que inicia esto, es la acumulación de LDL mínimamente oxidadas, que estimula a las células

endoteliales a producir moléculas pro-inflamatorias, incluyendo moléculas de adhesión y factores de crecimiento como el M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos). La actividad biológica de las LDL mínimamente oxidadas está contenida principalmente en la fracción fosfolípida, además se han identificado tres productos oxidados biológicamente activos resultantes de la escisión de los ácidos insaturados (Watson y cols., 1997). Las LDL pueden inhibir la producción de NO, que tiene múltiples propiedades antiaterogénicas, incluyendo la relajación vascular. Además de las LDL oxidadas, existen otros factores que modulan la inflamación, incluyendo las fuerzas hemodinámicas, los niveles de homocisteína, las hormonas sexuales y las infecciones. La diabetes puede también promover la inflamación, en parte por la formación de los productos finales de la glicosilación que interaccionan con los receptores endoteliales (Hofmann y cols., 1999).

La entrada en la pared arterial de ciertos tipos de leucocitos está mediada por moléculas de adhesión y factores quimiotácticos. El primer paso en la adhesión, el efecto “rodante” de monocitos a lo largo de la superficie endotelial, está mediado por selectinas que se unen a los ligandos carbohidratados de los leucocitos. Varios estudios realizados en ratones deficientes de selectinas o de la molécula de adhesión ICAM, revelaron el papel de estas moléculas de adhesión en la aterosclerosis (Dong y cols., 1998; Collins y cols., 2000). La firme adhesión los monocitos y células T al endotelio puede estar mediada por la integrina VLA-4 de estas células, que interaccionaría tanto con la molécula VCAM-1 del endotelio como con la variante CS-1 de la fibronectina. Estudios realizados tanto in vivo como in vitro han demostrado el papel de estas interacciones en la aterosclerosis (Shih y cols., 1999). Finalmente, los ratones deficientes en la proteína quimiotáctica MCP-1 o su receptor CCR2 presentaban claramente menos lesiones ateroscleróticas, sugiriendo esto que la interacción MCP-1/CCR2 tiene un papel importante en la adhesión de monocitos (Gu y cols., 1998; Boring y cols., 1998).

La citoquina M-CSF estimula la proliferación y la diferenciación de los macrófagos, e influye sobre varias de sus funciones como la expresión de receptores barredores. Los ratones con una mutación espontánea de M-CSF tenían un menor número de lesiones, sugiriendo la obligatoria influencia de los macrófagos en la formación de las lesiones (Smith y cols., 1995).

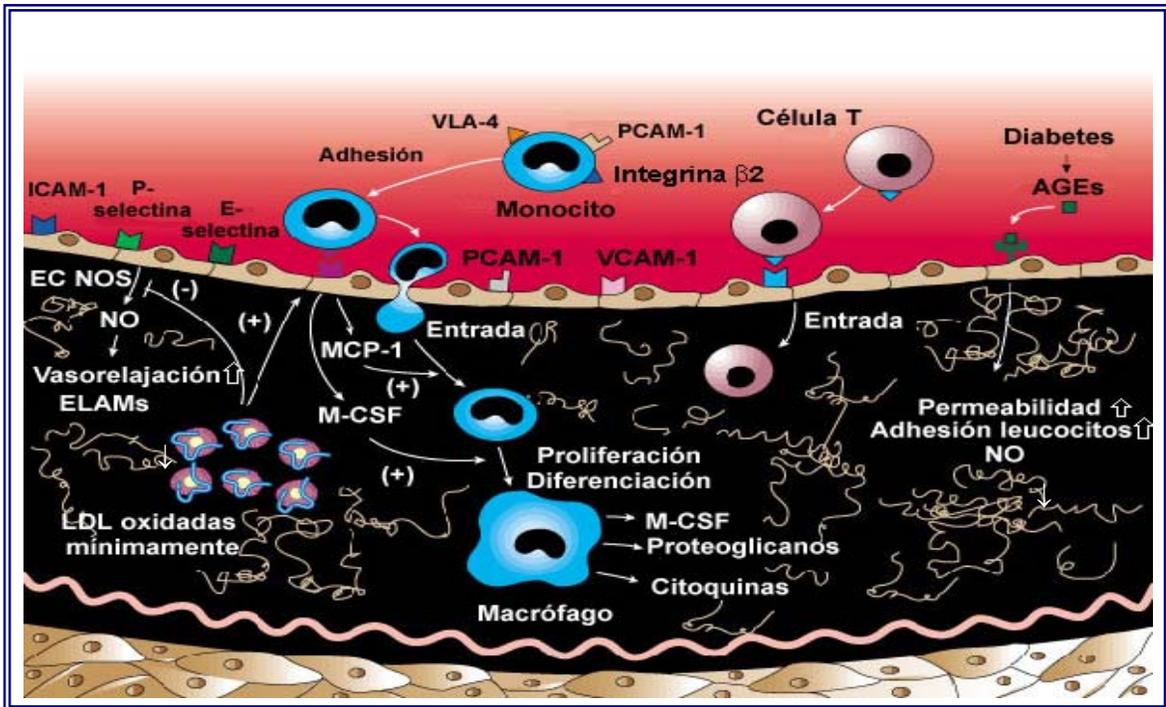


Figura 13.- Inflamación. Las LDL oxidadas estimulan las células endoteliales a producir moléculas de adhesión, proteínas quimiotácticas como MCP-1 (de los monocitos), y factores de crecimiento como M-CSF (estimulante de colonias de macrófagos), produciéndose una captación de monocitos en la pared vascular. Las LDL oxidadas también inhiben la producción de NO, un mediador de la vasodilatación y de la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos endoteliales (ELAMs). Entre las moléculas de adhesión endoteliales importantes para la captación de leucocitos se encuentran: ICAM-1, P-selectina, E-selectina, PCAM-1 y VCAM-1. Las moléculas de adhesión de los monocitos son: integrina β_2 , VLA-4, PCAM-1. Los productos avanzados de glicosilación (AGEs) que se forman en la diabetes, y también promueven la inflamación vía receptores endoteliales. Figura modificada de Lusis, 2000.

IV.2.3.- FORMACIÓN DE CÉLULAS ESPUMOSAS

Las LDL deben estar extensamente modificadas para que los macrófagos den lugar a la formación de las células espumosas (Figura 14). Esta modificación implica especies reactivas de oxígeno producidas por las células endoteliales y los macrófagos, pero también se cree la posibilidad de que ciertos enzimas estén implicados, incluyendo la mieloperoxidasa, esfingomielinasa y una fosfolipasa secretora, estando todas implicadas en las lesiones ateroscleróticas. La mieloperoxidasa genera especies altamente reactivas como el ácido hipocloroso y el radical tirosil, y las LDL modificadas por mieloperoxidasa se unen a los receptores barredores de los macrófagos (Podrez y cols., 2000). La esfingomielinasa puede promover la agregación de lipoproteínas, produciendo un aumento de la retención y captación de macrófagos (Marathe y cols., 1999). Finalmente, la fosfolipasa secretora (grupo II sPLA2) puede provocar la oxidación de las LDL (Ivandic y cols., 1999).

La rápida captación de LDL altamente oxidadas por los macrófagos, dando lugar a las células espumosas, está mediada por un grupo de receptores que reconocen un amplio número de ligandos. Dos de esos receptores barredores, SR-A y CD36, parecen ser de gran importancia, y los ratones que carecen de estos receptores muestran una modesta reducción de las lesiones ateroscleróticas (Febbraio y cols., 2000). La expresión de estos receptores barredores está regulada por los factores IFN- γ (interferón- γ) y por TNF- α (Factor de necrosis tumoral- α).

Los macrófagos segregan ApoE, y esto puede promover el flujo de colesterol hacia las HDL, y por tanto inhibiendo la transformación de macrófagos a células espumosas. Esto se ha demostrado en experimentos llevados a cabo por Fazio y cols. en 1997.

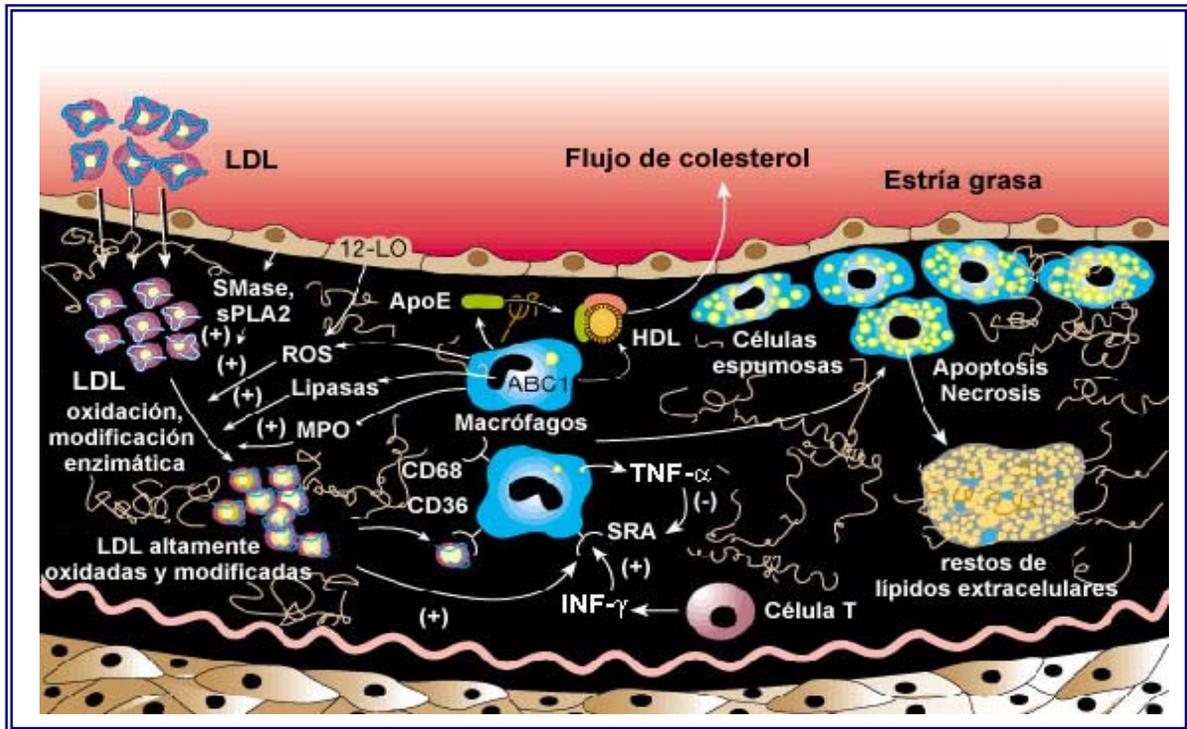


Figura 14.- Formación de células espumosas. Los agregados altamente oxidados de LDL se forman en la pared vascular como resultado de la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), y las enzimas esfingomielinasa (Smase), fosfolipasa-2 secretora (sPLA2), otras lipasas y mieloperoxidasa (MPO). Los agregados de LDL son reconocidos por los receptores barredores de los macrófagos como SRA, CD36 y CD68. La expresión de estos receptores está regulada por citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), y el interferón- γ (IFN- γ). Las células espumosas segregan ApoE, que facilita la eliminación del exceso de colesterol celular. La muerte de las células espumosas deja una masa de lípidos extracelulares y de otros productos de desecho. Figura modificada de Lusis, 2000.

IV.2.4.- PLACA FIBROSA

Las placas fibrosas se caracterizan por ser una masa creciente de lípidos extracelulares, principalmente colesterol y sus ésteres, además de acúmulos de células musculares lisas y matriz extracelular. Tanto las citoquinas como los factores de crecimiento secretados por los macrófagos y las células T son importantes para la migración y proliferación de las células musculares y para la producción de matriz extracelular.

Algunos estudios recientes han demostrado que la interacción de CD40 con su ligando CD40L (CD154) contribuye de manera importante al desarrollo de las lesiones avanzadas (Schönbeck y cols., 2000 a y b). En un primer momento se reconoció que esta interacción era esencial para las reacciones inmunológicas en las que estaban implicadas las células T y B, pero hoy se sabe que el CD40 también se expresa en los macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas. Esta interacción resulta así, en la producción de citoquinas inflamatorias, proteasas degradantes de matriz y moléculas de adhesión.

Existen diversos factores que contribuyen al desarrollo de las lesiones fibrosas, incluyendo niveles elevados de homocisteína, la hipertensión y las hormonas. Por una parte, los niveles elevados de homocisteína parecen que dañan las células endoteliales y que estimulan la proliferación de las células vasculares musculares lisas (Gerhard y Duell, 1999). Por otra parte, los efectos de la elevada presión arterial en la aterosclerosis parecen que están mediados por los componentes del sistema renina-angiotensina, por ejemplo, la angiotensina II estimula directamente el crecimiento de las células musculares lisas y la producción de matriz extracelular. Ensayos llevados a cabo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), indicaron que la presión sanguínea elevada estimula la expresión de PDGF, un potente mitógeno (Negoro y cols., 1995). En cuanto a las hormonas, los estrógenos tienen múltiples propiedades antiaterogénicas, incluyendo

efectos sobre las lipoproteínas plasmáticas y la estimulación de prostaciclina y de la producción de NO (Nathan y Chaudhuri, 1997).

La infección por *citomegalovirus* se ha asociado con la aterosclerosis y con la restenosis tras una angioplastia (Gupta y cols., 1997). El posible mecanismo propuesto es la estimulación de la migración de las células musculares por el receptor US28 del virus (Streblov y cols., 1999).

IV.2.5.- LESIONES AVANZADAS Y TROMBOSIS

La aparición de los eventos coronarios trombóticos se ha asociado principalmente con la composición y vulnerabilidad de la placa más que con la severidad de la estenosis (Figura 15). Las placas que son vulnerables tienen generalmente capas fibrosas delgadas un número considerable de células inflamatorias. Las células T, por ejemplo, producen IFN- γ que inhibe la producción de matriz y los macrófagos producen varias proteasas que la degradan, incluyendo colagenasa intersticial, gelatinasa y estromolosa (Libby, 1999). La ruptura de la placa ocurre frecuentemente en los bordes de la misma, ricos en células espumosas, sugiriendo que los factores que contribuyen a la inflamación pueden también influir en la trombosis. Así, es notable que la incidencia de infarto de miocardio o de accidentes vasculares aumenta durante las infecciones agudas.

La estabilidad de las lesiones ateroscleróticas puede también estar influenciada por la calcificación y la neovascularización, rasgos ambos de las lesiones avanzadas. La calcificación de la íntima es un proceso en el que células parecidas a pericitos secretan una estructura matricial que subsecuentemente se va calcificando, siendo semejante a una formación ósea. Este proceso está regulado por oxisteroles y citoquinas (Watson y cols., 1994). El crecimiento de pequeños vasos desde la media, puede constituir un conducto para la entrada de células inflamatorias (Moulton y Folkman, 1999).

La trombogenicidad de la lesión dependería de la presencia del factor tisular, una proteína clave en la iniciación de la cascada de coagulación. La producción de este factor por las células endoteliales y los macrófagos, está aumentada por las LDL oxidadas, las infecciones o por la interacción CD40-CD40L en las células inflamatorias (Schönbeck y cols., 2000 a y b). La expresión de otras moléculas mediadoras de la trombosis como el activador del plasminógeno, puede ser también importante.

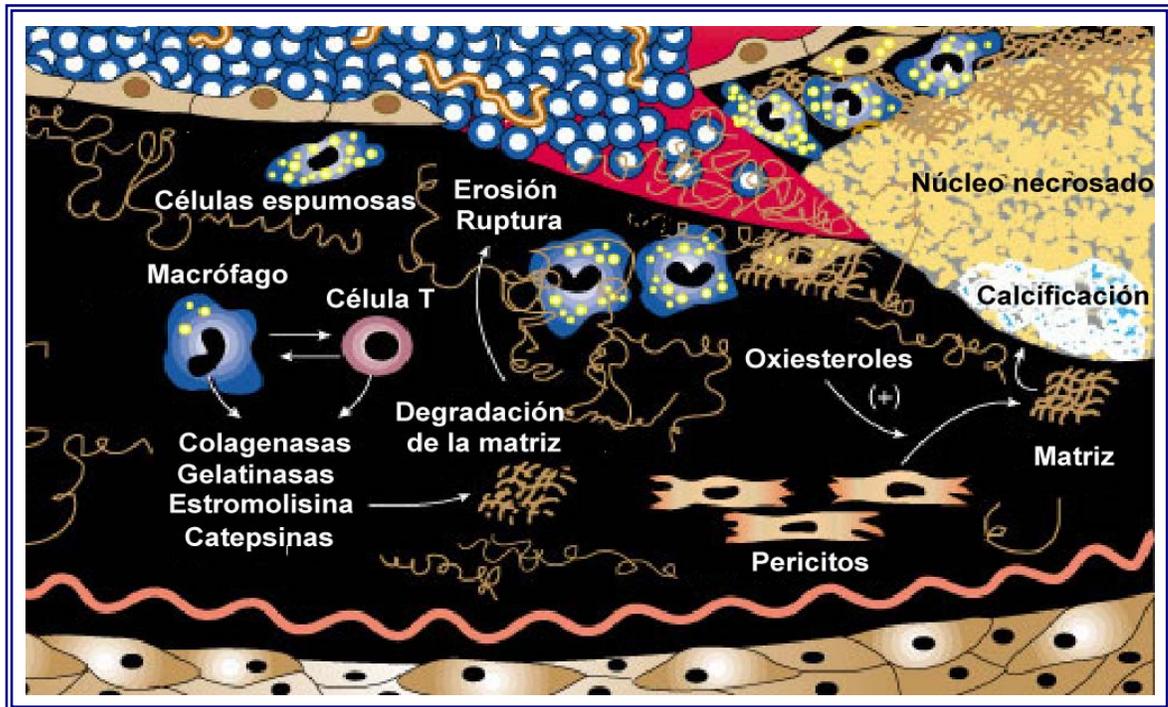


Figura 15.- Lesiones complejas y trombosis. Las placas vulnerables con una fina capa fibrosa resultan de la degradación de la matriz por varias proteinasas como las colagenasas, gelatinasas, estromilsina y catepsinas, y por la inhibición de la secreción de la matriz. Entre los factores que desestabilizan las placas y que promueven la trombosis, está la infección, que aumenta la expresión de del factor tisular y disminuye la expresión del activador del plasminógeno. La calcificación de las lesiones parece ser un proceso activo y regulador que envuelve la secreción por parte de células parecidas a pericitos de un “soporte” para el depósito de fosfato cálcico. La formación de un trombo, consistente en plaquetas adherentes y fibrina, normalmente resulta de una ruptura de la placa. Figura modificada de Lusis, 2000

MATERIAL Y MÉTODOS

En la presente tesis doctoral nos propusimos estudiar las propiedades farmacológicas así como el posible mecanismo de acción de una serie de extractos y fracciones de ajo:

<i>Ajo crudo</i>	<i>Ajo congelado</i>
RG EXT	FG EXT
RG Hp 20-W	FG Hp 20-W
RG Hp 20-20	FG Hp 20-20
RG Hp 20-100	FG Hp 20-100

- **RG, FG:** Obtenidas a partir de ajo crudo (**RG**) o congelado (**FG**) según el esquema mostrado en la Figura 16.
- **Hp 20:** Columna de Diaon Hp 20
- **-W, -20 y -100:** Fracción acuosa (**W**), metanólica al **20%** y metanólica al **100%**

Los principales constituyentes de estos extractos y fracciones son los siguientes:

1.- Hp 20-20: Azúcares y aminoácidos, además de otros constituyentes minoritarios no claros.

2.- Hp 20-100: Saponinas esteroideas y otros glicósidos.

3.- Hp 20-W: Componentes acuosos, como por ejemplo aminoácidos y péptidos incluyendo aminoácidos azufrados (*S*-alilcisteína, γ -glutamyl-*S*-alilcisteína), azúcares como fructosa, sucrosa y fructosa.

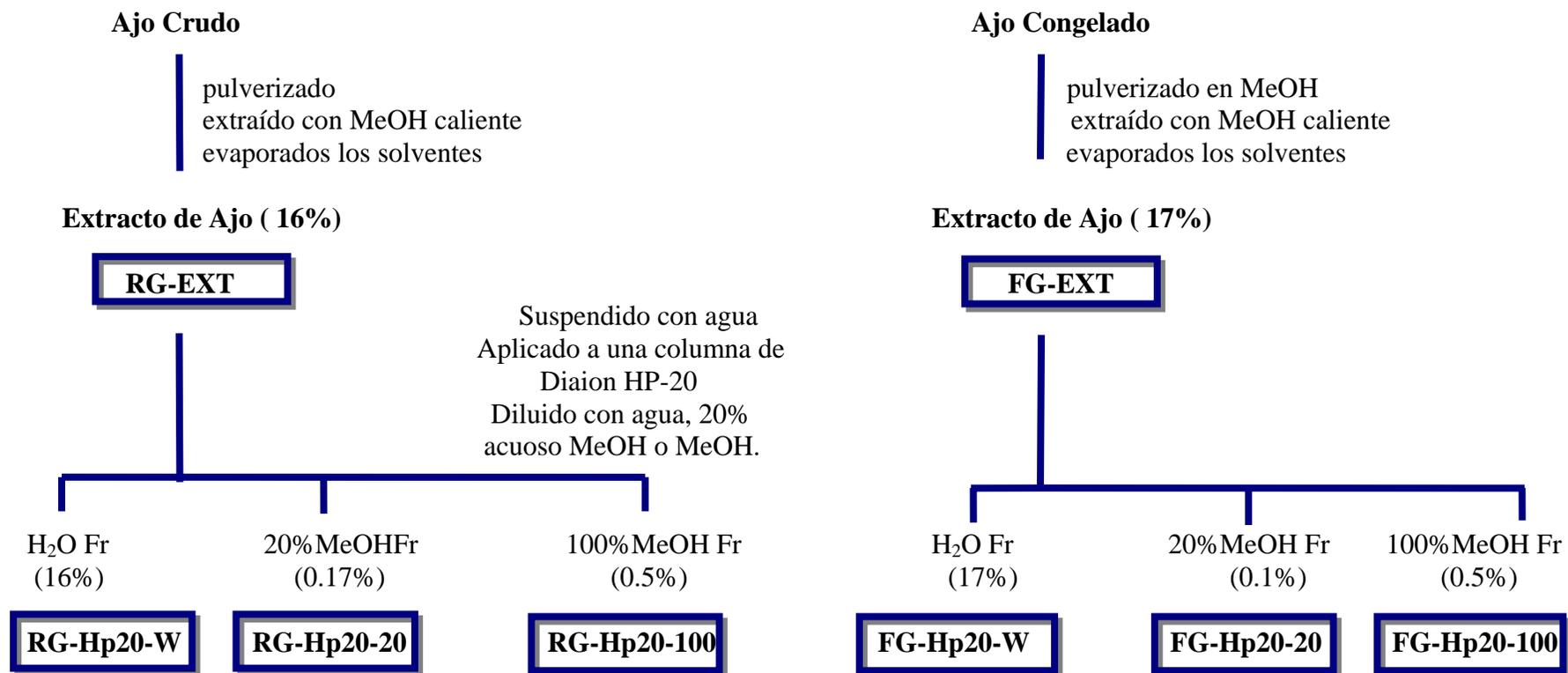


Figura 16.- Esquema de extracción de los distintos extractos y fracciones de ajo a partir de ajo crudo (RG) o congelado (FG) usando una columna de Diaion HP-20 y diluidos con agua (W), 20% de metanol (MeOH) (20-20) o metanol al 100% (20-100).

I.- ESTUDIO CRÓNICO *EX VIVO* : EFECTO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL DESARROLLO DE LA ATEROSCLEROSIS EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS.

I.1.- CONDICIONES GENERALES

Animales

Para la realización del estudio crónico utilizamos como animales de experimentación diez grupos (n=80) de ratas machos wistar de pesos comprendidos entre 200.0 ± 20.5 g (ANUC Universidad Complutense, Madrid). Los animales fueron mantenidos en una habitación acondicionada bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12h.

Dieta y tratamiento

Los animales se distribuyeron en 10 grupos de 8 ratas cada uno. El grupo control se mantuvo con una dieta estándar (grupo control normal). Al grupo 0 se le alimentó con una dieta estándar suplementada con 0.5% de colesterol (U.A.R., París, Francia) (grupo control hipercolesterolémico). Los grupos que recibieron una dieta hipercolesterolémica más los distintos extractos y fracciones de ajo se distribuyeron según el siguiente esquema mostrado en la Tabla 4:

Tabla 4

<i>¡Error! Marcador no</i>	<i>Grupo</i>	<i>Fracción/Ext</i>	<i>Dosis</i>
<i>Dieta estándar</i>	Grupo Control	-----	-----
<i>Grupo Hipercolesterolémico</i>	Grupo 0	-----	0.5% Colesterol
<i>Fracciones congeladas</i>	Grupo 1	FG-HP ₂₀₋₂₀	3mg/kg/día
	Grupo 2	FG-HP ₂₀₋₁₀₀	10mg/kg/día
	Grupo 3	FG-HP _{20-w}	300mg/kgdía
<i>Fracciones crudas</i>	Grupo 4	RG-HP ₂₀₋₂₀	3mg/kg/día
	Grupo 5	RG-HP ₂₀₋₁₀₀	10mg/kg/día
	Grupo 6	RG-HP _{20-w}	300mg/kg/día
<i>Extractos</i>	Grupo 7	RG-extracto	300mg/kg/día
	Grupo 8	FG-extracto	300mg/kg/día

Las dosis se ajustaron de manera que correspondieran con un consumo diario de 2 gramos de ajo crudo:

<i>Ajo crudo</i>	<i>1 g</i>	<i>2 g</i>	<i>5 g</i>
<i>FG(RG)-EXT</i>	0.17g(0.16g)	0.34g(0.32):0.3g	
<i>FG(RG)-HP_{20-w}</i>	0.17g(0.16g)	0.34g(0.32g):0.3g	
<i>FG(RG)-HP₂₀₋₂₀</i>	1mg(1.7mg)	2mg(3.4mg):3mg	
<i>FG(RG)-HP₂₀₋₁₀₀</i>	5mg(5mg)	10mg(10mg):10mg	25mg(25mg):25mg

El experimento duró 16 semanas. Todos los animales fueron inicialmente alimentados con una dieta estándar (Panlab S.L., Barcelona) durante al menos 7 días tras la llegada a nuestro laboratorio. El agua estaba disponible libremente. La ingesta de comida fue controlada diariamente tanto en los grupos control como en los tratados. Las diferentes dosis de los extractos y fracciones de ajo se administraron mediante sonda oral diariamente y se ajustaron semanalmente en función del peso de las ratas.

I.2.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

I.2.1.- MUESTRAS DE SANGRE

En los meses 1, 2, 3 y 4 de tratamiento se extrajeron muestras de sangre de todos los grupos. La extracción se realizó de la vena yugular tras anestesiarse ligeramente a los animales con éter etílico, obteniéndose aproximadamente 1-1,5 ml de sangre, que se recogieron en tubos “Vennoject” estériles que contenían EDTA (10^{-7} mol/L) como anticoagulante.

Para la obtención del plasma de las muestras, éstas se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C, utilizando una centrífuga Sorvall RC-5B. El plasma

así obtenido se alicuotó y se conservó a -80°C hasta el momento de realizar las distintas determinaciones.

1.2.2.- MUESTRAS DE ÓRGANOS Y ARTERIAS

Al término de la 16 semana, los animales fueron anestesiados con etil éter y sacrificados por exanguinación por corte de la carótida, procediéndose seguidamente a la extracción de los distintos vasos y órganos:

1.2.2.A.- Muestras de órganos.

Al final del tratamiento, el corazón, el hígado y los riñones de las ratas control y tratadas fueron aislados y se procedió a su extracción para ser pesados.

1.2.2.B.- Arteria aorta.

La técnica empleada para la obtención de la arteria aorta torácica consistió en la realización de una toracotomía media, separando los pulmones y el corazón para visualizar la arteria. Se procedió a la disección de la arteria aorta torácica descendente desde el cayado al diafragma, y se colocó en una placa Petri que contenía líquido nutricio Krebs-Henseleit de la siguiente composición (mmol/l): NaCl 122, KCl 4.7, NaHCO_3 15.5, MgSO_4 1.2, glucosa 11.5; KH_2PO_4 1.2 y CaCl_2 2.5, y burbujeadado con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2), donde se limpió cuidadosamente de grasa y adherencias. Posteriormente se seccionó en anillos de 3-5 mm de longitud. Los cayados fueron separados y fijados en formol al 10% para los estudios de las alteraciones morfológicas.

Por la luz de los anillos se introdujeron dos alambres finos y rígidos de acero inoxidable, uno de los cuales se fijó a la parte inferior del baño y el otro se situó paralelamente al anterior, uniéndose a un transductor de fuerza-desplazamiento, conectado a su vez a un polígrafo en el que se registraban los cambios de tensión condicionados por las contracciones isométricas desarrolladas por las arterias.

Después del montaje, estas preparaciones se introdujeron en copas de Allhin que contenían 10 ml de solución Krebs-Henseleit burbujeada con carbógeno. Estas copas poseen como característica principal una doble pared de vidrio que forma parte de un circuito cerrado por cuyo interior circula agua a una temperatura constante de 37 ± 0.5 °C en todo su recorrido, gracias a un dispositivo que actúa como bomba y termostato al mismo tiempo (Ultra Thermostat KS Colora). La oxigenación se logra mediante el burbujeo continuo de carbógeno en el seno del líquido nutritivo, a través de un dispositivo situado en la parte inferior de las copas. A su vez, las copas presentan en su parte inferior un sistema de aspiración que permite el lavado de las preparaciones (Figura 17).

Los anillos fueron sometidos a una tensión de 1 gramo, y se mantuvieron durante un período de estabilización de 90 minutos antes del inicio de los experimentos (Tejerina y cols., 1988), renovándose el líquido nutritivo cada 20 minutos y reajustándose la tensión hasta la obtención de un nivel estable.

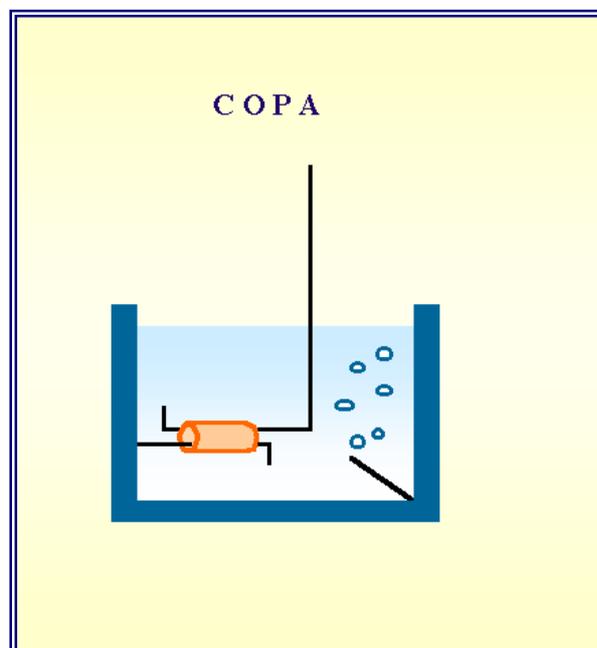


Figura 17.- Esquema de una copa Allhin.

I.2.3.- SISTEMAS DE REGISTRO

Los aparatos utilizados para la transducción y registro de la tensión en los anillos de aorta fueron los siguientes:

- Polígrafo Grass modelo 7 de cuatro canales, a través de transductores fuerza-desplazamiento, Grass FT0-3.
- Polígrafo Omni Scribe D5000 de dos canales, a través de transductores fuerza-desplazamiento, Panlab UF-1.
- Convertidor MacLab A/D (Chart v3.5, A.D Instruments Pty. Ltd., Castle Hill, Australia) conectado a un ordenador Macintosh (Ruiz y Tejerina, 1998).

I.3.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

I.3.1.- DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.

Los niveles plasmáticos de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) se determinaron al principio del tratamiento y posteriormente una vez al mes, tanto en los grupos control como en los grupos tratados con los distintos extractos y fracciones de ajo, por reacción colorimétrica y utilizando un kit enzimático comercial (BioMerieux, Marcy, Francia).

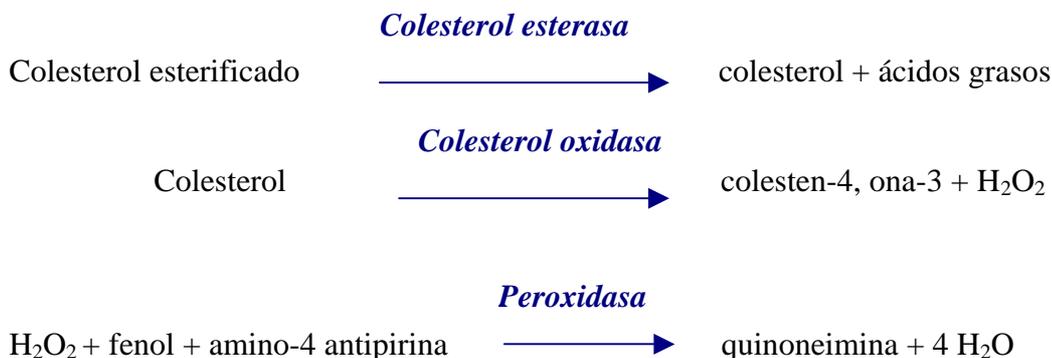
I.3.1.A.- Determinación de la concentración de colesterol total plasmático.

La cuantificación del colesterol total en plasma de rata se realizó usando dos reactivos con la siguiente composición:

Reactivo 1 (tampón): Tampón fosfato0.1 mol/l
Fenol15 mmol/l
Colato sódico3.74 mmol/l
Agente tensoactivo

Reactivo 2 (enzimas): Amino-4-antipirina...0.5 mmol/l
Peroxidasa≥ 1000 U/l
Colesterol oxidasa.....≥ 200 U/l
Colesterol esterasa.....≥ 125 U/l

La determinación se basa en la hidrólisis de los ésteres de colesterol por acción de la colesterol esterasa. El colesterol libre producido es oxidado por la colesterol oxidasa a colestén-4, α -3 con liberación de H_2O_2 que se acopla posteriormente con amino-4-antipirina y fenol dando lugar a la formación de un compuesto coloreado que se detecta por espectrofotometría como un aumento en la absorción a 500nm (Henry y cols., 1974).



I.3.1.B.- Determinación de la concentración plasmática de LDL.

La cuantificación de LDL colesterol en plasma de rata se realizó utilizando tres reactivos con la siguiente composición:

<u>Reactivo 1:</u>	Surfactante aniónico policíclico.....0.4 g/l
<i>(Reactivo precipitante de las LDL)</i>	Surfactante aniónico policíclico policondensado0.8 g/l
	Dioxano polisustituído12.4 mmol/l
<u>Reactivo 2:</u>	Citrato trisódico0.15 mol/l
<i>(Reactivo solubilizante de las LDL)</i>	Cloruro sódico0.11 mol/l
<u>Reactivo 3:</u>	Colesterol libre + esterificado.....1 mmol/l
<i>(Calibración LDL colesterol)</i>	

La determinación consiste en conseguir en primer lugar la precipitación específica de las lipoproteínas LDL y su separación por ultracentrifugación. Tras ser solubilizadas se lleva a cabo la misma reacción de coloración que en el caso del colesterol total.

I.3.1.C.- Determinación de la concentración plasmática de HDL.

La determinación cuantitativa de HDL colesterol en plasma de rata se realizó utilizando dos reactivos con la siguiente composición:

<u>Reactivo 1:</u>	Ácido fosfotúngstico40 g/l
<i>(Reactivo precipitante)</i>	MgCl ₂ 6 H ₂ O100 g/l
	pH 6.2
<u>Reactivo 2:</u>	Colesterol libre + esterificado.....1.3 mmol/l
<i>(Calibración HDL colesterol)</i>	

Los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) contenidos en la muestra precipitan al añadir ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación contiene las lipoproteínas de alta densidad (HDL) cuyo colesterol se determina de igual forma que en el caso de la determinación del colesterol total plasmático.

1.3.2.- DETERMINACIÓN DEL PESO CORPORAL Y DE LOS ÓRGANOS.

A lo largo del tratamiento, se determinó el peso corporal de cada rata con el fin de ajustar las dosis de ajo administrada, y una vez sacrificados los animales fueron pesados el corazón, el hígado y los riñones de las ratas control y de las tratadas.

El peso de los distintos órganos se expresó como la relación entre el peso del órgano aislado y el peso total de la rata.

1.3.3.- ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LAS MUESTRAS DE AORTA.

Los cayados que habían sido fijados en formol al 10% se lavaron con agua durante 48 horas y posteriormente se tiñeron con tetróxido de osmio (Saso y cols., 1992) al 1% en solución saturada de bicloruro de mercurio durante 24 horas. Posteriormente se lavaron con agua durante 12 horas y a continuación fueron sumergidas en etanol absoluto durante 2 horas y nuevamente fueron lavadas con agua. El método de la tinción con osmio fue seleccionado por ser una técnica específica para la detección de lípidos (McManus y Mowry, 1968). La superficie macroscópica interior de los cayados se fotografió empleando un esteromicroscopio Wild M3Z. Las fotografías así obtenidas fueron morfológicamente analizadas utilizando un planímetro semicuantitativo CUE2. En todas las muestras se determinó el % de superficie total cubierta por lesiones ateroscleróticas.

I.3.4.- REACTIVIDAD VASCULAR EN ARTERIA AORTA

I.3.4.A.- Efecto del ajo sobre la contracción inducida por potasio y noradrenalina.

Tras el período de estabilización, los anillos fueron sometidos a una concentración única submáxima de KCl (80mM) y NA (10^{-6} M). Las concentraciones submáximas eran elegidas a partir de experimentos preliminares con el fin de producir respuestas contráctiles aproximadamente equipotentes.

I.3.4.B.- Efecto del ajo sobre la relajación endotelio dependiente y endotelio independiente

Las arterias procedentes tanto del grupo control como de los tratados, fueron contraídas, tras la estabilización de la tensión, con concentraciones submáximas de NA (10^{-6} M). Tras alcanzar en la respuesta contráctil una meseta estable se realizaron curvas concentración respuesta a acetilcolina (ACh) (relajación endotelio-dependiente) o a nitroprusiato sódico (NPS) (relajación endotelio-independiente). Para ello se añadieron concentraciones acumulativas y crecientes (10^{-8} M- 10^{-5} M) de ACh ó NPS.

II.- ESTUDIO *IN VITRO* : ESTUDIO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL MÚSCULO LISO VASCULAR

II.1.- OBTENCIÓN Y MONTAJE DE LOS ÓRGANOS

Para realizar este estudio utilizamos como animales de experimentación ratas machos wistar de pesos comprendidos entre 250.0 ± 20.5 g (ANUC Universidad Complutense, Madrid). Los animales fueron anestesiados con etil éter y sacrificados por exanguinación por corte de la carótida, procediéndose seguidamente a la extracción y montaje de los órganos.

II.1.1.- ARTERIA AORTA

La aorta se extrajo y se montó de igual forma que la indicada en el caso del estudio crónico *ex vivo* (Figura 17).

II.1.2.- ARTERIA MESENTÉRICA

La obtención de la arteria mesentérica se realizó mediante una laparotomía media, dejando al descubierto el paquete intestinal, procediéndose a la disección de la membrana mesentérica pegada a la pared del intestino, correspondiente a los 5-6 cm de la porción distal del intestino delgado próximo al ciego. Seguidamente se colocaba en una placa de Petri con solución PSS de la siguiente composición (mM): NaCl 140, KCl 4.6, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.5, glucosa 10 y HEPES 5, previamente burbujeada con oxígeno (5% CO₂ + 95% O₂ para mantener el pH a 7.4) a 37 ± 0.5 °C. Dentro de la placa y bajo una lupa binocular se aislaba la cuarta rama de la arteria mesentérica superior (150-200 μ m de diámetro interior) procediéndose a limpiarla cuidadosamente de grasas y adherencias. Después de limpiar la arteria, se seccionaba, aislándose segmentos cilíndricos de 2 mm de longitud, procediéndose al montaje de la arteria (Mulvany y Halpern 1977). Se introducían a través del anillo arterial dos hilos de tungsteno de 40 μ m, que permitían la fijación de la preparación al baño. Este sistema estaba conectado a

un transductor y este a su vez a un registro en el que se registraban los cambios de tensión. Las preparaciones obtenidas se sometieron a la tensión que permitía obtener un diámetro de 0.9 veces el diámetro del vaso a una presión transmural de 100 mmHg (Mulvany y Halpern, 1977) y se dejaban estabilizar durante 30 min, en una solución PSS previamente burbujeada con oxígeno y mantenida a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Durante este período se realizaban lavados de la preparación a intervalos de 10 min, reajustándose la tensión hasta la obtención de un nivel estable (Figura 18).

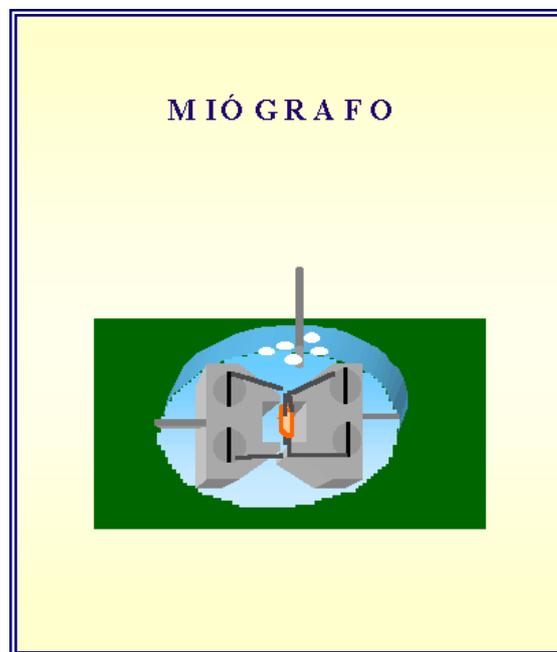


Figura 18.- Esquema de un miógrafo

II.1.3.- SISTEMAS DE REGISTRO

Los aparatos utilizados para la transducción y registro de la tensión en los anillos de aorta fueron los mismos empleados en el estudio crónico.

En el caso de la arteria mesentérica, se usó como aparato de montaje y registro:

- Muti Myograph system-610M conectado a un ordenador PC con programas Myodaq Acquisition y Myodata Analysis (Danish Myo Technology).

II.2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

II.2.1.- ARTERIA AORTA

II.2.1.A.- Basales

En un primer grupo de experimentos se ensayó el efecto los extractos y fracciones estudiados sobre la tensión basal en arterias aorta. Para ello, tras la estabilización de la tensión durante el tiempo correspondiente, se añadió a la preparación cantidades progresivamente crecientes y acumulativas de los distintos extractos y fracciones de ajo estudiados (30µg/ml-750µg/ml). Las diferentes concentraciones utilizadas se eligieron basándonos en un estudio similar realizado por Fallon y cols. en 1998 y tras realizar también nuestro grupo ensayos previos con amplios márgenes de dosis. Para permitir que cada dosis ejerciera su efecto máximo se dejaba actuar durante 15 minutos antes de añadir la concentración inmediatamente superior. De manera paralela se estudió el efecto producido por el vehículo (DMSO) en el caso de las fracciones 20-100.

II.2.1.B.- Relajación de la contracción inducida por NA y KCl.

En otro grupo de experimentos, la arteria aorta se contrajo con una concentración submáxima de NA (10^{-6} M) ó KCl (80mM). Una vez alcanzada una respuesta contráctil estable, se añadieron concentraciones progresivamente crecientes y acumulativas de los distintos extractos y fracciones de ajo estudiados (30µg/ml-750µg/ml) y se dejaba actuar durante 15 minutos antes de añadir la concentración inmediatamente superior. Así mismo, se estudió la relajación de la contracción producida por el vehículo (DMSO) en el caso de las fracciones 20-100.

II.2.1.C.- Inhibición de la contracción producida por NA y KCl.

Tras el periodo de estabilización, las arterias se sometieron a la acción de una concentración única de NA (10^{-6} M) o KCl (80mM). Estas respuestas control fueron obtenidas tras 30 minutos de contracción con ambos agentes vasoconstrictores. A continuación el vasoconstrictor se eliminaba del baño mediante sucesivos lavados con solución Krebs-Henseleit, y tras 30 minutos de lavado, se añadía al medio la dosis deseada de los diferentes extractos de ajo o vehículo, y se dejaba actuar durante 15 minutos. A continuación se añadía nuevamente el agente vasoconstrictor, y así sucesivamente se repitió este protocolo experimental con las diferentes dosis de extracto (30 μ g/ml-750 μ g/ml).

Las respuestas contráctiles máximas obtenidas a los 30 minutos con los agonistas NA y KCl en presencia de las distintas concentraciones de extracto, se porcentuaron respecto a la máxima contracción obtenida con los agonistas en ausencia de los extractos de ajo.

A la vista de los resultados obtenidos, que se detallarán más adelante, decidimos estudiar con mayor detalle la fracción **RG 20-100**, y su posible mecanismo de acción en arteria aorta:

II.2.1.D.- Efecto de la incubación con L-NAME o Indometacina sobre la relajación de la contracción inducida por NA producida por RG 20-100

Con el fin de estudiar si la relajación de la contracción inducida por NA que producía RG 20-100 era debida a la acción del óxido nítrico y/o de las prostaglandinas procedimos a inhibir su síntesis, con L-NAME (inhibidor de la NO sintasa), y con Indometacina (inhibidor de la síntesis de prostaglandinas). Para ello, se realizó una primera curva de relajación con ACh (10^{-8} - 10^{-5}) con el fin de comprobar la existencia de endotelio intacto, a continuación, se lavaron las preparaciones y tras 30 minutos se incubaron con una dosis de L-NAME de 3×10^{-4} M o de Indometacina 10^{-6} M durante 20 minutos más. Seguidamente se contrajeron las

arterias con NA 10^{-6} M y tras alcanzar una meseta estable, se añadieron concentraciones crecientes de RG 20-100 (30 μ g/ml-750 μ g/ml).

II.2.1.E.- Relajación de la contracción inducida por NA en arterias sin endotelio con RG 20-100.

Para corroborar el posible mecanismo de acción independiente de endotelio, se procedió a denudar el endotelio siguiendo la técnica de Furchgott y Zawadzki (1980), y a continuación se contrajeron las arterias con NA 10^{-6} M, se añadieron concentraciones progresivamente crecientes y acumulativas de los distintos extractos y fracciones de ajo estudiados (30 μ g/ml-750 μ g/ml) y se procedió del mismo modo que en el apartado II.2.1.B.

II.2.1.F.- Efecto de RG 20-100 sobre la curva de NPS

Para estudiar más extensamente la acción de RG 20-100 sobre el músculo liso vascular, procedimos a estudiar la acción que producía esta fracción (dosis: 100 y 300 μ g/ml) sobre la relajación de la contracción producida por NPS (donador de NO, independiente de endotelio). Para ello, contrajimos las arterias, tras el periodo de estabilización, con NA 10^{-6} M, a continuación se relajaron con dosis crecientes de NPS (10^{-8} M- 10^{-4} M). Este protocolo se repitió a continuación habiendo incubado previamente las arterias durante 15 minutos con las diferentes dosis de RG 20-100. Asimismo, se realizaron controles con el vehículo (DMSO) usando dosis equivalentes a las utilizadas al diluir la fracción de ajo.

II.2.1.G.- Efecto de RG 20-100 sobre las contracciones inducidas por Ca^{2+} en aorta previamente despolarizada

En este grupo de experimentos los anillos de aorta de rata se estabilizaron durante 2 h en solución nutritiva carente de Ca^{2+} [Krebs 0Ca + EGTA(10^{-5} M)]. Durante estas 2 h se lavaron las arterias con esta solución cada 20 min. Al cabo de este tiempo, se añadió al baño KCl 80 mM con el fin de despolarizar la membrana

celular y producir la apertura de canales de Ca^{2+} . Tras alcanzar la máxima contracción, la concentración extracelular de Ca^{2+} se aumentó de forma progresiva desde 1 mM hasta 5 mM, (Tejerina y cols., 1988; Chuliá y cols., 1995). Este procedimiento permitía obtener una curva dosis-respuesta al Ca^{2+} . Una vez obtenida la curva control, las preparaciones se lavaban con solución Krebs 0Ca durante 1 h cambiando el medio cada 20 minutos, a continuación se añadió al baño la fracción RG 20-100 en tres concentraciones distintas (100, 300 y 500 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaba durante 15 min., al cabo de los cuales se repitió la curva anteriormente descrita. De esta manera, se observaba el efecto de la fracción sobre la entrada de Ca^{2+} extracelular.

Asimismo para comprobar que el Ca^{2+} había sido eliminado correctamente del medio, en otro grupo paralelo de arterias control se realizó una contracción con KCl 80 mM en medio Krebs normal con el fin de comparar la respuesta a este agente vasoconstrictor en un medio carente de Ca^{2+} .

Los resultados se expresaron como porcentaje de la contracción control máxima inducida por Ca^{2+} 5 mM.

II.2.1.H.- Efecto de RG 20-100 sobre la movilización de Ca^{2+} intracelular.

Para comprobar si esta fracción producía también un efecto sobre el calcio del retículo sarcoplásmico, realizamos un grupo de experimentos descritos previamente por Hester y cols. en 1987. Para ello, en una primera parte del experimento, los anillos de aorta se contrajeron con NA (10^{-6} M) en medio Krebs normal para obtener una contracción control en la que estuviera implicado tanto el calcio extracelular como el del retículo sarcoplásmico; a continuación se lavaron las preparaciones durante 1 hora con medio Krebs 0Ca con EGTA (10^{-5} M) retirando así el agente vasoconstrictor. Con este medio exento de calcio observaríamos la implicación del calcio únicamente intracelular al contraer nuevamente con NA (10^{-6} M). Tras otro lavado de las preparaciones se volvió a inducir una nueva contracción con (10^{-6} M),

que sería mucho menor al encontrarse los depósitos de calcio intracelular prácticamente vacíos.

En una segunda parte del experimento, se repitió el protocolo pero esta vez los anillos se incubaban en el primer lavado con Krebs 0Ca, con la dosis correspondiente de RG 20-100 (100, 300 y 500 $\mu\text{g/ml}$) durante los últimos 15 min.

II.2.2.- ARTERIA MESENTÉRICA

II.2.2.A.- Basales

En un primer grupo de experimentos se ensayó el efecto de los extractos y fracciones estudiados sobre la tensión basal en arteria mesentérica. Para ello, tras la estabilización de la tensión durante el tiempo correspondiente, se añadió a la preparación cantidades progresivamente crecientes y acumulativas de los distintos extractos y fracciones de ajo estudiados (30 $\mu\text{g/ml}$ -750 $\mu\text{g/ml}$) dejando actuar a cada una durante un periodo de 15 min. De manera paralela se estudió el efecto producido por el vehículo (DMSO) en el caso de las fracciones 20-100.

II.2.2.B.- Relajación de la contracción inducida por NA y KCl.

De igual manera que en la aorta, la arteria mesentérica se contrajo con una concentración submáxima de NA (10^{-5}M) ó KCl (80mM). Una vez alcanzada una respuesta contráctil estable, se añadieron concentraciones progresivamente crecientes y acumulativas de los distintos extractos de ajo estudiados o del vehículo (30 $\mu\text{g/ml}$ -750 $\mu\text{g/ml}$). Para permitir que cada dosis ejerciera su efecto máximo se dejaba actuar durante 15 minutos antes de añadir la concentración inmediatamente superior.

II.2.2.C.- Inhibición de la contracción producida por NA y KCl.

Se repitió el mismo protocolo experimental que en la arteria aorta excepto la concentración de NA utilizada que fue 10^{-5}M .

Las respuestas contráctiles máximas obtenidas a los 30 minutos en presencia de las distintas concentraciones de extracto se porcentuaron respecto a la máxima contracción obtenida en ausencia del mismo.

III.- CULTIVOS CELULARES: EFECTO DE RG 20-100 SOBRE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA DE RATA.

III.1.- OBTENCIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA.

Las células fueron aisladas de las aortas de ratas normales wistar de pesos comprendidos entre 200.0±20.5g (ANUC Universidad Complutense, Madrid) por medio de digestión enzimática usando un medio con colagenasa (Leduc y Meloche, 1995).

Tras extraer la aorta, se introdujo en un medio de la siguiente composición: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-glutamax) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibiótico-antimicótico (ATB) al 2%. A continuación se limpió de grasa y coágulos, se quitó la capa adventicia para eliminar los fibroblastos y la capa endotelial raspando el interior. Esto se llevó a cabo en una campana de flujo laminar vertical previamente esterilizada. Las células se obtuvieron por digestión enzimática usando un medio estéril conteniendo: DMEM-glutamax suplementado con albúmina bovina 0.1-0.2%, ATB 2% y colagenasa 4.5mg/ml. Las células musculares obtenidas una vez lavadas del medio con colagenasa, fueron cultivadas en DMEM-glutamax suplementado con 10% de FBS y ATB al 1%, se emplearon los pasajes comprendidos entre el 4-8. Se mantuvieron en una estufa acondicionada con un 5% de CO₂ y a 37°C.

III.2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

III.2.1.- PROLIFERACIÓN CELULAR.

Se sembraron 1000 células/pocillo en placas estériles de 96 pocillos con un volumen final de 100µl de medio DMEM al 10% de FBS y 1% ATB por pocillo, en una atmósfera humidificada a 37°C y CO₂ al 5%. Tras 24 h de incubación necesarias para permitir que las células se pegaran, se cambió el medio de cultivo por el mismo medio al que se le añadió distintas concentraciones de ajo (30µg/ml–1µg/ml)

previamente filtrado por un filtro de 0,22 μ , o bien por medio sólo al 10%FBS + vehículo (DMSO) usado como control. Asimismo se mantuvo un número de células sin estímulo proliferativo usando un medio DMEM con 0.4% de FBS + 1% ATB usándolas como control. Las concentraciones de ajo fueron elegidas basándonos en estudios anteriores con extractos similares (Geng y Lau., 1997) y previo ensayo con un amplio margen de dosis eligiendo aquellas que no resultaban claramente tóxicas para el desarrollo celular.

A los 3, 5 y 8 días de tratamiento, el experimento se reveló usando 50 μ l del reactivo XTT por pocillo (concentración final de 0.3 mg/ml), incubando durante 4 h en estufa. El principio de la reacción se basa en la escisión de la sal amarilla de tetrazolio (XTT) para formar un tinte naranja de formazan, escisión que sólo ocurre debido a las células metabólicamente activas. El tinte de formazan formado es soluble en solución acuosa y fue directamente cuantificado con un lector de ELISA a una longitud de onda entre 450-500 nm. Los resultados se expresaron en función de la absorbancia producida por cada dosis de ajo a esa longitud de onda.

Asimismo realizamos la medida de la absorbancia de las células pegadas a las 24 horas de su siembra (día 1).

III.2.2.- TOXICIDAD CELULAR: LDH

Para la determinación de la toxicidad producida por RG 20-100 sobre las células musculares lisas, se midió el enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH es un enzima que se localiza en el citosol y cataliza la transformación de lactato a piruvato, con la consiguiente generación de NADH. Cuando existe una lisis celular, la LDH va a ser liberada al medio extracelular, siendo éste un parámetro que informa de la cuantía del daño celular producido.

La medida de la actividad de la LDH se basa en la disminución de la absorbancia de NADH a 340 nm, utilizando piruvato como sustrato de la reacción. El enzima presente en la muestra estudiada cataliza la reducción del piruvato a lactato,

con la consiguiente oxidación de NADH a NAD⁺, que se mide por absorbancia a 340 nm, típica del NADH (Young Koh y Choi, 1987). La desaparición de NADH se midió durante 2,5 min. a intervalos de 15 seg.



Para el estudio experimental se sembraron 40000 células por pocillo en placas de 12 pocillos, son un volumen final de 800 µl de DMEM-glutamax, 10% FBS y 1% ATB. Al cabo de 24 h, necesarias para que las células se peguen, se procedió de la siguiente manera:

- En una placa, tras lavar las células con PBS, se cambió el medio de todos los pocillos por medio DMEM-glutamax con 1% ATB y 2% suero de caballo (Sigma) ya que el medio FBS al 10% o al 2%, interfería con la lectura de LDH. En parte de los pocillos se añadió RG 20-100 (30µg/ml-1µg/ml) (previamente filtrado) dejando pocillos control que contenían sólo el medio anteriormente descrito más el vehículo (DMSO). El sobrenadante de estos pocillos (100 µl), transcurridos los tiempos establecidos (24, 48 y 72 h), se traspasó a una placa de 96 pocillos para la determinación en un lector de ELISA a 340 nm de la LDH, para ello, se añadió a cada muestra ácido pirúvico (0.2 mg/ml) disuelto en bufer fosfato a pH 7.5 y NADH (0.5 mg/ml). Cada dosis se midió por cuadruplicado. El lector de ELISA estaba conectado a un ordenador PC y al programa Softmax para el registro de los datos obtenidos.
- Una vez recogido el sobrenadante necesario para la medición de LDH, se congelaron y descongelaron rápidamente las células de la placa de 12 pocillos, con el fin de producir una lisis total de las mismas, y medir la cantidad total de LDH en este tipo de células.

- Asimismo, otra placa de 12 pocillos fue usada como control sin células para comprobar que ni el medio de cultivo ni la fracción de ajo en las distintas dosis usadas interferían con la lectura de LDH.

III.2.3.- CICLO CELULAR Y SÍNTESIS DE DNA.

Las células fueron tripsinizadas usando tripsina-EDTA y sembradas en botellas F-75 en una densidad de 300.000 células/botella. Tras alcanzar aproximadamente un 95% de confluencia, se procedió a sincronizarlas en la misma fase del ciclo celular. Para ello, se ayunaron usando un medio DMEM con un 0.4% FBS y ATB al 1% durante 48-52 horas. Una vez quiescentes, se estimularon las células incubando durante 18 h más de la siguiente manera:

- Control normal estimulado: con medio conteniendo 10% FBS y 1% ATB + vehículo (DMSO).
- Control sin anticuerpo: conteniendo 10% FBS y 1% ATB + vehículo (DMSO). A estas células no se les añadiría posteriormente en el revelado el anticuerpo IgG.
- Control no estimulado: 0.4% FBS y 1% ATB + vehículo (DMSO). De esta manera comprobaríamos si las células habían sido correctamente sincronizadas en la misma fase del ciclo celular.
- Células tratadas con RG 20-100: 10% FBS y 1% ATB + RG 20-100 (30µg/ml y 10µg/ml)(previamente filtrado).

Durante las dos últimas horas de estímulo se agregó al medio bromodeoxiuridina (BrdU)(Amersham), un análogo de la timina, que se incorpora al DNA de la célula en una concentración final de 3µl/ml. Al finalizar el estímulo las células se levantaron con tripsina y se fijaron con etanol al 70% y paraformaldehído

al 0.25%. Una vez lavadas con PBS, las células se incubaron con RNAasa (0.5 mg/ml) durante 15 min a 37°C, con el fin de destruir el RNA para que no interfiriera posteriormente, a continuación después de lavarlas, se añadió HCl 0.1M para desnaturalizar el DNA, se lavaron con PBS y al pellet se le añadió agua miliQ y se sometieron a baño María durante 5 min con el fin de desnaturalizar aún más el DNA, se sumergieron las muestras en una mezcla de agua-hielo (previene la renaturalización del DNA), y una vez frías se añadió 5 ml del buffer SSC para hacer las membranas porosas, a continuación y tras centrifugar, se procedió a la determinación inmunocitoquímica añadiendo un anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Amersham) durante 1 h. Finalmente, las células se incubaron con un anti-mouse IgG FITC (isotiocianato de fluoresceína)(Sigma) durante 20 min, excepto en el control sin anticuerpo, tras los cuales se añadió SSC para lavar las células y el pellet se resuspendió en yoduro de propidio (IP) al 0.05% en PBS. El análisis por citometría de flujo se realizó con un citómetro de flujo FACScan (Benton-Dickinson) flow cytometer equipado con un láser de argón de 15mW emitiendo a 488nm.

Para estudiar la proporción de células en las distintas fases del ciclo celular, se midió el contenido de DNA (células marcadas con IP, fluorescencia roja) en las fases G_0/G_1 , S (síntesis) y G_2/M . Para estudiar la síntesis de DNA, se midieron las células marcadas con el fluorocromo FITC (fluorescencia verde) en cada fase del ciclo celular. La fluorescencia del PI se seleccionará mediante un filtro de 600 nm LP. Asimismo, se usó un filtro de 514 nm BP para la fluorescencia verde. Se medían 10000 células por muestra y un módulo discriminador doble se usó para detectar sólo células individuales (Gratzner y cols., 1975; Dolbeare y cols., 1983; Dolbeare y cols., 1985).

IV.- FÁRMACOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS.

IV.1.- LÍQUIDOS NUTRICIOS.

Solución Krebs-Henseleit

La composición de la solución de Krebs utilizada como líquido nutricional en los experimentos fue (mM):

NaCl	118
KCl	4.7
CaCl ₂	2.0
KH ₂ PO ₄	1.2
MgSO ₄	1.2
NaHCO ₃	15.5
Glucosa	11.5

Agua desionizada y destilada para completar 1000 ml.

Solución Krebs-Henseleit 0 Ca (mM)

NaCl	118
KCl	4.7
KH ₂ PO ₄	1.2
MgSO ₄	1.2
NaHCO ₃	15.5
Glucosa	11.5

Agua desionizada y destilada para completar 1000 ml.

Solución PSS (mM):

NaCl	139
KCl	5
MgCl ₂	0.98

CaCl₂1.15

Glucosa 9

Hepes5

Agua desionizada y destilada para completar 1000 ml. El pH era ajustado a 7.35.

Buffer fosfato PBS (10x) (gr)

NaCl80

KCl2

Na₂HPO₄-2H₂O18.05

KH₂PO₄2.4

Na₂EDTA37.4

Agua desionizada y destilada hasta 1000 ml. El pH se ajustó a 7.4. La dilución usada en los experimentos fue 1x, que se obtuvo diluyendo la 10x 10 veces.

SSC

PBS + 0.5% Tween 20

IV.2.- REACTIVOS QUÍMICOS UTILIZADOS.

Reactividad vascular

En nuestros experimentos hemos usado los siguientes reactivos:

- Bitartrato de noradrenalina (NA) (Sigma)
- Cloruro de potasio (KCl) (Merck)
- Acetilcolina (Ach) (Sigma)
- Nitroprusiato sódico (NPS) (Sigma)
- Nw-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- Cloruro cálcico (Ca²⁺)(Merck)

- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma)

Las soluciones madre de NA, NPS, Ach, L-NAME y Cloruro cálcico se prepararon diariamente en agua desionizada y destilada, se mantuvieron en hielo durante el experimento y se protegieron de la luz. Con el fin de prevenir la oxidación, se añadió ácido ascórbico (10^{-4} M) a las soluciones madre de NA. La solución madre de Indometacina (10^{-2} M) se disolvió usando DMSO, pero usando finalmente en el baño la concentración de 10^{-6} M, conteniendo así una concentración mínima de DMSO.

Cultivos celulares

- Medio de Cultivo
 - Dulbecco's MEM with Glutamax-I (DMEM-Glutamax) (Gibco BRL)
 - Suero fetal bovino (FBS) (Gibco BRL)
 - Suero de caballo (Sigma)
 - Antibiótico-Antimicótico (ATB): Penicilina G, Sulfato de estreptomicina, anfotericina B. (Gibco BRL)
- Tripsina-EDTA (1x) (Gibco BRL)
- Proliferación celular:
 - Reactivo XTT (Roche Diagnostics)
- LDH
 - Ácido pirúvico (Sigma)
 - NADH (Sigma)
- Ciclo celular
 - 5' bromo 2 deoxiuridina (BrdU) (Amersham)
 - Anti-5' bromo 2 deoxiuridina (Anti BrdU) (Amersham)
 - Antimouse IgG FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Sigma)
 - Paraformaldehído (Merck)
 - Rnasa T₁ (Boehringer Mannheim)
 - Ácido clorhídrico (Merck)
 - Ioduro de propidio (IP) (Sigma)

IV.3.- EXTRACTOS Y FRACCIONES DE AJO.

Para obtener las distintas dosis de los extractos y fracciones de ajo utilizadas en el estudio, se disolvieron de la siguiente manera:

- Estudio Crónico: - RG/FG 20-20; RG/FG 20-100; RG/FG 20-W;
RG/FG EXT: en agua desionizada y destilada.

- Estudio Agudo: - RG/FG 20-20: en solución Krebs-Henseleit.
-RG/FG 20-100: se disolvió en la cantidad mínima de DMSO y se completó con solución Krebs-Henseleit
- RG/FG EXT: en solución Krebs-Henseleit.

Las diluciones se sometían a agitación constante hasta su total disolución. Se mantenían en nevera (estudio crónico) o en hielo (estudio agudo) y protegidas de la luz. En el caso de las fracciones 20-100 usadas en el estudio crónico, al no poder usar DMSO por ser tóxico para los animales, se obtuvo una suspensión y no una disolución. Al realizar los experimentos en medio Krebs 0Ca del estudio agudo, la fracción RG 20-100 se disolvió con Krebs 0Ca+DMSO.

V.- ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los datos experimentales han sido expresados como la media \pm error estándar de la misma ($\bar{x} \pm E.S.M.$) para un determinado número (n) de experimentos. La comparación de las medias se realizó utilizando un test ANOVA de dos vías para la comparación de gráficas de líneas y de una vía para gráficas de barras, considerándose significativas aquellas diferencias en las que $p < 0.05$. Los cálculos se realizaron empleando el programa Statgraphics Plus para Windows versión 4.0.

RESULTADOS

I.- ESTUDIO CRÓNICO EX VIVO: EFECTO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL DESARROLLO DE LA ATEROSCLEROSIS EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS.

I.1.- DETERMINACIÓN DEL PESO CORPORAL.

El protocolo experimental se llevó a cabo con 8 ratas en cada grupo. Las dietas fueron bien aceptadas y durante el período experimental no se observaron diferencias significativas entre los pesos corporales de las ratas pertenecientes a los distintos grupos (Figura 19).

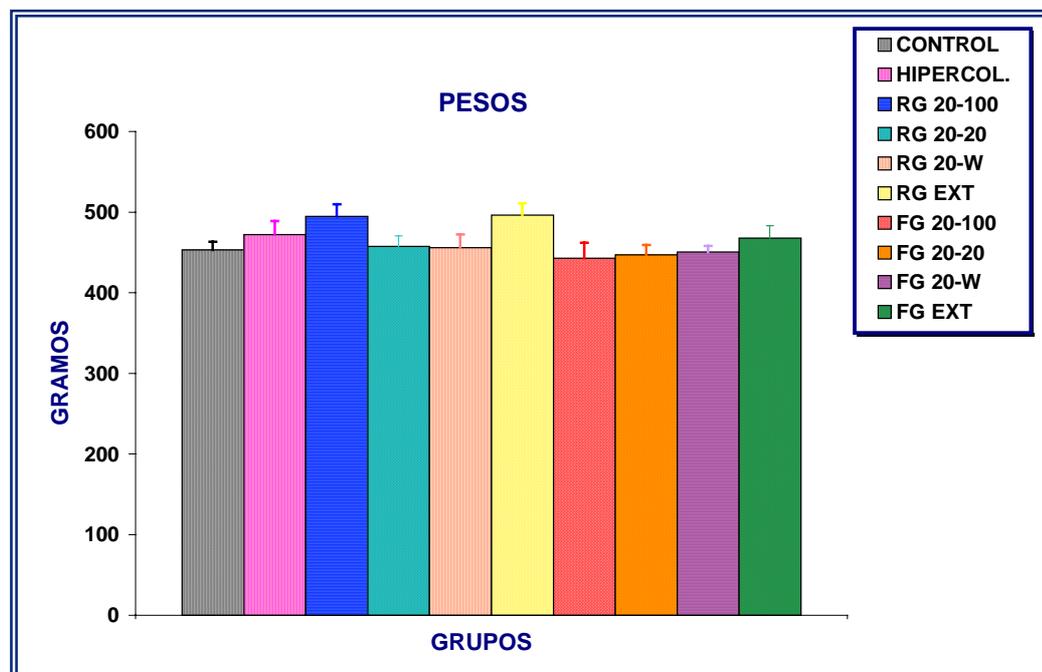


Figura 19.- Peso corporal de las ratas de los distintos grupos al final del tratamiento. Cada barra representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

I.2.- DETERMINACIÓN DEL PESO DE DISTINTOS ÓRGANOS

Tras ser sacrificados los animales en el 4º mes de tratamiento, fueron extraídos el corazón, hígado y riñones para después ser pesados. No se observaron diferencias significativas en el peso del corazón entre los distintos grupos (Figura 20), sin embargo, el peso de los riñones y el hígado fue significativamente mayor en los grupos tratados con colesterol ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente) (Figura 21). Todos los extractos y fracciones de ajo fueron capaces de evitar este aumento del tamaño del hígado ($p < 0.001$ con RG 20-100, RG 20-20, RG EXT y FG 20-W) ($p < 0.01$ con FG 20-100, FG 20-20, FG EXT y RG 20-W). El aumento del peso del riñón sólo se previno con RG 20-100 y RG EXT ($p < 0.05$).

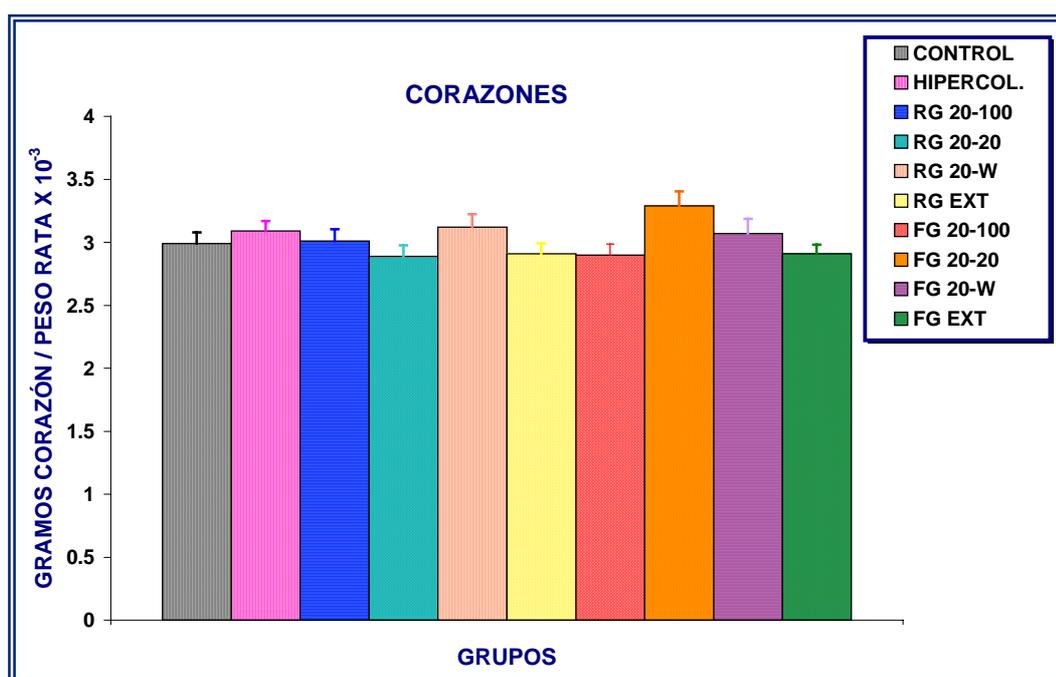


Figura 20.- Relación Peso órgano/Peso corporal de las ratas de los distintos grupos al final del tratamiento. Cada barra representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

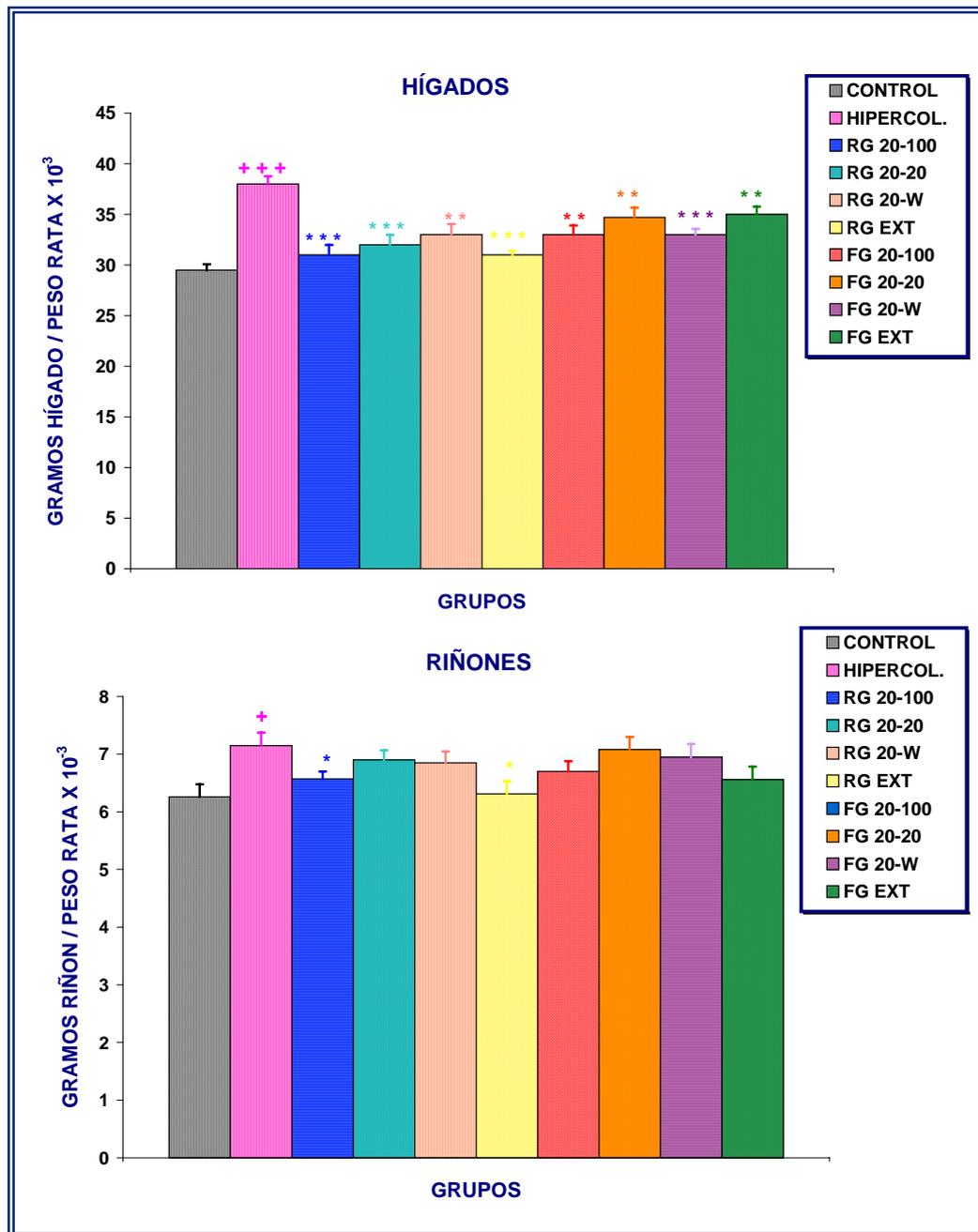


Figura 21.- Relación Peso órgano/Peso corporal de las ratas de los distintos grupos al final del tratamiento. + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$ vs control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs hipercolesterolémico. Cada barra representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

I.3.- DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

I.3.1.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL TOTAL PLASMÁTICO

Al principio del estudio la concentración de colesterol total plasmático de las ratas wistar de 200.0±20.5g usadas en el estudio, fue de alrededor de 69.8 ± 0.7 mg/dl, y no se produjeron diferencias significativas entre el grupo control y el alimentado con una dieta rica en colesterol a lo largo de los 3 primeros meses de tratamiento; sólo al llegar al 4º mes se produjo un incremento de la concentración plasmática de colesterol en el grupo hipercolesterolémico respecto al control (66.5 ± 4.4 mg/dl, 102.1 ± 12.2 mg/dl en el grupo control e hipercolesterolémico respectivamente).

Asimismo, al cuarto mes de tratamiento, en los grupos alimentados con los extractos y fracciones de ajo, se produjo una disminución del colesterol total, obteniendo valores de 58.8 ± 4.6 mg/dl (RG 20-20), 67.3 ± 6.6 mg/dl (RG 20-100), 71.1 ± 3.1 mg/dl (RG EXT), 74.5 ± 4.4 mg/dl (FG 20-100), 75.6 ± 4.4 mg/dl (FG 20-W), 77.7 ± 2.3 mg/dl (FG 20-20), 81.8 ± 6.2 mg/dl (RG 20-W) y 88.5 ± 6.8 mg/dl (RG EXT). Podemos resumir en una tabla la evolución del colesterol total a lo largo de los 4 meses (Tabla 5):

<i>Grupo</i>	<i>0 meses</i>	<i>1 mes</i>	<i>2 meses</i>	<i>3 meses</i>	<i>4 meses</i>
<i>Control</i>	72.8±4.5	64.4±3.2	65.6±2.3	66.5±3.1	66.5±4.4
<i>Hipercol.</i>	71.4±3.2	58.1±2.8	67.0±2.2	62.8±1.9	102.1±12.2
<i>RG 20-100</i>	68.5±3.1	67.5±4.2	74.7±5.2	81.7±7.6	67.3±6.6
<i>RG 20-20</i>	66.1±2.5	49.9±3.1	59.9±2.2	71.9±3.8	58.8±4.6
<i>RG 20-W</i>	70.4±1.3	68.1±5.3	81.7±5.5	78.8±1.4	81.8±6.2
<i>RG EXT</i>	67.4±4.0	72.2±4.6	58.1±2.1	56.2±3.8	71.1±3.1
<i>FG 20-100</i>	69.5±2.1	56.1±3.3	55.4±2.1	56.7±3.9	74.5±4.4
<i>FG 20-20</i>	71.8±3.0	59.1±1.5	67.9±3.7	65.4±2.4	77.7±2.3
<i>FG 20-W</i>	68.2±2.9	63.7±1.7	57.5±3.5	65.3±4.1	75.6±4.4
<i>FG EXT</i>	72.0±3.0	73.7±3.3	93.1±7.3	86.3±3.7	88.5±6.8

Tabla 5.- Concentraciones plasmáticas de colesterol total expresadas en mg/dl a largo de los 4 meses de evolución del tratamiento, en el grupo control no tratado, el grupo hipercolesterolémico (0.5% colesterol) y los grupos tratados con una dieta hipercolesterolémica más los distintos extractos y fracciones de ajo.

Podemos representar también para mayor claridad, las diferentes concentraciones de colesterol plasmático al final de los cuatro meses de tratamiento, expresando los valores en porcentajes (consideramos el grupo control como el 100%) (Figura 22):

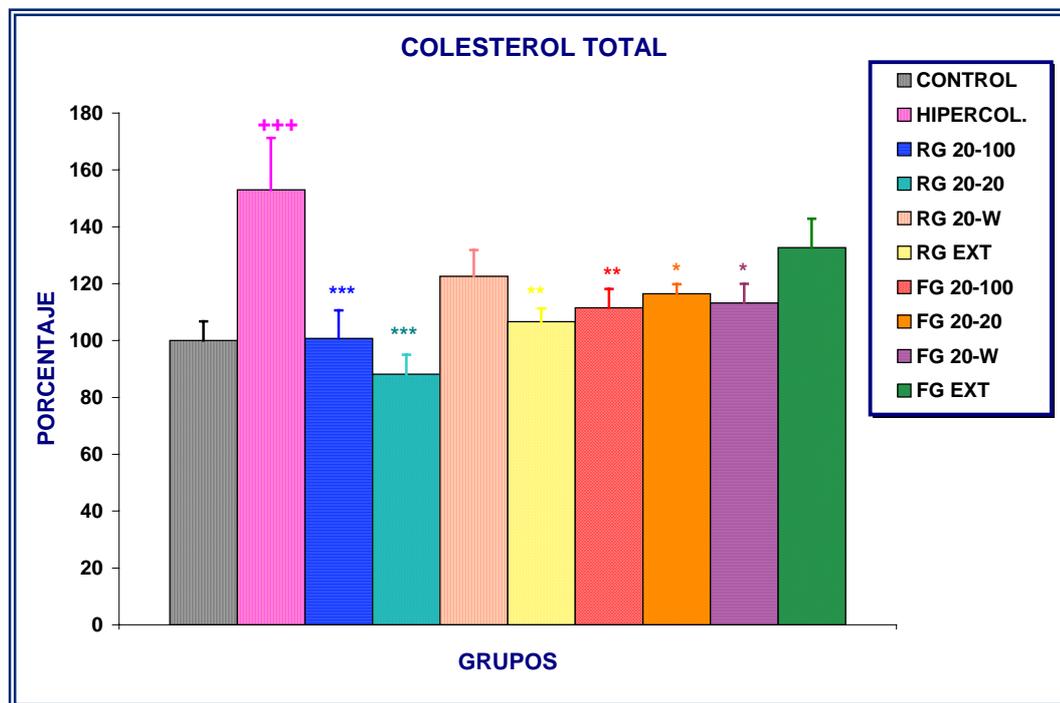


Figura 22.- Comparación del colesterol total entre los grupos control, hipercolesterolémico y los grupos tratados con ajo al final del tratamiento (4^o mes). +++ $p < 0.001$ vs control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs hipercolesterolémico. Cada barra representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

I.3.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HDL.

La evolución de las HDL siguió el siguiente esquema expresado en la Tabla 6 a lo largo de los cuatro meses de tratamiento:

<i>Grupo</i>	<i>0 meses</i>	<i>1 mes</i>	<i>2 meses</i>	<i>3 meses</i>	<i>4 meses</i>
<i>Control</i>	36.3±3.8	35.8±2.0	36.7±2.4	33.4±3.4	31.0±2.8
<i>Hipercol.</i>	38.5±2.3	26.2±1.3	37.2±3.8	33.2±2.7	42.0±1.9
<i>RG 20-100</i>	41.7±3.5	38.1±3.6	31.3±1.9	41.7±4.1	41.9±5.2
<i>RG 20-20</i>	42.9±2.2	30.6±1.3	47.4±1.2	31.2±2.1	45.3±1.4
<i>RG 20-W</i>	36.8±1.4	29.4±2.8	40.1±2.2	36.5±3.2	32.5±1.9
<i>RG EXT</i>	40.2±3.0	37.0±3.3	32.6±1.3	27.8±1.4	27.8±1.9
<i>FG 20-100</i>	39.6±2.1	32.6±2.0	35.8±1.0	40.1±2.4	42.9±2.6
<i>FG 20-20</i>	33.5±3.3	24.6±1.6	37.1±2.3	28.5±2.0	34.9±1.3
<i>FG 20-W</i>	37.5±1.5	31.0±1.2	29.4±2.1	30.1±2.8	35.6±2.3
<i>FG EXT</i>	40.3±2.0	38.5±4.9	45.6±3.1	55.1±2.9	40.6±2.3

Tabla 6.- Concentraciones plasmáticas de HDL expresadas en mg/dl a largo de los 4 meses de evolución del tratamiento, en el grupo control no tratado, el grupo hipercolesterolémico (0.5% colesterol) y los grupos tratados con una dieta hipercolesterolémica más los distintos extractos y fracciones de ajo.

Puesto que la variación en la concentración de HDL está en función de la variación en la concentración de colesterol total que se haya producido en cada grupo, representamos gráficamente los valores de HDL teniendo en cuenta el colesterol total, (Figura 23):

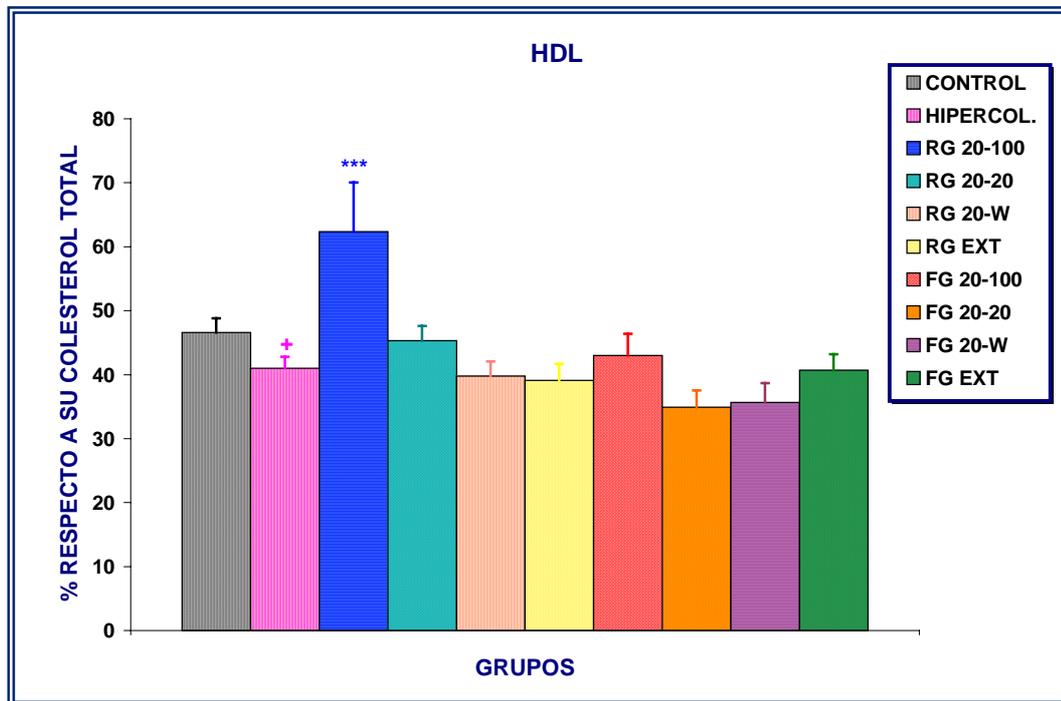


Figura 23.- Comparación de la concentración plasmática de HDL entre el grupo control, hipercolesterolémico y los grupos tratados con ajo, teniendo en cuenta el colesterol total, al cuarto mes de tratamiento. + $p < 0.05$ vs control, *** $p < 0.001$ vs hipercolesterolémico. Cada barra representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

De este modo, pudimos observar la disminución de HDL en el grupo hipercolesterolémico respecto al control ($46.6 \pm 2.2\%$, $41.0 \pm 1.8\%$ en el grupo control e hipercolesterolémico respectivamente), y el aumento significativo que se producía al tratar las ratas con RG 20-100 ($62.3 \pm 7.7\%$) al final de los cuatro meses de tratamiento. Con el resto de los grupos tratados con ajo no se previno esta disminución de HDL provocada por la dieta hipercolesterolémica.

1.3.3.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LDL.

Al medir la concentración plasmática de LDL durante la evolución del tratamiento (4 meses), obtuvimos los siguientes resultados reflejados en la Tabla 7:

<i>Grupo</i>	<i>0 meses</i>	<i>1 mes</i>	<i>2 meses</i>	<i>3 meses</i>	<i>4 meses</i>
<i>Control</i>	11.0±1.3	10.4±1.2	12.6±0.9	11.7±0.8	13.6±1.0
<i>Hipercol.</i>	12.3±1.1	19.0±1.4	12.9±1.2	17.7±0.7	28.5±1.9
<i>RG 20-100</i>	9.4±0.8	6.8±0.6	16.5±1.1	16.7±1.7	16.9±1.1
<i>RG 20-20</i>	12.1±1.0	9.1±0.1	7.9±0.8	10.9±1.7	17.0±1.1
<i>RG 20-W</i>	12.2±1.1	14.5±1.6	11.8±1.0	11.3±1.2	13.4±1.5
<i>RG EXT</i>	10.1±1.3	11.7±1.1	16.5±1.3	10.6±0.8	16.5±1.3
<i>FG 20-100</i>	10.8±2.0	11.1±1.4	6.2±0.4	4.8±0.3	12.2±1.0
<i>FG 20-20</i>	12.2±1.5	14.2±0.7	8.9±1.5	15.3±1.0	16.4±1.8
<i>FG 20-W</i>	11.2±1.1	13.7±0.6	11.3±1.4	8.1±1.1	15.6±1.5
<i>FG EXT</i>	10.4±1.4	13.0±0.9	8.5±0.8	11.0±1.0	16.3±2.1

Tabla 7.- Concentraciones plasmáticas de LDL expresadas en mg/dl a largo de los 4 meses de evolución del tratamiento, en el grupo control no tratado, el grupo hipercolesterolémico (0.5% colesterol) y los grupos tratados con una dieta hipercolesterolémica más los distintos extractos y fracciones de ajo.

Al igual que en el caso de las HDL, para poder comparar la variación de las LDL de cada grupo en función del colesterol total presente en los mismos, expresamos los resultados de LDL como porcentaje del colesterol total (Figura 24):

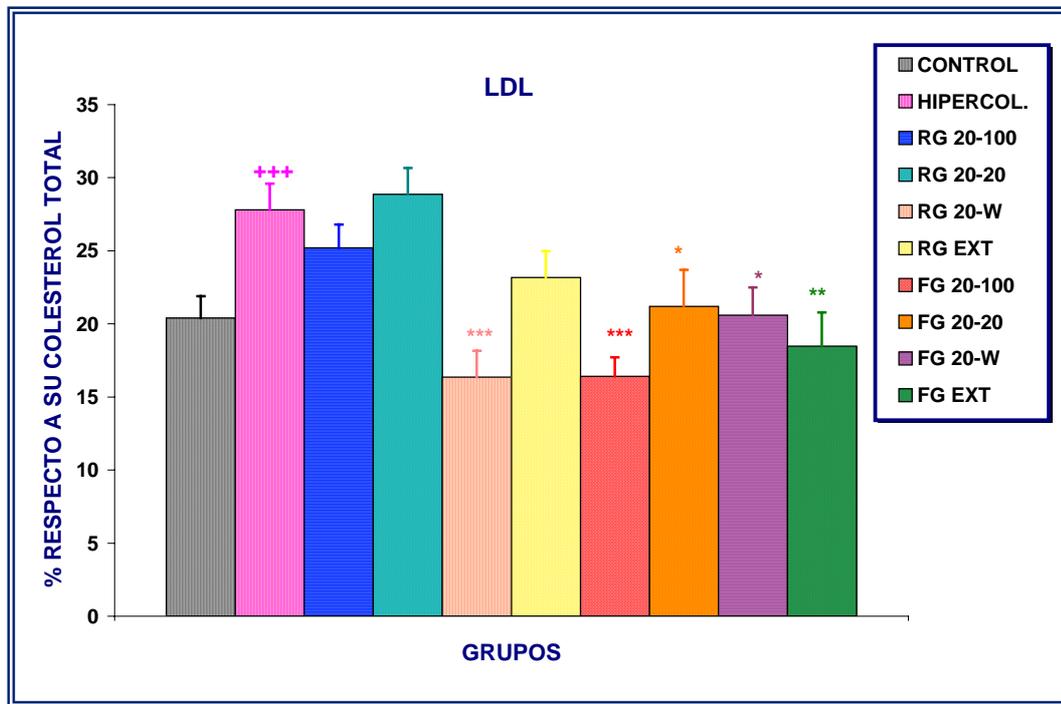


Figura 24.- Concentración plasmática de LDL en ratas control normal, en ratas control hipercolesterolémicas y en ratas tratadas con ajo, teniendo en cuenta el colesterol total, al cuarto mes de tratamiento. +++ $p < 0.001$ vs control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs hipercolesterolémico. Cada barra representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

La Figura 24 muestra el porcentaje de LDL respecto al colesterol total al final del tratamiento. Se observó un gran aumento de las LDL en las ratas alimentadas con la dieta rica en colesterol ($27.8 \pm 1.8\%$) respecto al grupo control normal (20.4 ± 1.5) ($p < 0.001$). Los siguientes grupos tratados con ajo previnieron de manera significativa el aumento de LDL: RG 20-W ($16.3 \pm 1.8\%$), FG 20-100 ($16.4 \pm 1.3\%$), FG EXT ($18.4 \pm 2.3\%$), FG 20-W ($20.6 \pm 1.9\%$) y FG 20-20 (21.2 ± 2.5).

I.4.- EFECTO SOBRE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA.

Al estudiar las alteraciones morfológicas de la aorta que se presentan en la aterosclerosis, observamos que la administración de los diferentes extractos y fracciones de ajo producía una disminución de la extensión de lesiones ateroscleróticas con todos los grupos estudiados. Comparamos en cada grupo el área total (mm^2) de cayado aórtico estudiado, respecto a la superficie cubierta con placa (mm^2) (Figura 25).

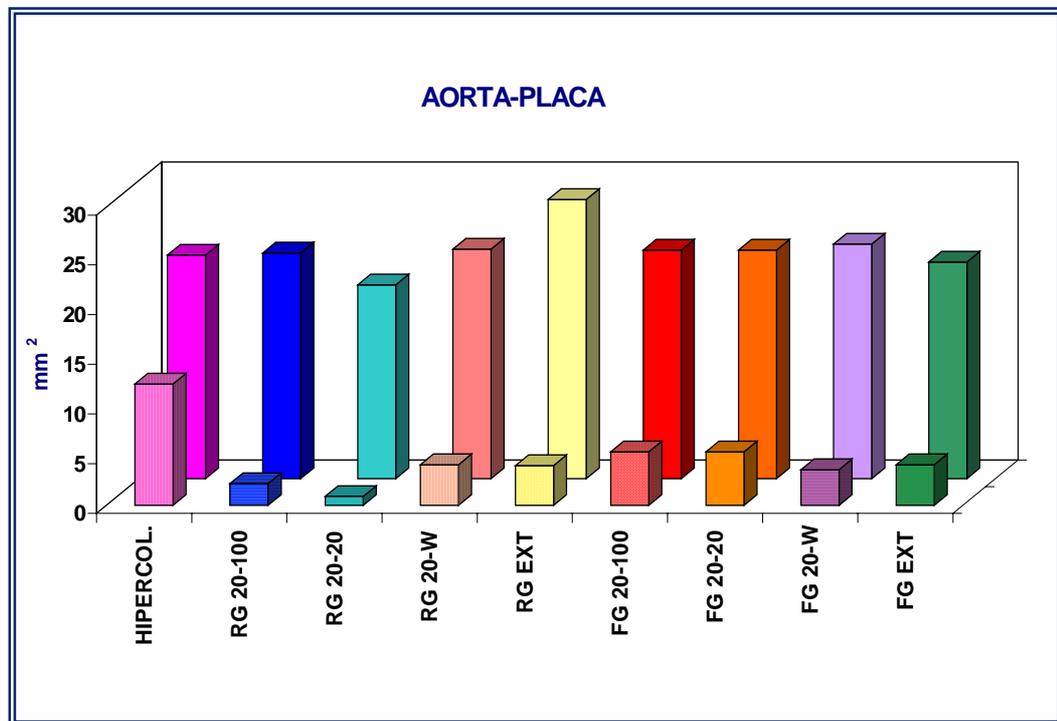


Figura 25.- Comparación entre la superficie total de cayado aórtico (barras del fondo) y la placa aterosclerótica (barras delanteras) en cada grupo estudiado. Cada barra representa la media de cada grupo ($n = 8$).

Si expresamos esto en porcentajes (% cubierto de placa respecto a la superficie total de aorta para cada grupo) obtenemos la Figura 26. Podemos así observar la disminución significativa de placa en todos los grupos tratados con ajo frente al grupo hipercolesterolémico (54.0%, 9.09%, 3.58%, 18.3%, 14.1%, 22.6%, 23.3%, 14.9%, 19.7% de placa en los grupos hipercolesterolémico, RG 20-100, RG 20-20, RG 20-W, RG EXT, FG 20-100, FG 20-20, FG 20-W y FG EXT respectivamente).

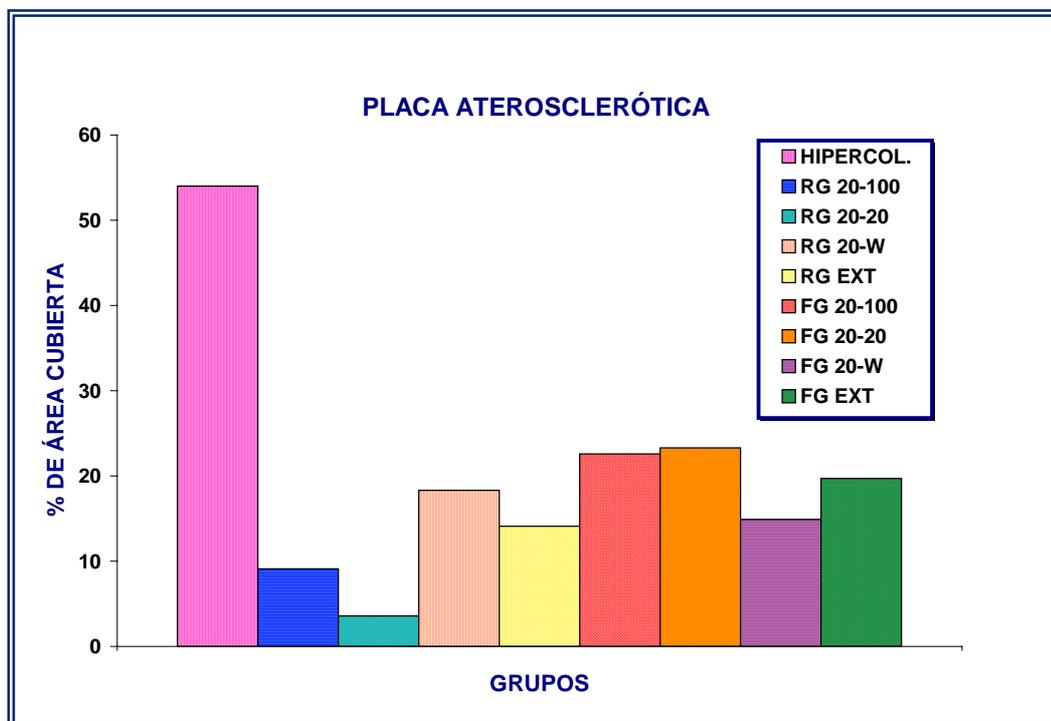


Figura 26.- Porcentaje de cayado aórtico lesionado en los grupos de ratas control hipercolesterolémicas e hipercolesterolémicas tratadas con ajo, respecto al área aórtica total estudiada.. Cada barra representa la media de cada grupo (n =8).

Las siguientes fotografías (Figuras 27 y 28) muestran en cada grupo, la superficie cubierta por placa aterosclerótica:

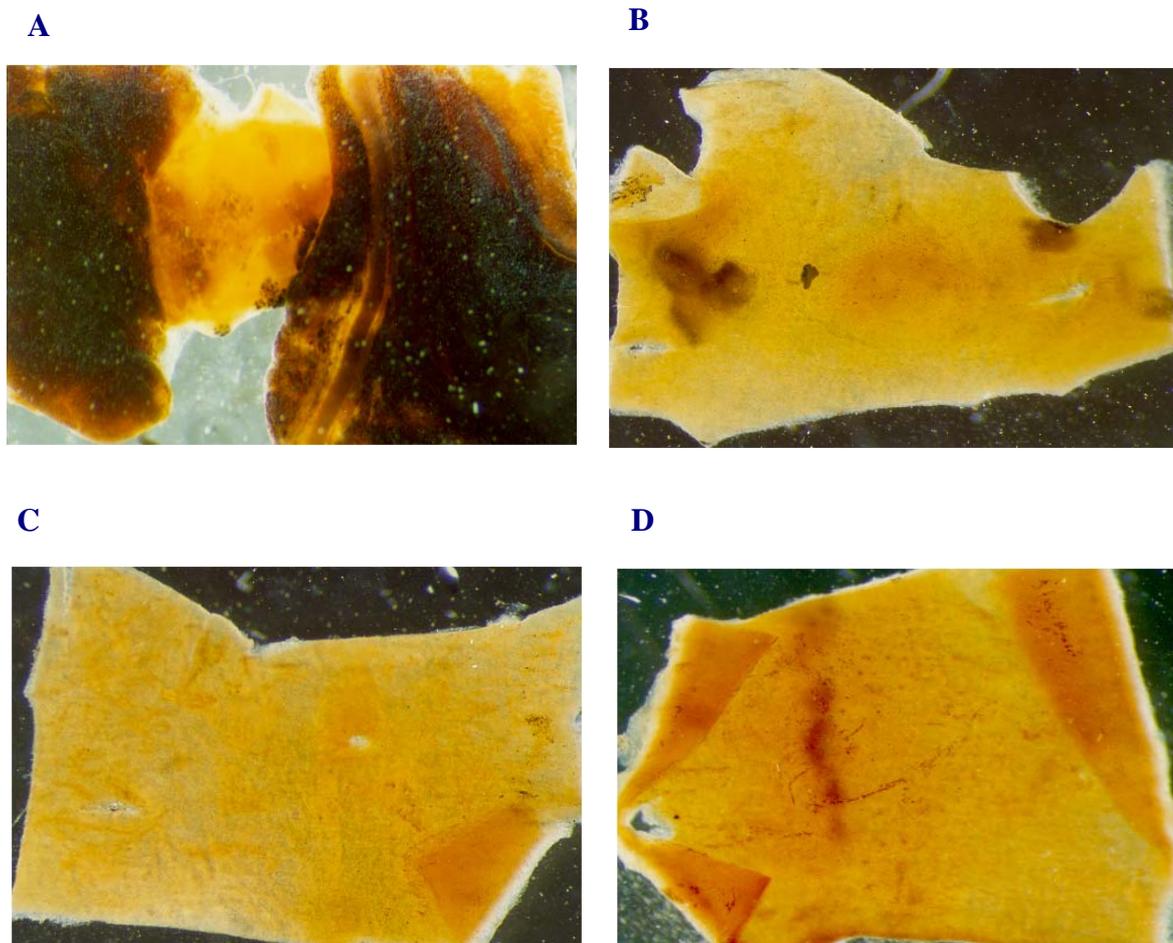


Figura 27.- Superficie aórtica cubierta por placa aterosclerótica en los grupos hipercolesterolémico (A), RG 20-100 (B), RG 20-20 (C) y RG 20-W (D).

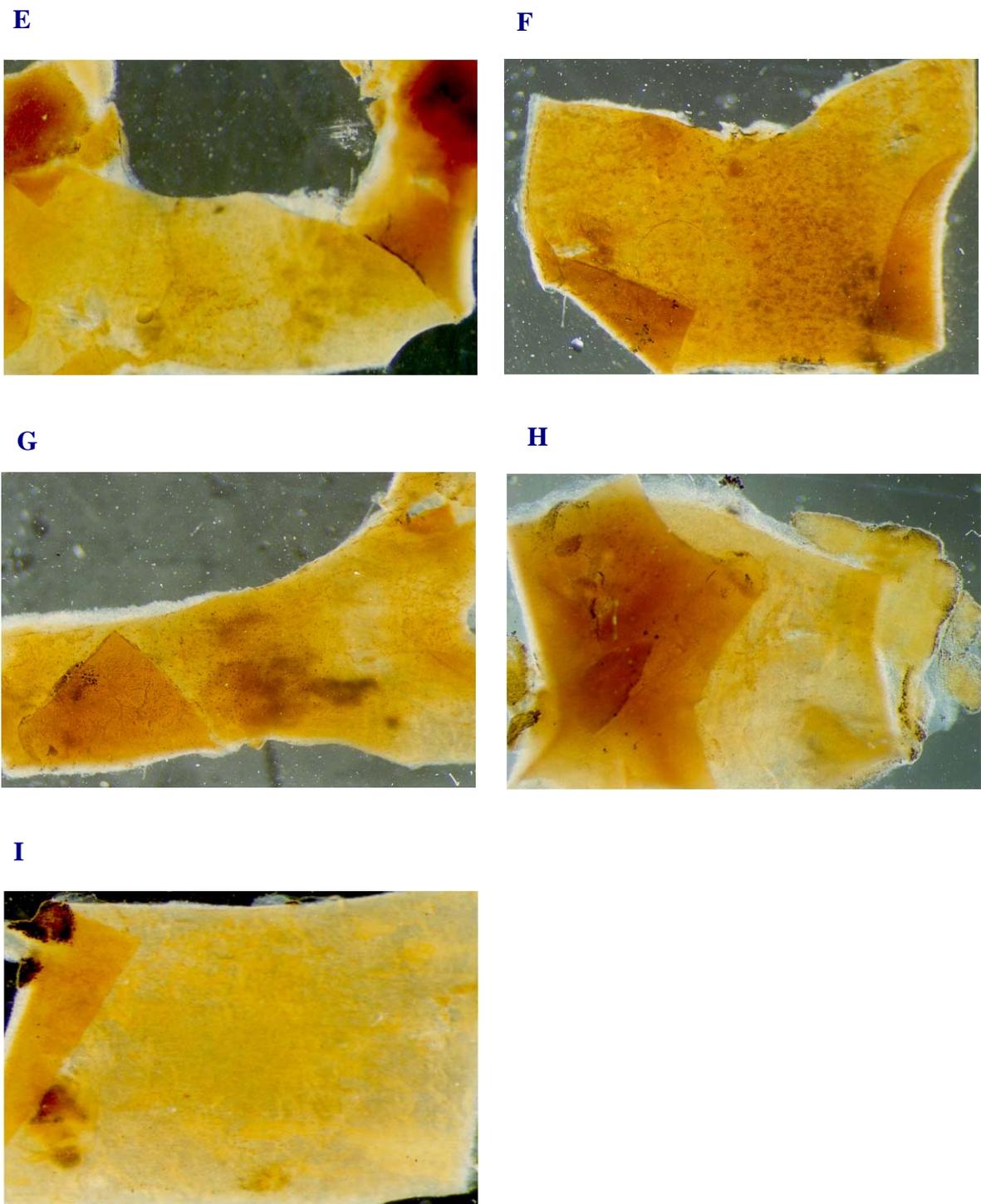


Figura 28.- Superficie aórtica cubierta por placa aterosclerótica en los grupos RG EXT (**E**), FG 20-100 (**F**), FG 20-20 (**G**), FG 20-W (**H**) y FG EXT (**I**).

I.5.- REACTIVIDAD VASCULAR

I.5.1.- ARTERIA AORTA

I.5.1.A.- Efecto sobre las contracciones inducidas por NA

Cuando las arterias fueron contraídas con NA $10^{-6}M$, se observó un aumento significativo ($p<0.05$) de la contractilidad en el grupo hipercolesterolémico con respecto al grupo control ($1.28 \pm 0.08g$ vs $0.96 \pm 0.09g$). En los grupos tratados con ajo, esta contracción fue incluso mayor, excepto en el grupo tratado con RG 20-W con el que disminuyó significativamente dicha hiperreactividad obteniéndose contracciones semejantes a las conseguidas en el grupo control ($1.10 \pm 0.10g$) (Figura 29).

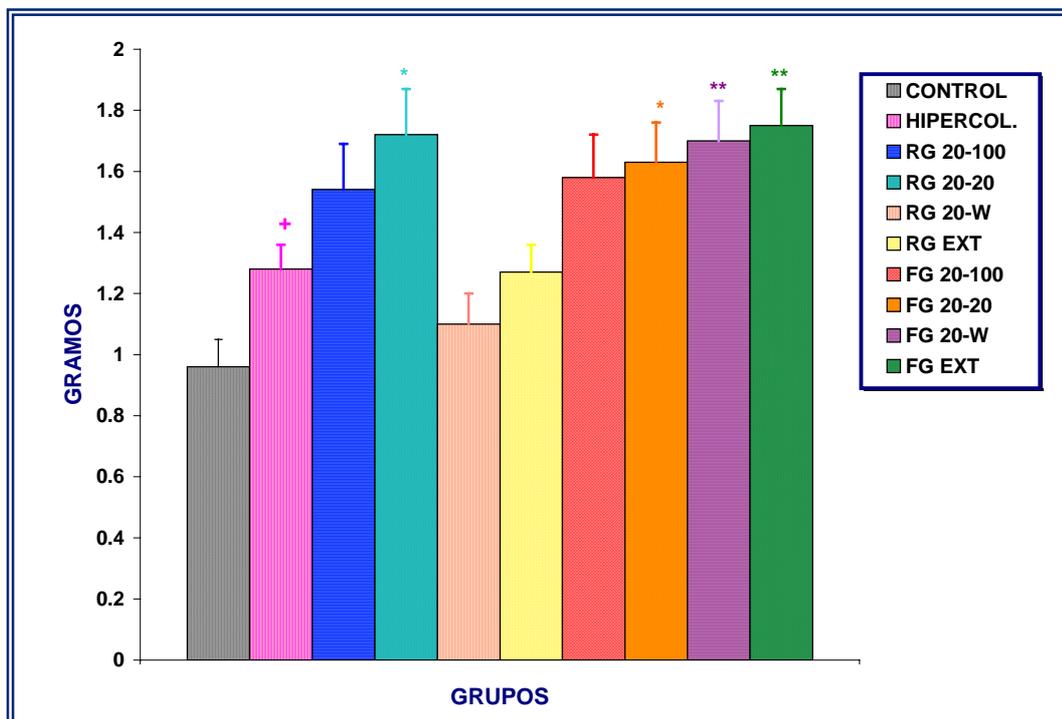


Figura 29.- Contracciones inducidas por NA $10^{-6}M$ en arteria aorta de ratas control normal, control hipercolesterolémicas e hipercolesterolémicas tratadas con ajo crudo (RG) o ajo congelado (FG). + $p<0.05$ vs control; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs hipercolesterolémico. Cada barra representa la media \pm ESM de cada grupo ($n=8$).

I.5.1.B.- Efecto sobre las contracciones inducidas por KCl

Al finalizar el cuarto mes de tratamiento, se contrajeron las arterias con KCl 80mM obteniéndose los siguientes resultados: el grupo hipercolesterolémico presentó una disminución de la contractilidad respecto al control ($2.53 \pm 0.13\text{g}$ vs $1.49 \pm 0.10\text{g}$ en el grupo control e hipercolesterolémico respectivamente). Sólo en los grupos tratados con RG 20-20, RG EXT y FG EXT la contractilidad tendió hacia el control ($2.10 \pm 0.10\text{g}$, $2.90 \pm 0.10\text{g}$ y $2.35 \pm 0.09\text{g}$ respectivamente) (Figura 30).

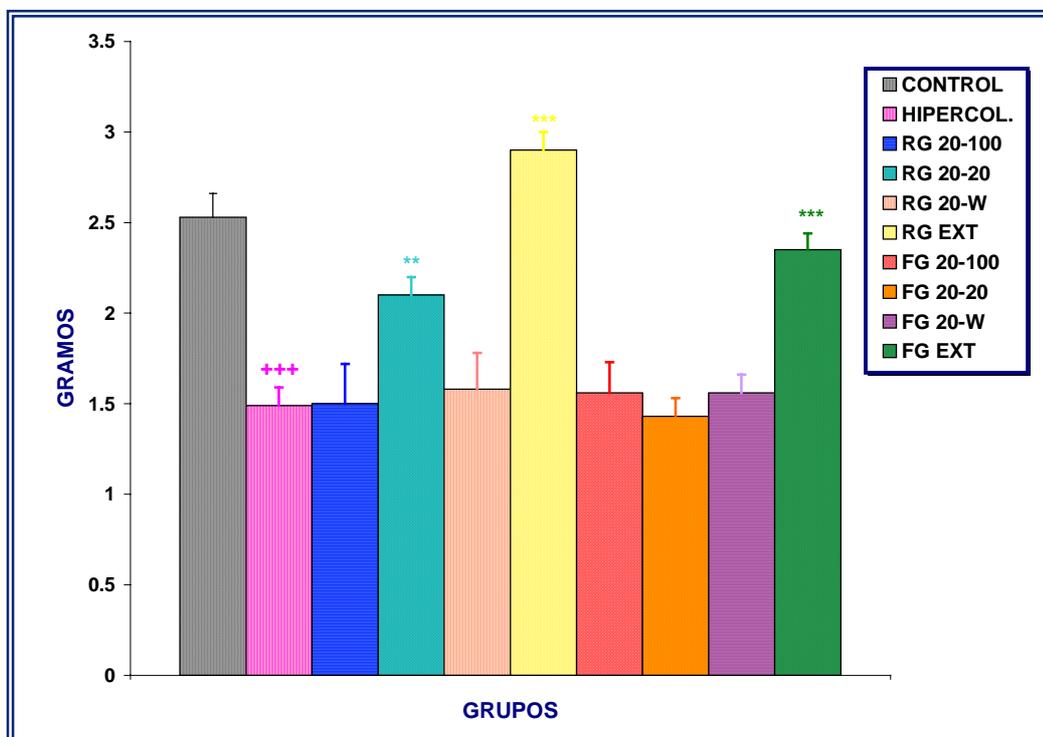


Figura 30.- Contracciones inducidas por KCl 80mM en arteria aorta de ratas control normal, control hipercolesterolémicas e hipercolesterolémicas tratadas con ajo crudo (RG) o ajo congelado (FG). +++ $p < 0.001$ vs control; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs hipercolesterolémico. Cada barra representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

I.5.1.C.- Relajación dependiente de endotelio

Se produjo una mejora de la relajación dependiente de endotelio respecto a la obtenida en el grupo hipercolesterolémico que sólo fue significativo ($p < 0.05$) en el caso de los extractos RG 20-W y FG 20-W ($40.6 \pm 7.6\%$, $72.8 \pm 6.0\%$, $61.4 \pm 6.0\%$ de relajación en los grupos hipercolesterolémico, RG 20-W y FG 20-W respectivamente) (Figuras 31 y 32 para los extractos crudos y congelados respectivamente).

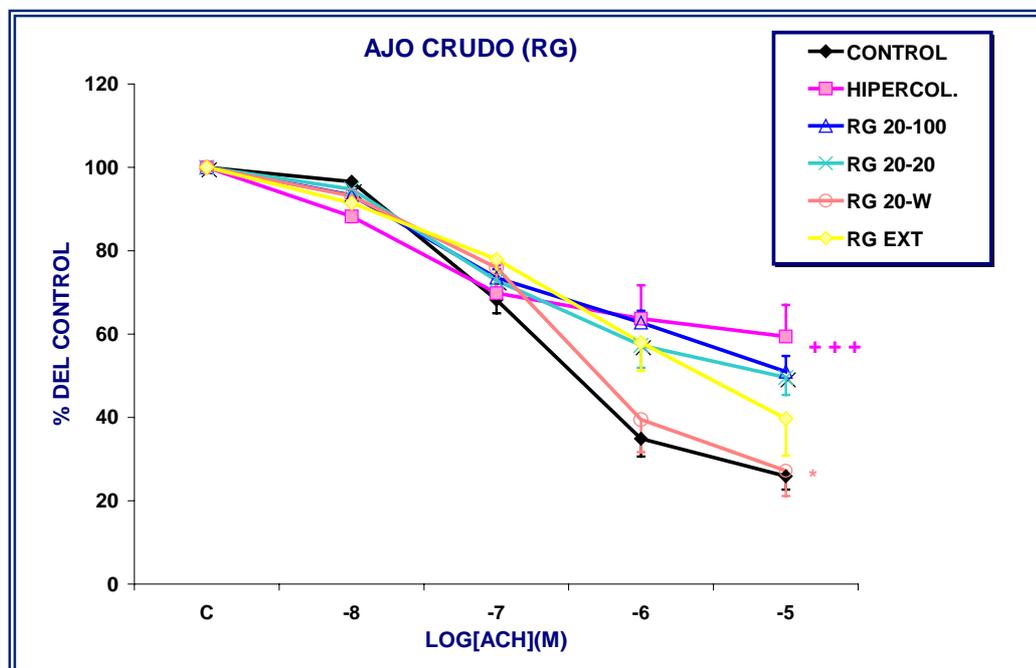


Figura 31.- Efecto del tratamiento crónico con los extractos y fracciones crudas (RG) de ajo sobre la relajación dependiente de endotelio en aorta de rata. +++ $p < 0.001$ vs 100%; * $p < 0.05$ vs hipercolesterolémico. Cada punto representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

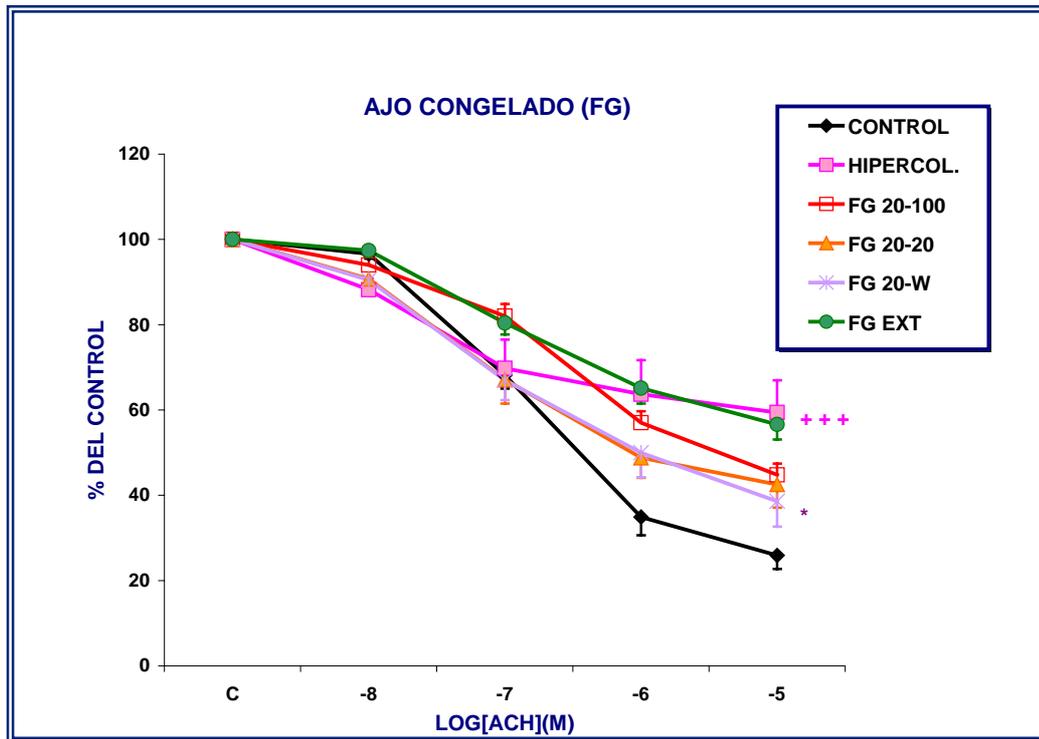


Figura 32.- Efecto del tratamiento crónico con los extractos y fracciones congeladas (FG) de ajo sobre la relajación dependiente de endotelio en aorta de rata. +++ $p < 0.001$ vs 100%; * $p < 0.05$ vs hipercolesterolémico. Cada punto representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

I.5.1.D.- Relajación independiente de endotelio.

La relajación independiente de endotelio no mejoró con ninguno de los extractos estudiados (Figuras 33 y 34 para los extractos crudos y congelados respectivamente), pero tampoco empeoró en el grupo hipercolesterolémico. Los dos extractos, así como las fracciones RG 20-100 y RG 20-20 produjeron un desplazamiento de la curva de relajación hacia la derecha y arriba ($98.5 \pm 1.5\%$, $97.88 \pm 0.97\%$, $94.3 \pm 2.4\%$, $94.12 \pm 2.8\%$, $85.3 \pm 4.3\%$ de relajación con los grupos hipercolesterolémico, RG 20-20, FG EXT, RG 20-100 y RG EXT respectivamente)

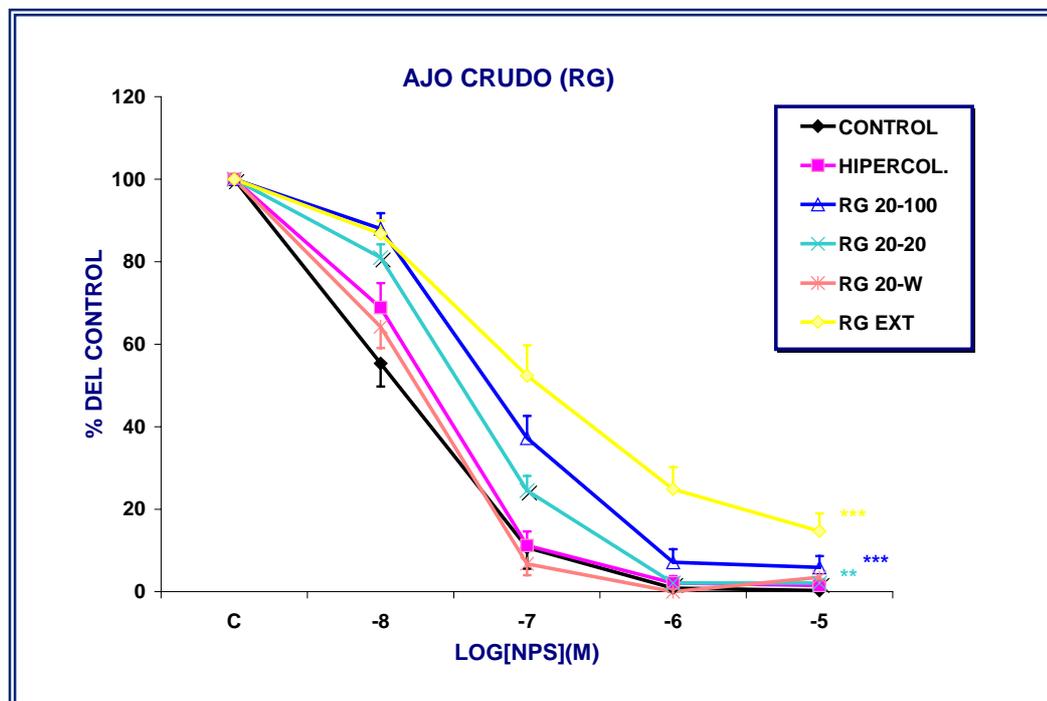


Figura 33.- Efecto del tratamiento crónico con los extractos y fracciones crudas (RG) de ajo sobre la relajación independiente de endotelio en aorta de rata. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs hipercolesterolémico,. Cada punto representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

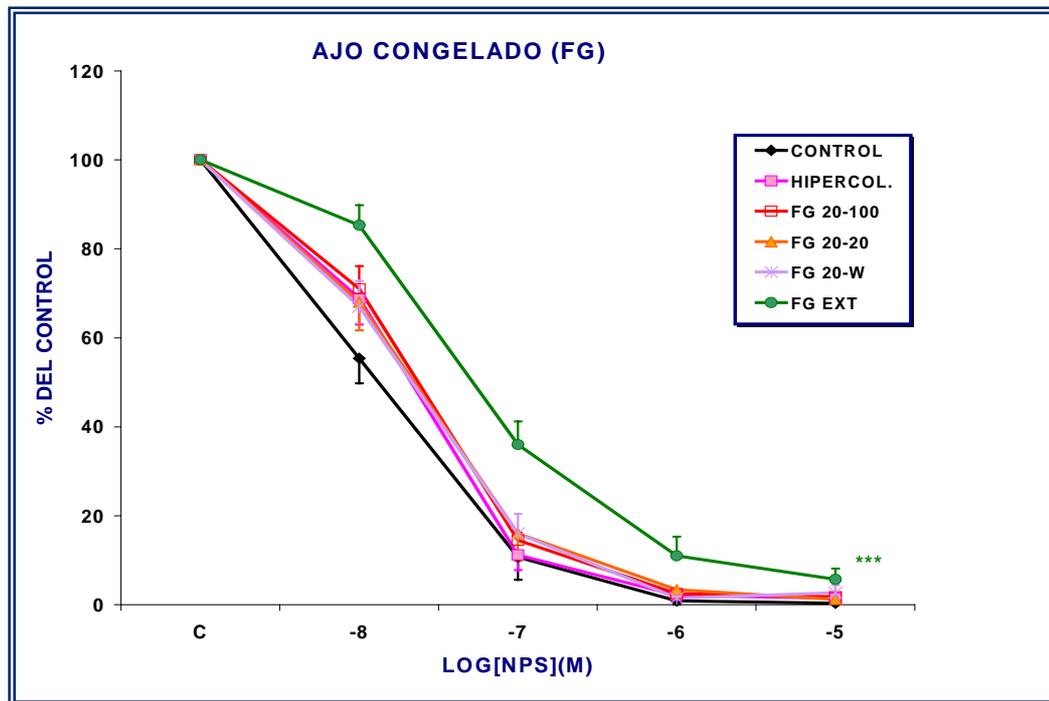


Figura 34.- Efecto del tratamiento crónico con los extractos y fracciones congeladas (FG) de ajo sobre la relajación independiente de endotelio en aorta de rata. *** $p < 0.001$ vs hipercolesterolémico. Cada punto representa la media \pm ESM de cada grupo ($n = 8$).

La Tabla 8 resume el efecto máximo producido por los extractos y fracciones de ajo estudiados, sobre la reactividad vascular de la arteria aorta en ratas hipercolesterolémicas:

	1	2	3 (g)	4 (g)
Control	74.1 ± 3.2%	99.6 ± 0.3 %	0.96 ± 0.09	2.53 ± 0.13
Hipercolesterol.	40.6 ± 7.6 %	98.5 ± 1.5 %	1.28 ± 0.08	1.49 ± 0.10
RG 20-100	49.0 ± 3.8 %	94.2 ± 2.8 %	1.54 ± 0.15	1.50 ± 0.22
RG 20-20	50.4 ± 4.2 %	97.8 ± 0.9 %	1.72 ± 0.15	2.10 ± 0.10
RG 20-W	72.8 ± 6.0 %	96.5 ± 2.4 %	1.10 ± 0.10	1.58 ± 0.20
RG EXT	60.3 ± 8.9 %	85.3 ± 4.3 %	1.27 ± 0.09	2.90 ± 0.10
FG 20-100	55.2 ± 2.6 %	98.2 ± 0.8 %	1.58 ± 0.14	1.56 ± 0.17
FG 20-20	57.5 ± 5.4 %	98.8 ± 0.7 %	1.63 ± 0.13	1.43 ± 0.10
FG 20-W	61.4 ± 6.0 %	97.3 ± 1.7 %	1.70 ± 0.13	1.56 ± 0.10
FG EXT	43.4 ± 3.5 %	94.3 ± 2.4 %	1.75 ± 0.12	2.35 ± 0.09

Tabla 8

1.- Relajación dependiente de endotelio (ACh).

2.- Relajación independiente de endotelio (NPS).

3.- Efecto sobre contracciones producidas por NA 10⁻⁶ M

4.- Efecto sobre contracciones producidas por KCl 80 mM.

- Como se puede observar, la relajación dependiente de endotelio mejoró con los dos extractos RG/FG 20-W de forma más significativa que el resto.

- Con respecto a la relajación independiente de endotelio, aunque prácticamente todos los grupos alcanzaron relajaciones totales equivalentes, las curvas se desplazaron a la derecha y arriba, en el caso de RG 20-100, RG 20-20, RG EXT y FG EXT.

- La contracción producida por NA aumentó en el grupo hipercolesterolémico, y sólo se previno con el grupo RG 20-W.

- Así mismo, la contracción producida por KCl disminuyó en el grupo tratado con colesterol Sólo en los grupos tratados con RG 20-20, RG EXT y FG EXT la contractilidad tendió hacia el control

II.- ESTUDIO *IN VITRO*: EFECTO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL MÚSCULO LISO VASCULAR.

II.1.- ARTERIA AORTA

II.1.1.- BASALES

Tras el periodo de estabilización de la tensión basal dada a la arteria (1g), se añadieron concentraciones crecientes de ajo crudo y congelado. Ninguno de los extractos produjo alteraciones de esta tensión basal, sólo en el caso de las fracciones 20-100 se produjo una pequeña contracción cuando añadimos la dosis de 300 $\mu\text{g/ml}$ (1.09 ± 0.02 g, 1.1 ± 0.03 g con RG 20-100 y FG 20-100 respectivamente)(Figura 35).

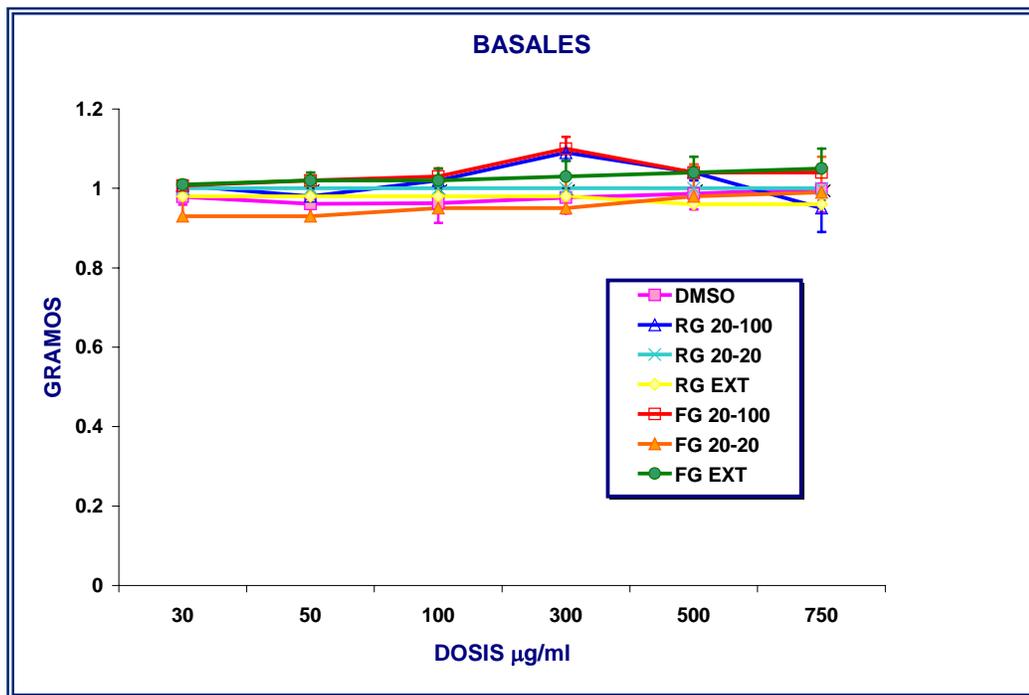


Figura 35.- Efecto del ajo sobre la contracción basal de la arteria aorta de rata. Cada punto representa la media \pm ESM de 15 experimentos.

II.1.2.- RELAJACIÓN DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR NA

Se estudió la relajación inducida por las fracciones y extractos de ajo (RG/FG 20-100, RG/FG 20-20 Y RG/FG EXT) en arterias previamente contraídas con concentraciones submáximas de NA (10^{-6} M). Como muestra la Figura 36 (A y B para los extractos crudos y congelados respectivamente), al añadir concentraciones crecientes de ajo (30-750 μ g/ml) al baño de órganos, se produjo una relajación de la contracción en todos los casos, sin embargo este efecto fue significativamente mayor en el caso de las fracciones 20-100 ($92.9 \pm 2.2\%$, $86.7 \pm 4.4\%$, con FG 20-100 y RG 20-100 respectivamente). El efecto de las demás fracciones y extractos fue el siguiente: $67.9 \pm 6.0\%$, $59.9 \pm 3.8\%$, $33.1 \pm 6.4\%$, $21.3 \pm 6.4\%$ de relajación, con RG 20-20, RG EXT, FG EXT y FG 20-20 respectivamente.

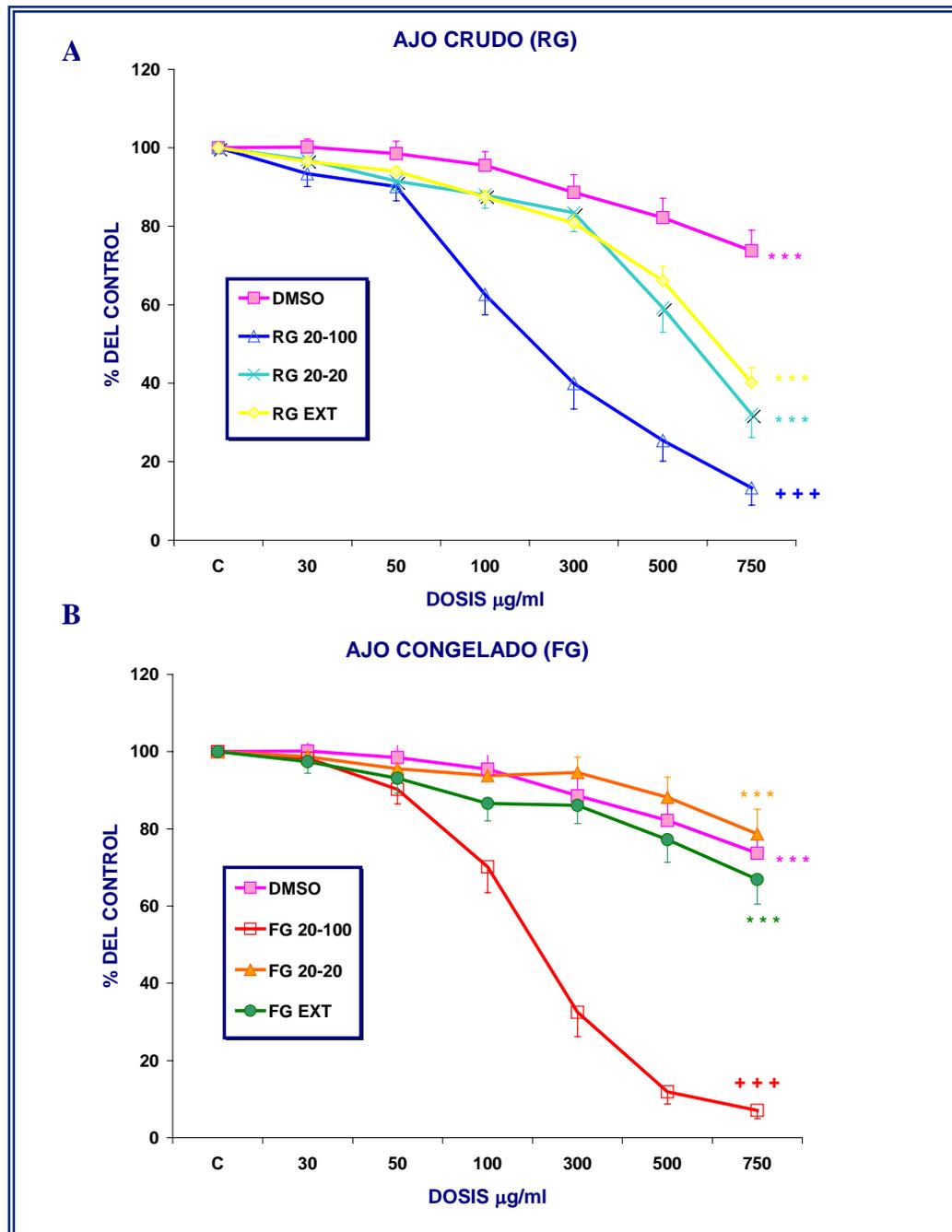


Figura 36.- Efecto inducido por la adición de concentraciones crecientes de ajo (A, crudo; B, congelado) sobre la contracción inducida por NA (10^6M) en arteria aorta de rata. .*** $p < 0.001$ vs 100%, +++ $p < 0.001$ vs DMSO. Cada punto representa la media \pm ESM de 15 experimentos

II.1.3.- RELAJACIÓN DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR KCL

En otro grupo de experimentos realizados en anillos de aorta de rata, se estudió la relajación inducida por las fracciones y extractos de ajo en arterias previamente contraídas con concentraciones submáximas de KCl (80mM) (Figura 37, A y B). Al añadir concentraciones crecientes de ajo (30-750 $\mu\text{g/ml}$) al baño de órganos, fueron las fracciones 20-100 las que produjeron una vez más la relajación más significativa ($93.0 \pm 2.6\%$, $83.4 \pm 2.2\%$ con RG 20-100 y FG 20-100 respectivamente). Con el resto de las fracciones y extractos se produjo una relajación menor ($23.3 \pm 2.2\%$, $4.4 \pm 2.0\%$, $1.0 \pm 3.8\%$ con RG EXT, FG EXT y FG 20-20 respectivamente). Sin embargo en el caso de RG 20-20 se produjo una contracción de un $9.2 \pm 2.0\%$.

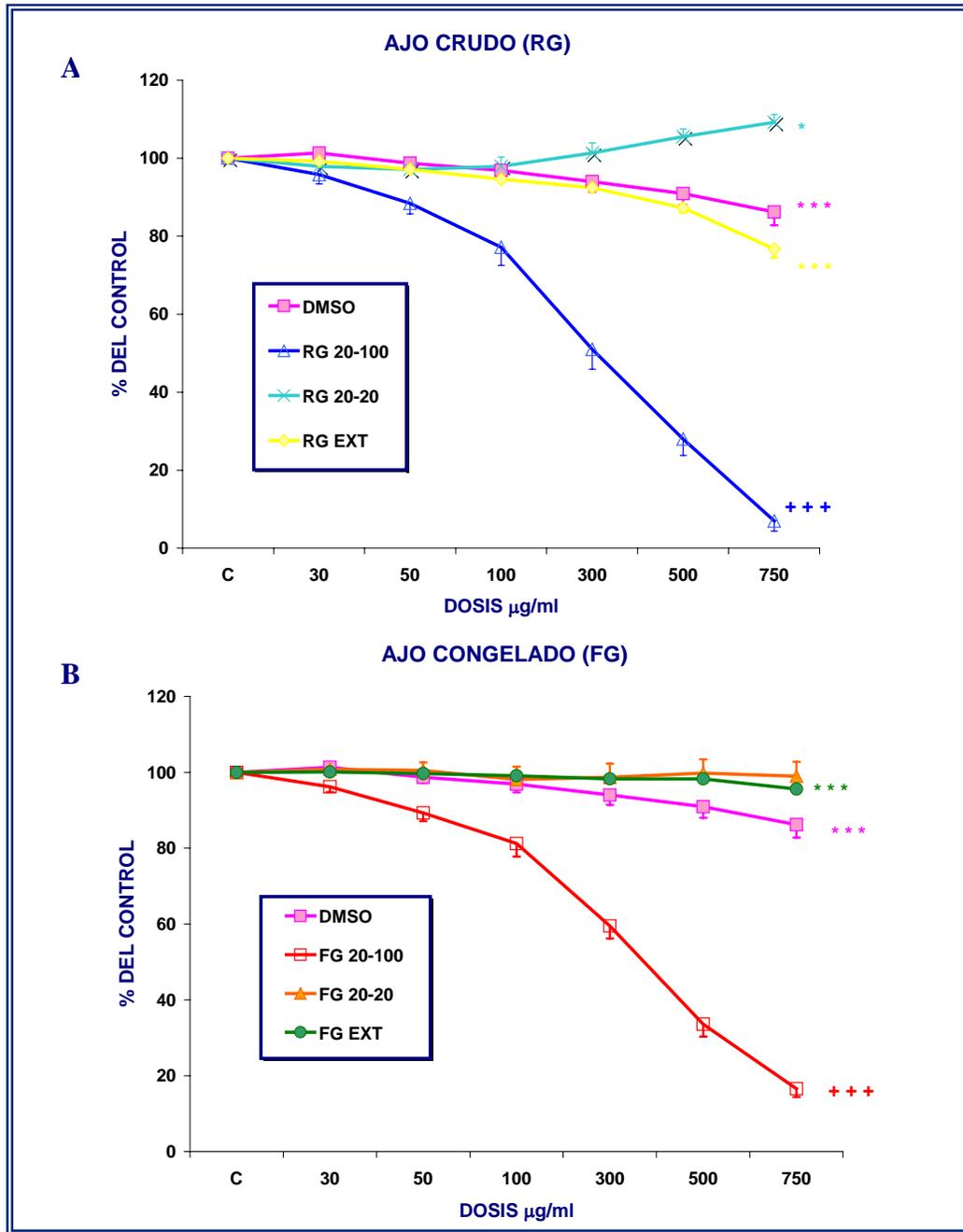


Figura 37.- Efecto inducido por la adición de concentraciones crecientes de ajo (A, crudo; B, congelado) sobre la contracción inducida por KCL (80 mM) en aorta de rata. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs 100%, +++ $p < 0.001$ vs DMSO. Cada punto representa la media \pm ESM de 15 experimentos.

II.1.4.- INHIBICIÓN DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR NA

La Figura 38 (A y B) muestra los resultados obtenidos al estudiar el efecto de las distintas fracciones y extractos de ajo sobre las contracciones inducidas por NA (10^{-6} M) en arteria aorta de rata. Con las dosis más pequeñas ya se empezó a producir inhibición de la contracción alcanzándose el máximo de inhibición con las dosis de 750 μ g/ml siendo las fracciones 20-100, así como RG EXT las que produjeron una inhibición mayor: $95.3 \pm 1.1\%$, $93.3 \pm 2.4\%$, $79.8 \pm 5.2\%$ con RG 20-100, RG EXT y FG 20-100 respectivamente. El resto también inhibió la contracción aunque en menor grado: $68.0 \pm 5.2\%$, $45.6 \pm 3.9\%$, $32.0 \pm 4.1\%$ con FG EXT, FG 20-20 y RG 20-20 respectivamente.

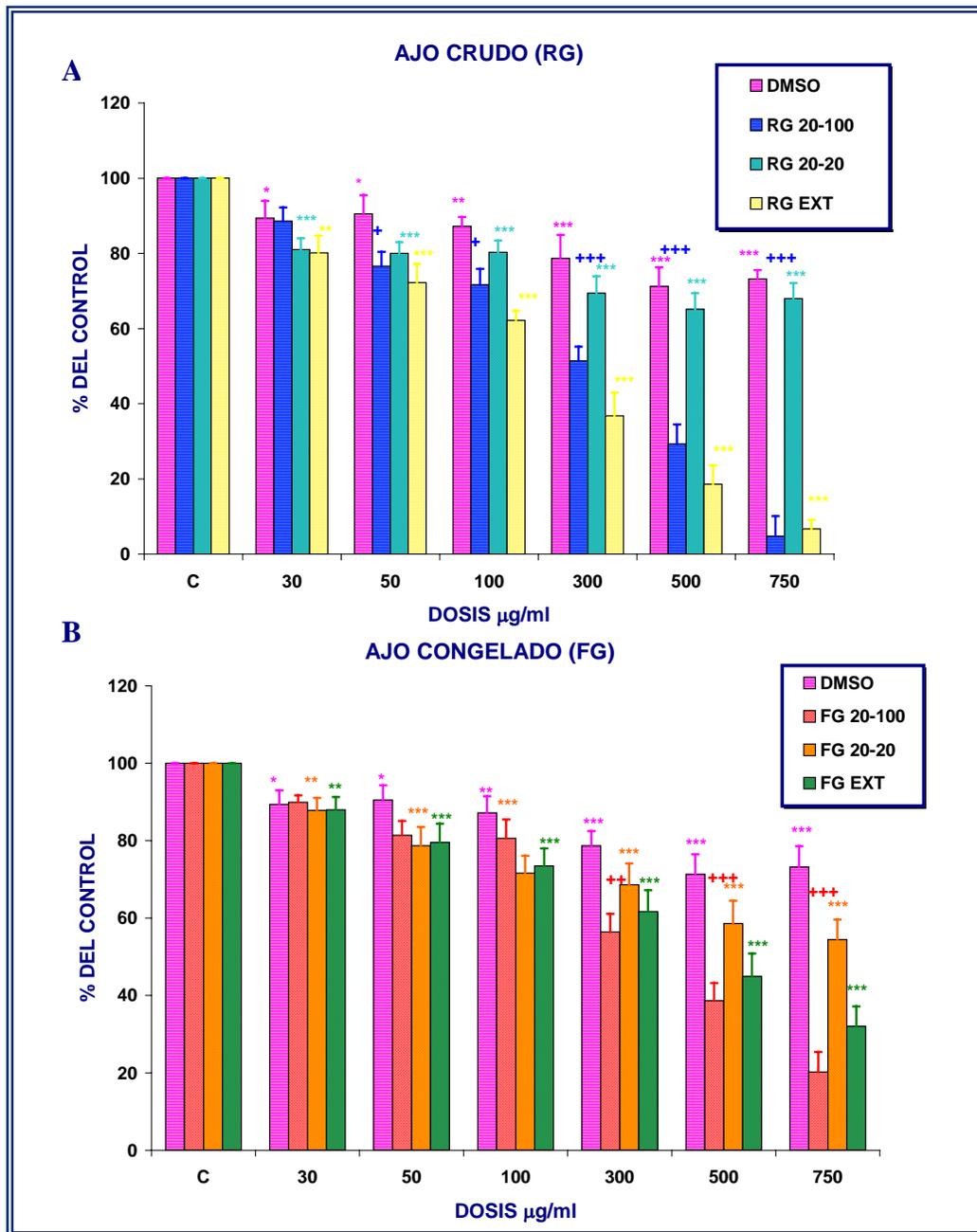


Figura 38.- Inhibición ejercida por diferentes concentraciones de ajo (A, crudo; B, congelado) sobre la contracción inducida por $NA 10^{-6}M$ en aorta de rata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ vs DMSO. Cada barra representa la media \pm ESM de 15 experimentos.

II.1.5.- INHIBICIÓN DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR KCL

Cuando se estudió el efecto de las distintas fracciones y extractos de ajo sobre las contracciones inducidas por KCl 80 mM en arteria aorta de rata, obtuvimos los siguientes resultados: La inhibición de la contracción más importante se produjo de nuevo con las fracciones 20-100 ($88.4 \pm 3.5\%$, $83.1 \pm 4.5\%$ con RG 20-100 y FG 20-100 respectivamente). Las demás fracciones también produjeron inhibición pero de forma más moderada ($44.1 \pm 4.6\%$, $27.5 \pm 3.6\%$, $20.4 \pm 6.7\%$, $16.7 \pm 6.9\%$ con RG EXT, FG EXT, FG 20-20 y RG 20-20) (Figura 39, A y B).

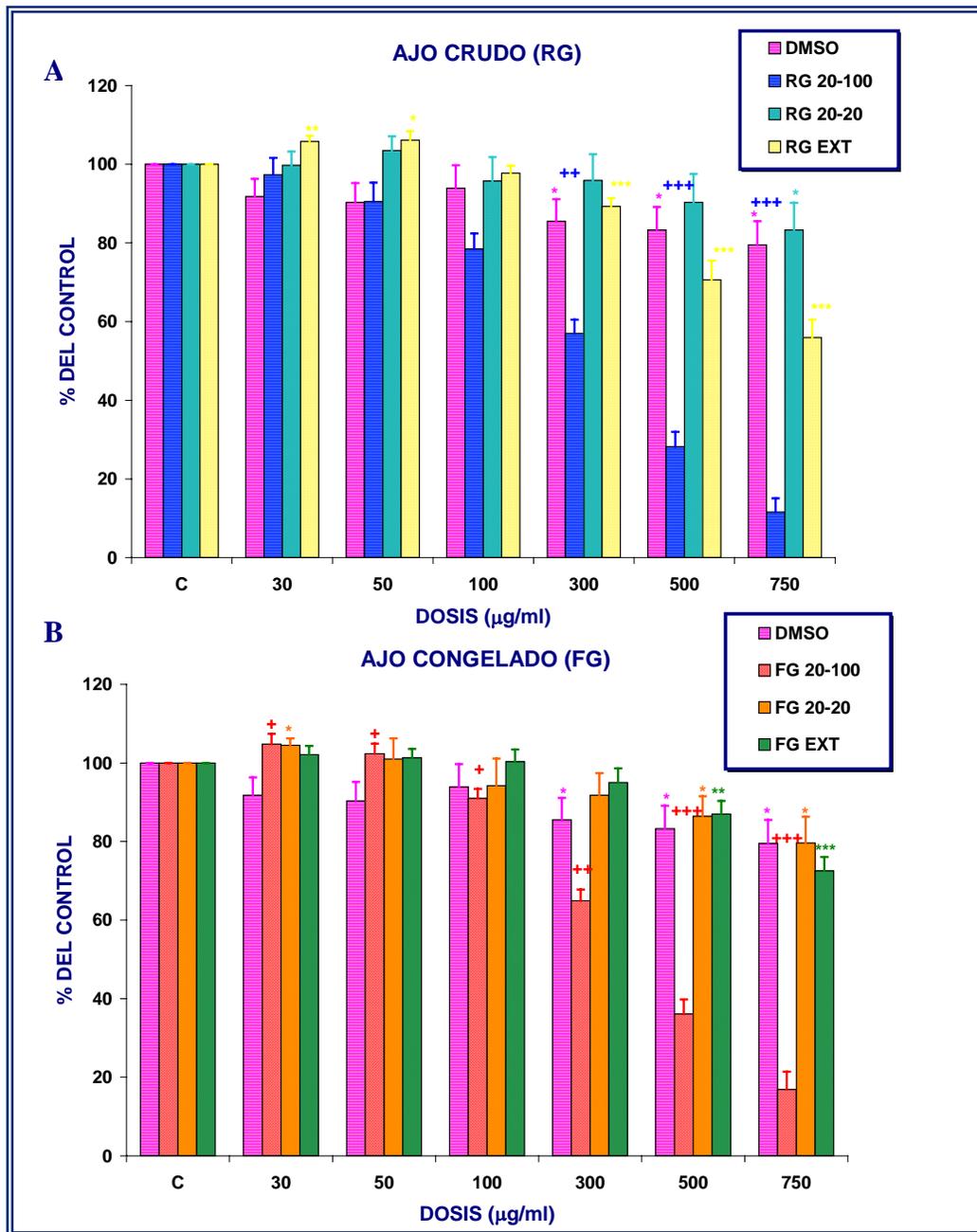


Figura 39.- Inhibición ejercida por diferentes concentraciones de ajo (A, crudo; B, congelado) sobre la contracción inducida por KCl 80 mM en aorta de rata.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ vs DMSO. Cada barra representa la media \pm ESM de 15 experimentos.

En resumen, podemos esquematizar en la siguiente Tabla 9 el efecto máximo producido por la dosis más alta utilizada (750 µg/ml) de los extractos y fracciones de ajo estudiados, sobre la reactividad vascular de la arteria aorta:

	1	2	3	4
RG 20-100	86.7 ± 4.4 %	93.0 ± 2.6 %	95.3 ± 1.6 %	88.4 ± 3.5 %
RG 20-20	67.9 ± 6.0 %	*9.2 ± 2.0 %	32.0 ± 4.1 %	16.7 ± 6.9 %
RG EXT	59.9 ± 3.8 %	23.3 ± 2.2 %	93.3 ± 2.4 %	44.1 ± 4.6 %
FG 20-100	92.9 ± 2.2 %	83.4 ± 2.2 %	79.8 ± 5.2 %	83.1 ± 4.5 %
FG 20-20	21.3 ± 6.4 %	1.0 ± 3.8 %	45.6 ± 3.9 %	20.4 ± 6.7 %
FG EXT	33.1 ± 6.4 %	4.4 ± 1.3 %	68.0 ± 5.2 %	27.5 ± 3.6 %

Tabla 9

- 1.-** Relajación de la contracción producida por NA 10⁻⁶M
 - 2.-** Relajación de la contracción producida por KCl 80 mM.
 - 3.-** Inhibición de la contracción producida por NA 10⁻⁶M.
 - 4.-** Inhibición de la contracción producida por KCl 80 mM.
- * Contracción de la contracción producida por KCl.

Como se puede observar, los resultados obtenidos hasta este momento, parecían evidenciar un mayor efecto sobre la reactividad vascular de las fracciones RG 20-100 y FG 20-100, siendo muy similares entre sí. Sin embargo, en general, la fracción RG 20-100 presentó un perfil de actividad algo mayor y constante en todos los parámetros estudiados, por lo tanto, nos decidimos a estudiar en mayor profundidad, el posible mecanismo de acción de la fracción RG 20-100.

II.1.6.- EFECTO DE LA INCUBACIÓN CON L-NAME O INDOMETACINA SOBRE LA RELAJACIÓN DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR NA PRODUCIDA POR RG 20-100

Como se mencionó en material y métodos, con el fin de estudiar si la relajación de la contracción inducida por NA que producía RG 20-100 era debida a la acción del óxido nítrico o de las prostaglandinas procedimos a inhibir su síntesis, con L-NAME y con Indometacina. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Figura 40): en el caso de la incubación previa con Indometacina, no se produjo ninguna diferencia significativa con respecto a la curva control, lo que indicaría un mecanismo de acción de RG 20-100 independiente de la síntesis de prostaglandinas. Con respecto a la incubación previa con L-NAME, tampoco encontramos ninguna diferencia significativa con respecto a la curva control en arterias previamente incubadas con L-NAME.

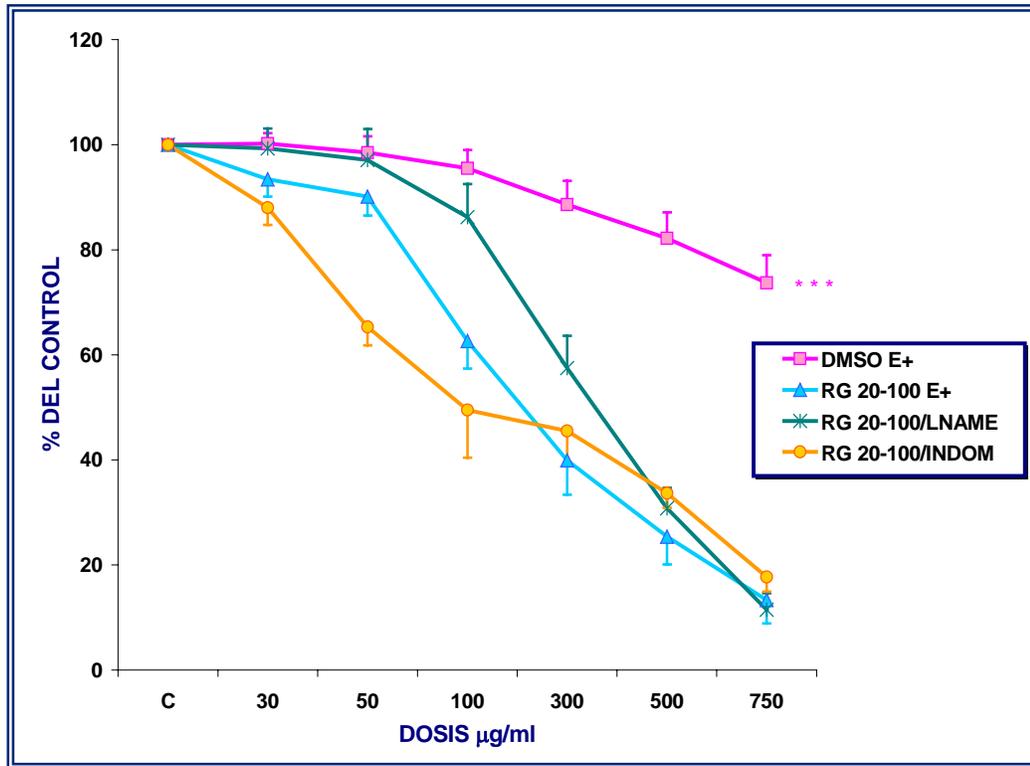


Figura 40.- Comparación del efecto de la incubación con L-NAME o Indometacina sobre la curva de relajación producida por RG 20-100 en arterias previamente contraídas con NA. *** $p < 0.001$ vs 100%. Cada punto representa la media \pm ESM de 15 experimentos.

II.1.7.- RELAJACIÓN DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR NA PRODUCIDA POR RG 20-100 EN ARTERIAS SIN ENDOTELIO.

Para corroborar el posible mecanismo de acción independiente de endotelio de la fracción más activa encontrada (RG 20-100), se estudió su efecto sobre anillos de aortas precontraídas con NA 10^{-6} M sin endotelio (E-) y se comparó con el efecto obtenido en arterias con endotelio intacto (E+). Como se observa en la Figura 41, la relajación de la contracción en ambos casos fue prácticamente el mismo (86.7 ± 4.4 %, $83,7 \pm 2.8$ % de relajación en RG 20-100 con endotelio y RG 20-100 sin endotelio respectivamente).

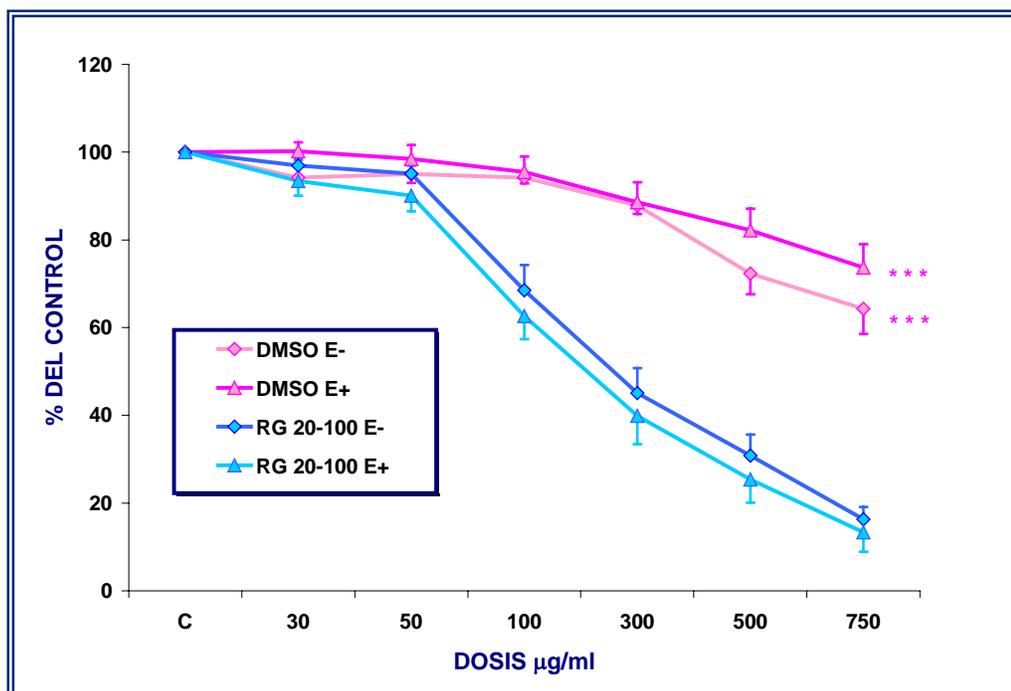


Figura 41.- Comparación del efecto de la fracción RG 20-100 sobre la contracción inducida por NA en arterias con (E+) y sin endotelio (E-). *** $p < 0.001$ vs 100%. Cada punto representa la media \pm ESM de 15 experimentos.

Observando que en condiciones agudas esta fracción presenta un mecanismo de acción independiente de endotelio, nos propusimos estudiar más extensamente su acción sobre el músculo liso vascular:

II.1.8.- EFECTO DE RG 20-100 SOBRE LA CURVA DE NPS

Al comparar la curva de NPS obtenida en arterias control, y en arterias previamente incubadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ y 300 $\mu\text{g/ml}$ RG 20-100 ó DMSO, observamos que la curva no se veía afectada y se obtenía en todos los casos una relajación de la contracción inducida por NA total (Figuras 42 y 43).

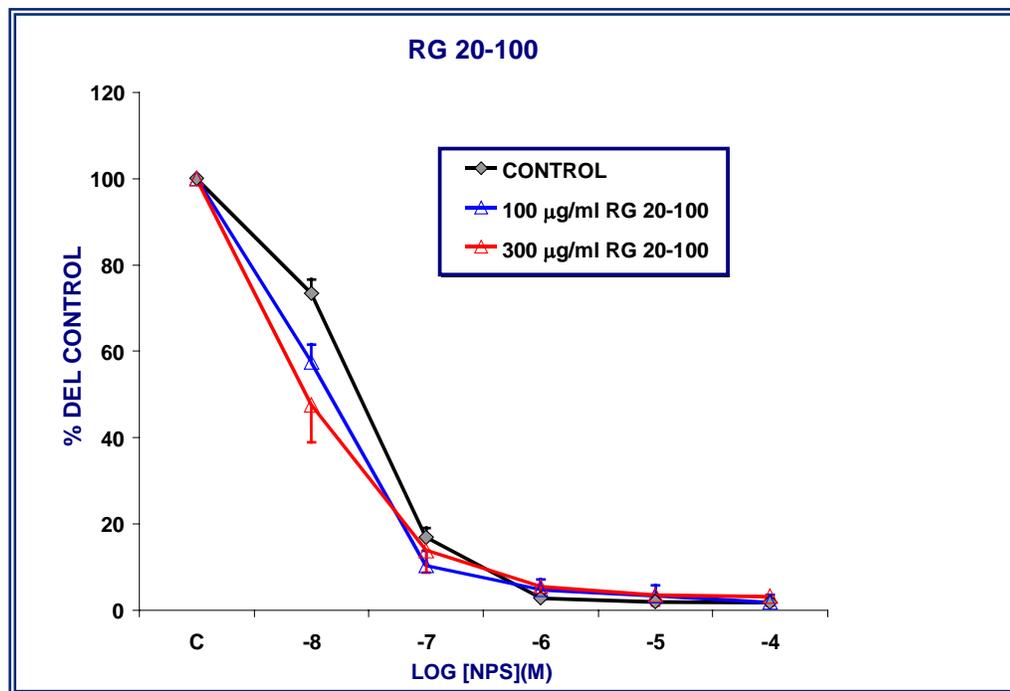


Figura 42.- Efecto sobre la curva de NPS en arteria aorta de rata de la incubación con 100 $\mu\text{g/ml}$ y 300 $\mu\text{g/ml}$ de RG 20-100. Cada punto representa la media \pm ESM de 15 experimentos

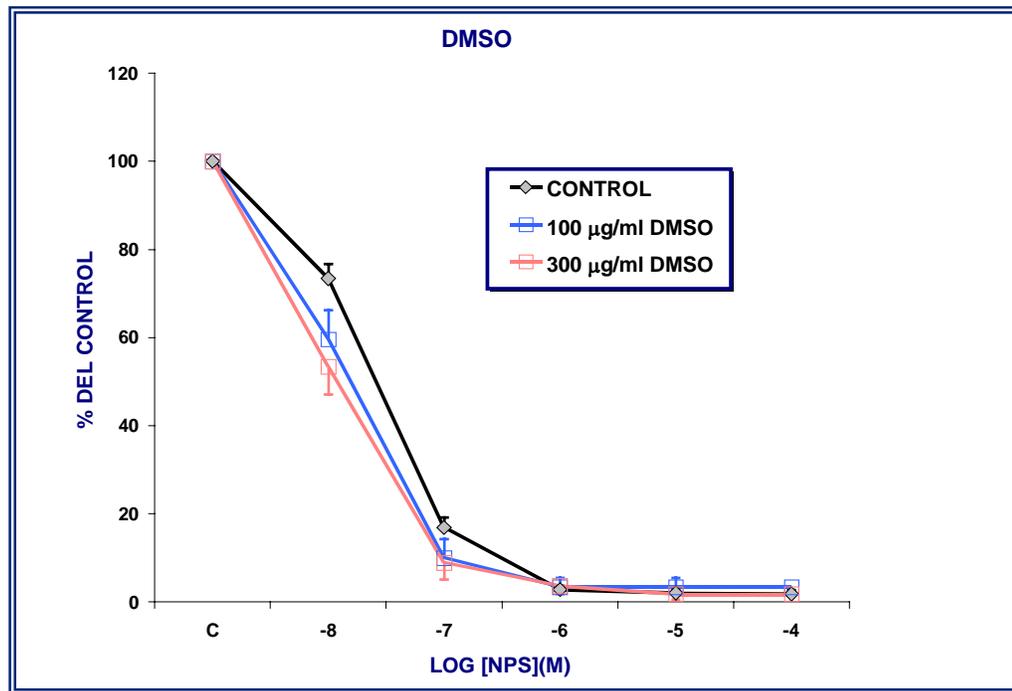


Figura 43.- Efecto sobre la curva de NPS en arteria aorta de rata de la incubación con DMSO. Cada punto representa la media \pm ESM de 15 experimentos

II.1.9.- EFECTO DE RG 20-100 SOBRE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR Ca^{2+} EN AORTA PREVIAMENTE DESPOLARIZADA

En arterias previamente despolarizadas con KCl 80 mM, y en medio Krebs 0 Ca + EGTA 10^{-5} M, añadimos concentraciones crecientes de calcio (1-5 mM), y a continuación se repitió incubando con RG 20-100 (100, 300 y 500 μ g/ml) (Figura 44). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Considerando la máxima contracción producida por Ca 5 mM en el grupo control como el 100%, se obtuvo una disminución de la contracción producida por esa misma dosis de un $16.1 \pm 5.3\%$ con 100 μ g/ml de RG 20-100, de $18.2 \pm 10.1\%$ con 300 μ g/ml de RG 20-100 y de un $43.4 \pm 5.8\%$ con RG 20-100 500 μ g/ml. Asimismo, con el resto de las dosis de calcio estudiadas (1 y 3 mM), también se produjo una inhibición de su entrada al usar RG 20-100 de forma dosis dependiente. En este caso

no realizamos el experimento en presencia de DMSO ya que como muestra la figura anterior no producía un efecto significativo. Estos resultados parecían evidenciar un mecanismo de acción a través de la entrada del calcio extracelular.

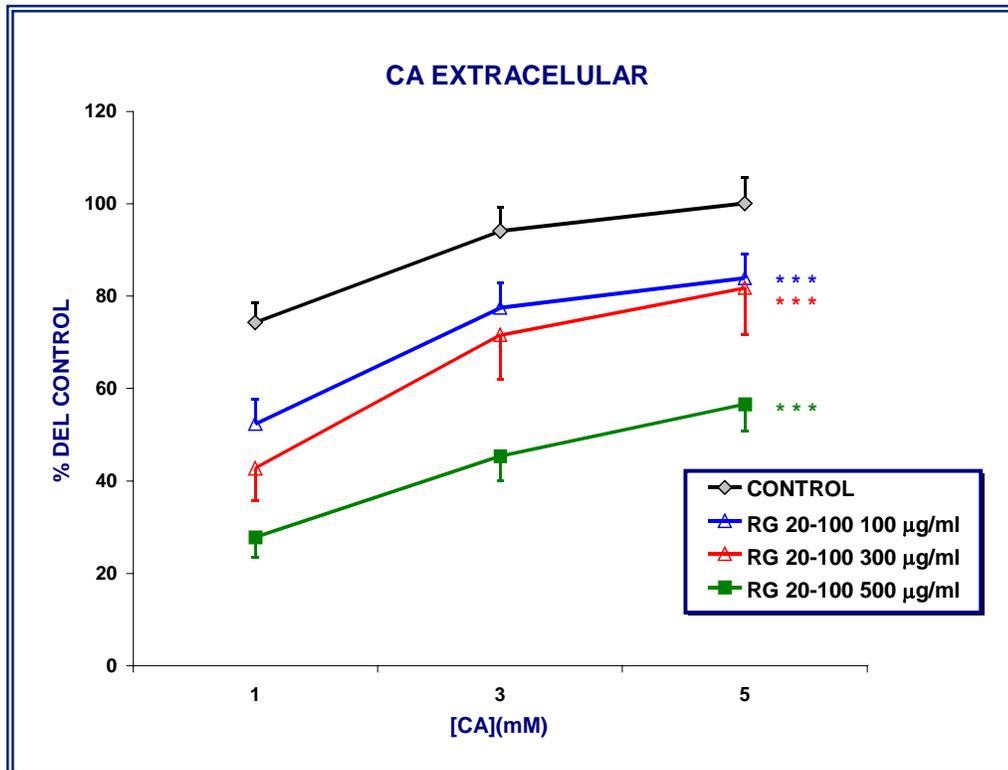


Figura 44.- Entrada de Ca^{2+} extracelular(1-5 mM) en aorta de ratas control y tratadas con RG 20-100 100µg/ml, 300 µg/ml o 500 µg/ml. *** $p < 0.001$ vs control. Cada punto representa la media \pm ESM de 15 experimentos.

II.1.10.- EFECTO DE RG 20-100 SOBRE LA MOVILIZACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR.

Como se mencionó en material y métodos, para comprobar si esta fracción producía también un efecto sobre la salida del calcio del retículo sarcoplásmico, realizamos un grupo de experimentos descritos previamente por Hester y cols. en 1987 (Figura 45). Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes: Consideramos la contracción producida por NA 10^{-6} M en medio Krebs normal en ambos casos (antes y después de incubar con RG 20-100) como el 100%. Si comparamos a continuación la contracción obtenida en medio 0Ca (NA 0Ca 1) antes y después de incubar con RG 20-100 observamos una disminución desde un $46.8 \pm 5.0\%$ a un $19.9 \pm 2.9\%$ (en el control y RG 20-100 respectivamente). De igual modo al contraer nuevamente con NA (NA 0Ca 2) obtuvimos una contracción residual que disminuyó desde un $29.8 \pm 4.1\%$ en el caso del control hasta un $15.9 \pm 3.1\%$ en el caso de la incubación con RG 20-100.

Para elegir la dosis de RG 20-100 usada en este experimento, nos basamos en el experimento de inhibición de la contracción inducida por NA en presencia de ajo, eligiendo aquella que producía entre un 60-70% de inhibición de la contracción, y esto era producido por la dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$.

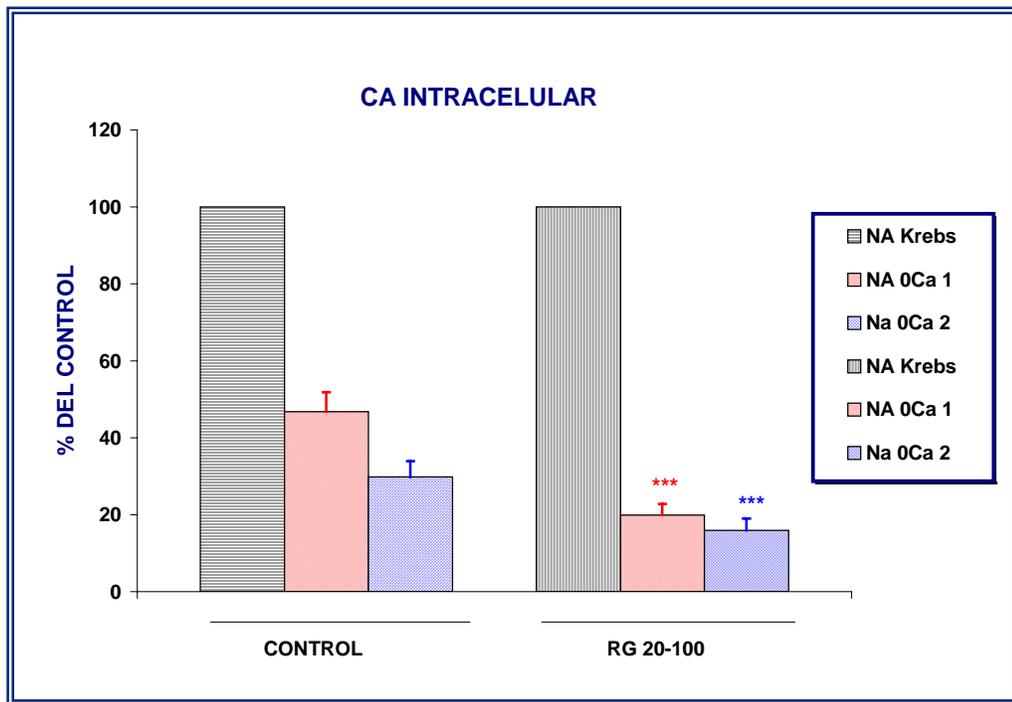


Figura 45.- Efecto de RG 20-100 (500 $\mu\text{g/ml}$) sobre la movilización de calcio intracelular durante la contracción producida por NA 10^{-6} M en arteria aorta de rata. *** $p < 0.001$ vs su control correspondiente. Cada punto representa la media \pm ESM de 15 experimentos.

II.2.- MESENTÉRICA

II.2.1.- BASALES

Al igual que en el caso de la aorta, en la arteria mesentérica (4ª rama) las dosis de ajo añadidas tras la estabilización de la tensión basal, no produjeron efecto alguno, excepto en el caso de las fracciones 20-100 que al principio produjeron contracción, pero después, a dosis mayores, volvieron a su tensión basal (Figura 46).

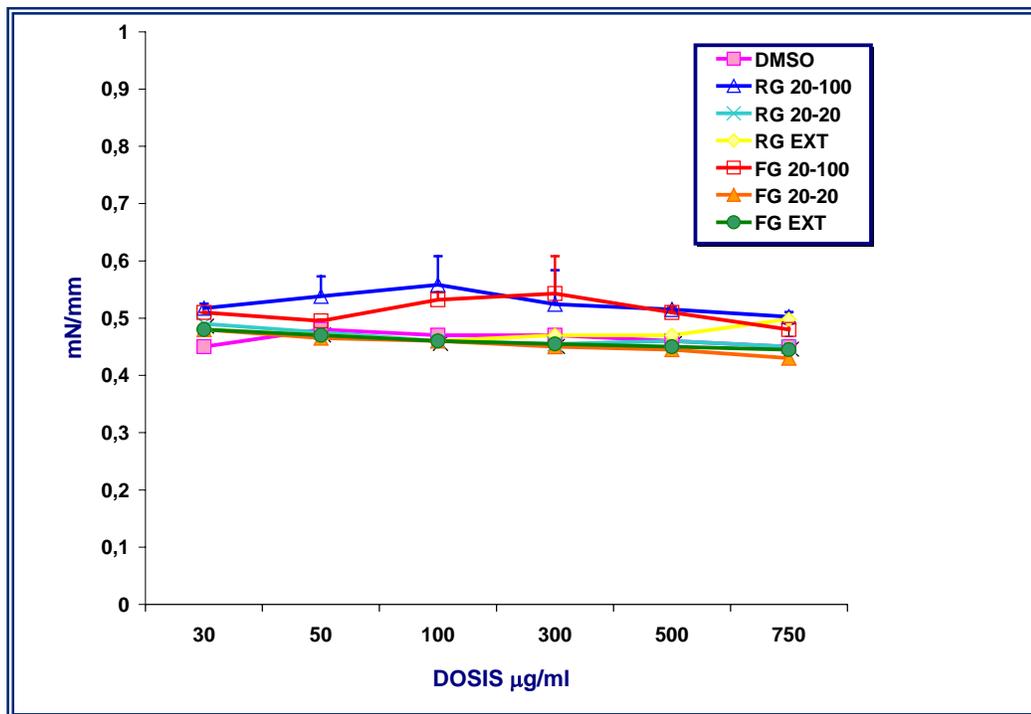


Figura 46.- Efecto del ajo sobre la contracción basal de la arteria mesentérica de rata. Cada punto representa la media \pm ESM de 8 experimentos.

II.2.2.- RELAJACIÓN DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR NA

Al estudiar la relajación de la contracción inducida por NA 10^{-5} M en arteria mesentérica, obtuvimos resultados similares al caso de la aorta, las fracciones 20-100 tanto la cruda (RG) como la congelada (FG), produjeron la mayor relajación ($94.9 \pm 1.3\%$, $94.6 \pm 0.8\%$ de relajación con RG 20-100 y FG 20-100 respectivamente) (Figura 47, A y B). El resto de las fracciones también relajaron, aunque en menor medida: $80.2 \pm 0.4\%$, $66.5 \pm 2.0\%$, $56.0 \pm 5.6\%$, $41.9 \pm 5.6\%$ con RG EXT, FG EXT, RG 20-20 y FG 20-20 respectivamente).

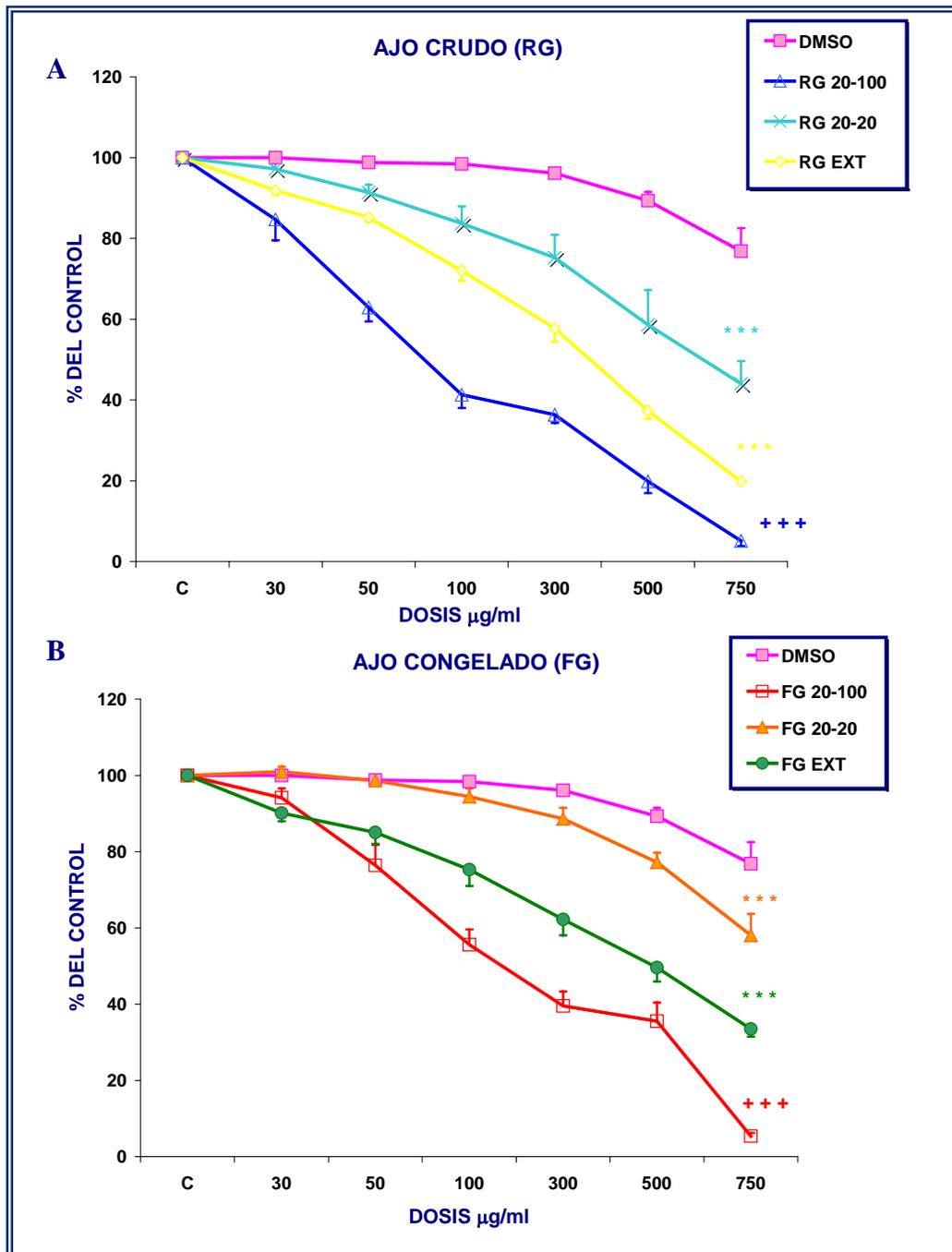


Figura 47.- Efecto inducido por la adición de concentraciones crecientes de ajo (A, crudo; B, congelado) sobre la contracción inducida por NA ($10^{-5}M$) en arteria mesentérica de rata. .*** $p < 0.001$ vs 100%, +++ $p < 0.001$ vs DMSO. Cada punto representa la media \pm ESM de 8 experimentos

II.2.3.- RELAJACIÓN DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR KCL

Se estudió la relajación inducida por las fracciones y extractos de ajo en arterias mesentéricas previamente contraídas con concentraciones submáximas de KCl (80mM). Al añadir concentraciones crecientes de ajo (30-750 µg/ml) al baño de órganos, fueron las fracciones 20-100 las que produjeron una vez más la relajación más significativa ($99.5 \pm 0.1\%$, $97.6 \pm 0.9\%$ con RG 20-100 y FG 20-100 respectivamente) (Figura 48). Con el resto de las fracciones y extractos se produjo una relajación menor ($56.9 \pm 3.5\%$, $56.5 \pm 3.8\%$, $36.0 \pm 5.0\%$, $31.9 \pm 6.8\%$ con RG EXT, RG 20-20, FG EXT y FG 20-20 respectivamente).

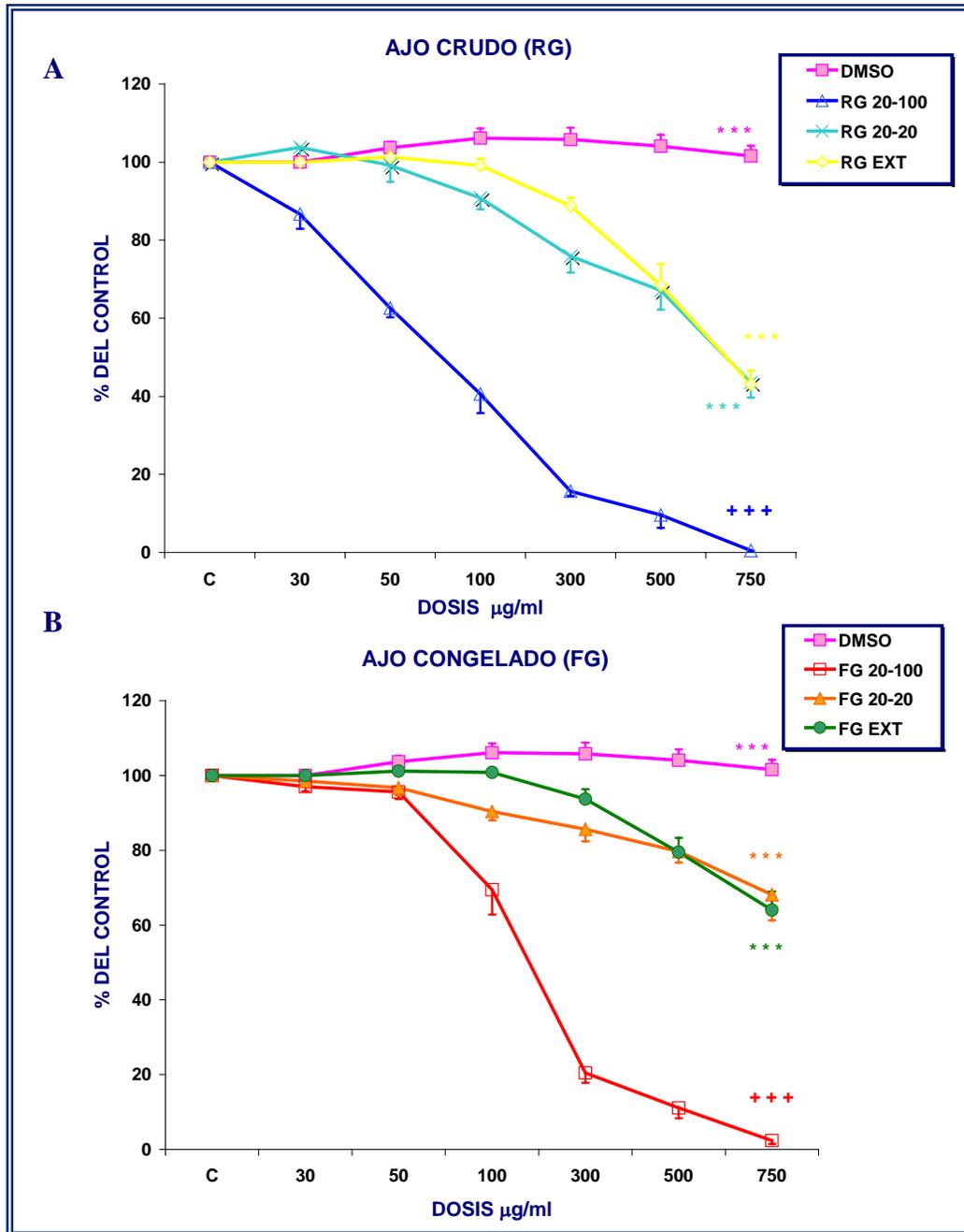


Figura 48.- Efecto inducido por la adición de concentraciones crecientes de ajo (A, crudo; B, congelado) sobre la contracción inducida por KCl (80 mM) en mesentérica de rata. *** $p < 0.001$ vs 100%, +++ $p < 0.001$ vs DMSO. Cada punto representa la media \pm ESM de 8 experimentos.

II.2.4.- INHIBICIÓN DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR NA

La Figura 49 muestra las respuestas obtenidas al estudiar el efecto de las distintas fracciones y extractos de ajo sobre las contracciones inducidas por NA (10^{-5} M) en arteria mesentérica de rata. Únicamente inhibieron las contracciones inducidas por NA las fracciones RG 20-100 y FG 20-100 alcanzándose el máximo de inhibición con las dosis de 750 $\mu\text{g/ml}$: $99.32 \pm 0.1\%$ y $99.25 \pm 0.1\%$ de inhibición con RG 20-100 y FG 20-100 respectivamente.

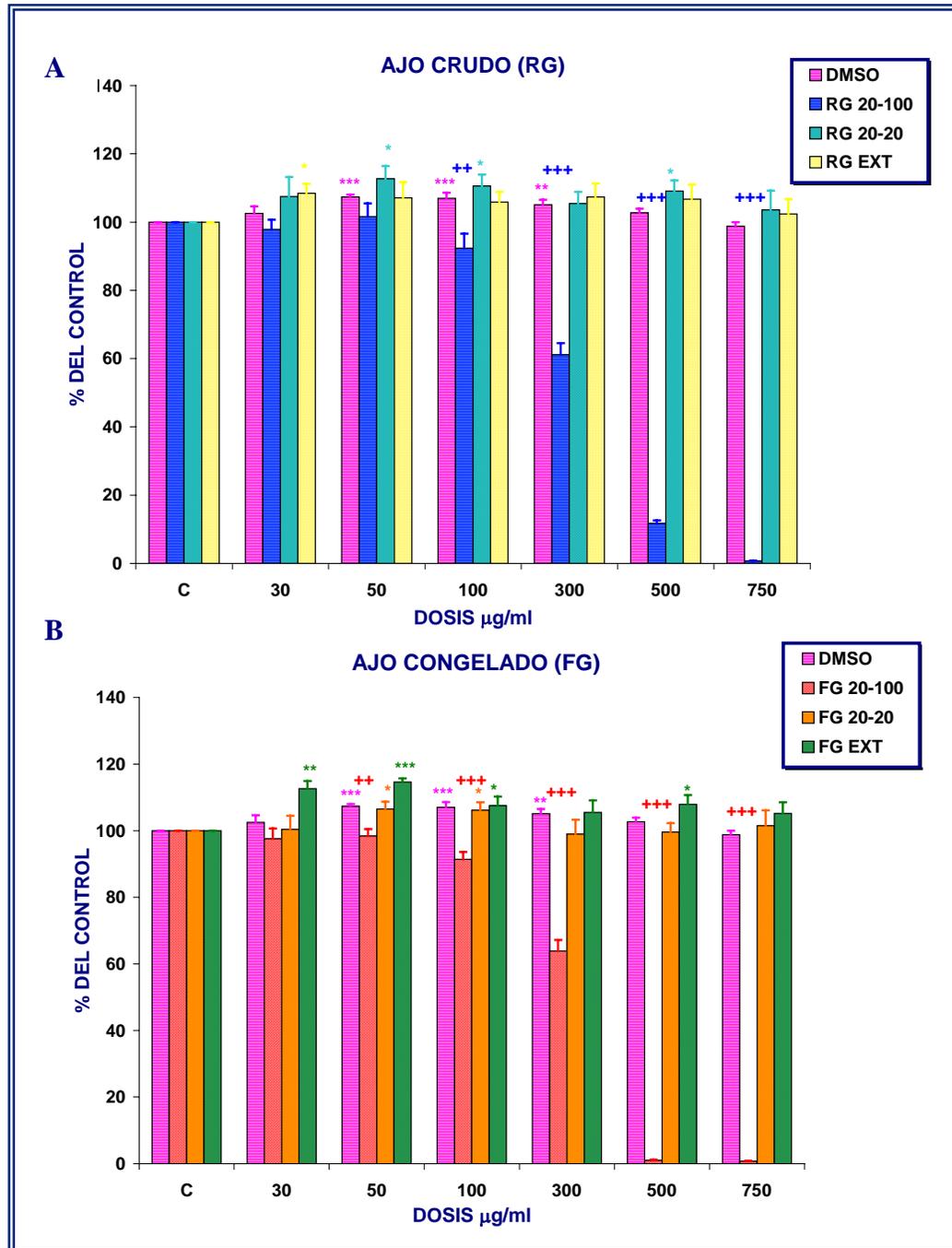


Figura 49.- Inhibición ejercida por diferentes concentraciones de ajo (A, crudo; B, congelado) sobre la contracción inducida por $NA 10^{-6} M$ en mesentérica de rata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control; ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ vs DMSO. Cada barra representa la media \pm ESM de 8 experimentos.

II.2.5.- INHIBICIÓN DE LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR KCL

Al estudiar el posible efecto de las distintas fracciones y extractos de ajo sobre las contracciones inducidas por KCl 80 mM en arteria mesentérica de rata, obtuvimos los siguientes resultados (Figura 50): La inhibición de la contracción más importante se produjo de nuevo con las fracciones 20-100 ($99.4 \pm 0.1\%$, $98.8 \pm 0.3\%$ con RG 20-100 y FG 20-100 respectivamente). Así mismo, la fracción RG 20-20 produjo una inhibición de un $23.4 \pm 2.0\%$ con la dosis más alta ($750 \mu\text{g/ml}$), sin embargo los demás extractos y fracciones no inhibieron significativamente la contracción con ninguna de las dosis estudiadas.

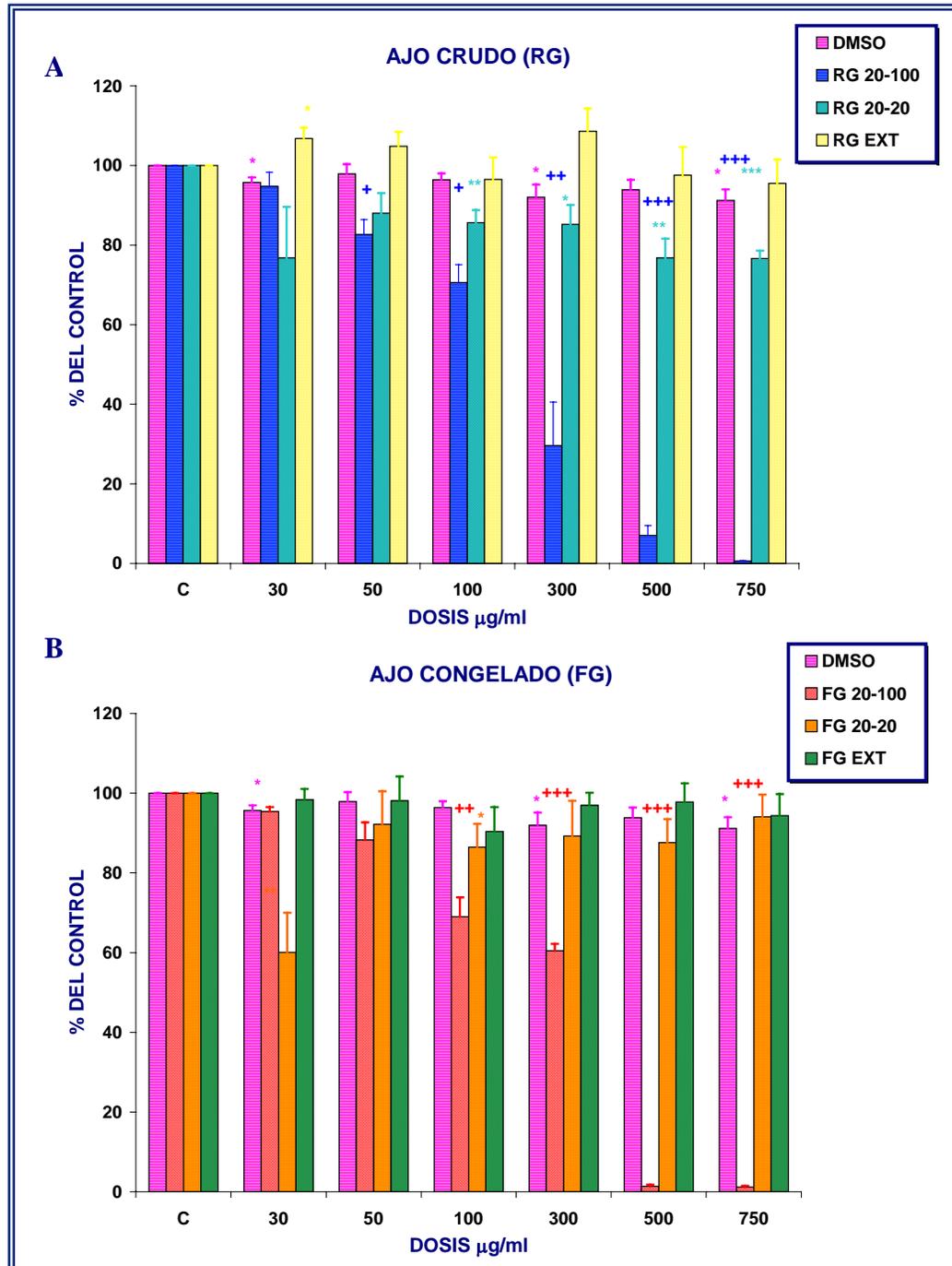


Figura 50.- Inhibición ejercida por diferentes concentraciones de ajo (A, crudo; B, congelado) sobre la contracción inducida por KCl 80 mM en mesentérica de rata.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ vs DMSO. Cada barra representa la media \pm ESM de 8 experimentos.

A continuación, la Tabla 10 resume los efectos máximos obtenidos con la dosis más alta (750 µg/ml) de los extractos y fracciones estudiados sobre la reactividad vascular de la arteria mesentérica:

	1	2	3	4
RG 20-100	94.9 ± 1.3 %	99.5 ± 0.1 %	99.3 ± 0.1 %	99.4 ± 0.1 %
RG 20-20	56.0 ± 5.6 %	56.5 ± 3.8 %	*3.6 ± 5.6 %	23.4 ± 2.0 %
RG EXT	80.2 ± 0.4 %	56.9 ± 3.5 %	*2.4 ± 4.3 %	4.5 ± 6.0 %
FG 20-100	94.6 ± 0.8 %	97.6 ± 0.9 %	99.2 ± 0.1 %	98.8 ± 0.3 %
FG 20-20	41.9 ± 5.6 %	31.9 ± 6.8 %	*1.5 ± 4.6 %	5.9 ± 5.6 %
FG EXT	66.5 ± 2.0 %	36.0 ± 5.0 %	*5.2 ± 3.3 %	5.6 ± 5.4 %

Tabla 10

- 1.- Relajación de la contracción producida por NA 10⁻⁵ M.
 - 2.- Relajación de la contracción producida por KCl 80 mM.
 - 3.- Inhibición de la contracción producida por NA 10⁻⁵ M.
 - 4.- Inhibición de la contracción producida por KCl 80 mM.
- * Potenciación de la contracción producida por NA 10⁻⁵ M.

Como se puede observar, los resultados obtenidos en arteria mesentérica, parecían evidenciar al igual que en la aorta, un mayor efecto sobre la reactividad vascular de las fracciones RG 20-100 y FG 20-100, siendo muy similares entre sí. Del mismo modo, en general, la fracción RG 20-100 presentó una actividad algo mayor en todos los parámetros estudiados.

III.- CULTIVOS CELULARES: EFECTO DE RG 20-100 SOBRE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA DE RATA.

III.1.- PROLIFERACIÓN CELULAR

Al realizar la curva de proliferación celular, obtuvimos los siguientes resultados (Figura 51): sólo las dosis de 30 µg/ml y 10 µg/ml inhibieron la proliferación de forma significativa ($p < 0.001$). Asimismo, como se puede comprobar, la absorbancia de las células no estimuladas (0.4% FBS), se mantuvo estable a lo largo de los días, lo que indica que seguían sincronizadas en G_0/G_1 y sin proliferar.

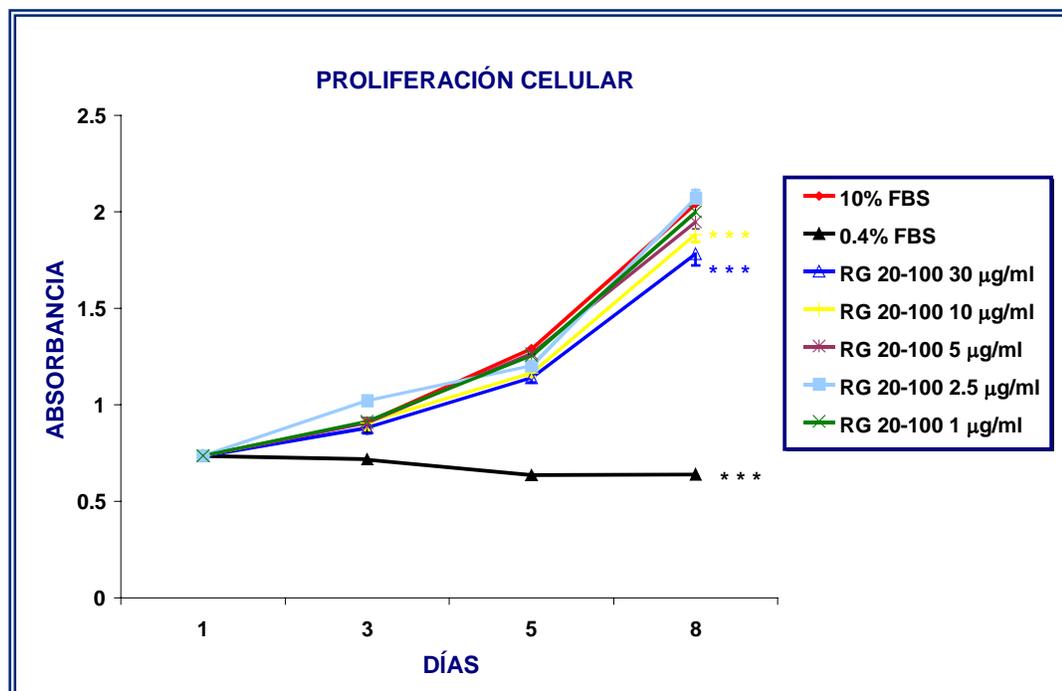


Figura 51.- Proliferación celular de células musculares lisas de aorta de rata en presencia de RG 20-100. *** $p < 0.001$ vs control (10% FBS). Cada punto representa la media \pm ESM de 3 experimentos cada uno por cuadruplicado.

III.2.- MEDIDA DE LA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH).

En un primer grupo de experimentos medimos la LDH presente en los medios de cultivo pero sin la presencia de las células: DMEM-glutamax, DMEM-gultamax + 2% suero de caballo (SC) + 1% ATB y medio DMEM-glutamax + 2% SC + 1% ATB + las distintas dosis de RG 20-100. Los resultados obtenidos (Figura 52) revelaron que no existían diferencias significativas entre ellos, lo que indicaba la ausencia de interferencias del medio en la lectura de la cantidad de LDH. Los resultados se expresan como mOD/min (milidensidades ópticas por minuto).

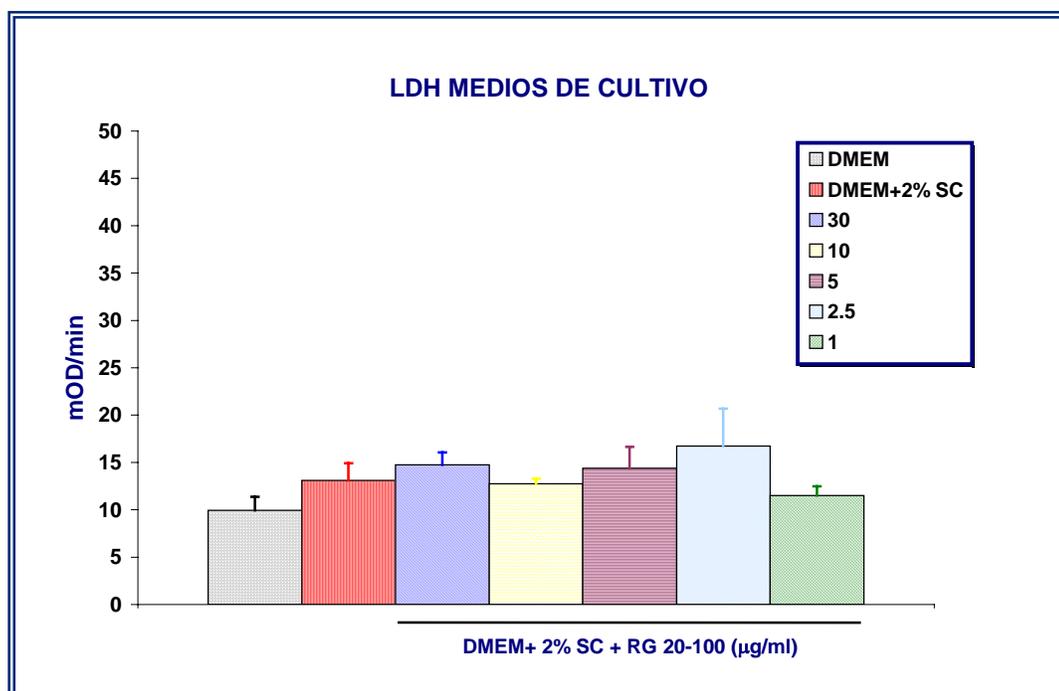


Figura 52.- LDH medida en los medios de cultivo o en los medios de cultivo con diferentes dosis de RG 20-100 en ausencia de células. Cada punto representa la media \pm ESM de 3 experimentos cada uno por cuadruplicado.

En una segunda parte, estudiamos la liberación de LDH en las células musculares lisas en presencia o ausencia de RG 20-100. Los resultados se expresan como valores relativos a la cantidad total de LDH presente en esas células, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ LDH liberado} = \frac{\text{Absorbancia sobrenadante}}{\text{Absorbancia sobrenadante} + \text{Absorbancia lisado}} \times 100$$

Como se puede observar en la Figura 53, tampoco aparecieron diferencias significativas entre los grupos, incluso se puede observar que a las 24 y 72 horas la cantidad de LDH era menor en los grupos tratados con ajo que en el grupo control.

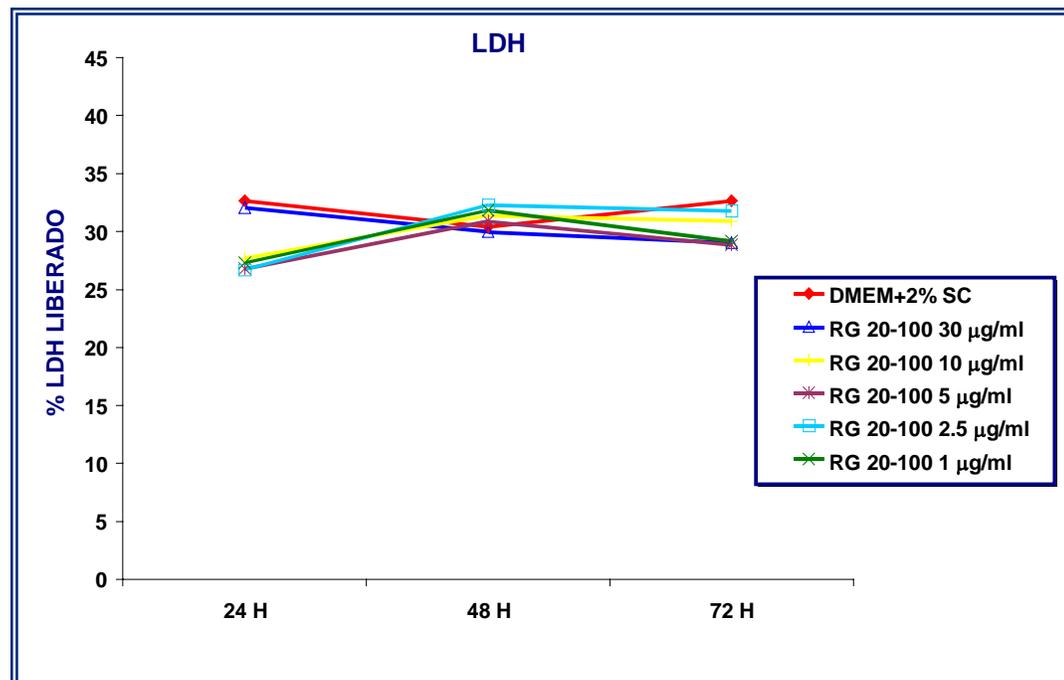


Figura 53.- LDH encontrada en situación control (línea roja), y en los grupos tratados con diferentes dosis de RG 20-100 a lo largo de 72 h. Cada punto representa la media \pm ESM de 3 experimentos cada uno por cuadruplicado.

III.3.- CICLO CELULAR Y SÍNTESIS DE DNA

Al estudiar las diferentes fases del ciclo celular (G_0/G_1 , S y G_2/M) en los diferentes grupos (Figura 54), observamos que en el grupo ayunado (0.4% FBS) hay un mayor porcentaje de G_0/G_1 al encontrarse las células paradas en esta fase, sin embargo en las células estimuladas con un 10% de FBS con o sin anticuerpo (Ac), el ciclo se encuentra más acelerado, teniendo un mayor porcentaje de fase S y G_2/M . En el caso de las células tratadas con RG 20-100 (10 y 30 $\mu\text{g/ml}$), el porcentaje de fase S no se vio significativamente disminuido, teniendo un ciclo muy similar al control 10%.

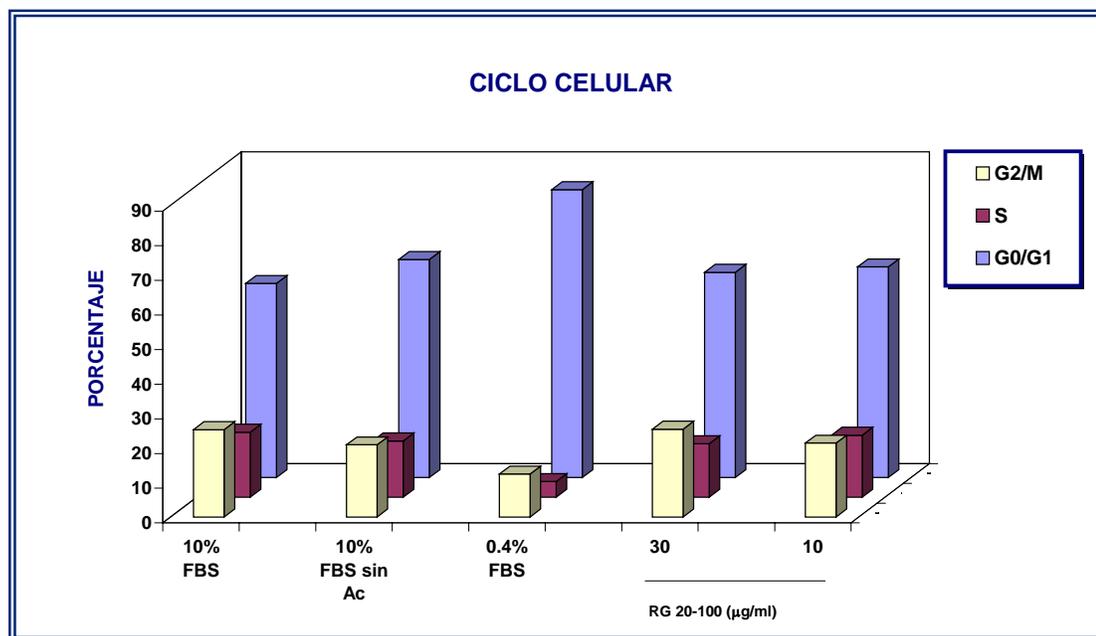


Figura 54.- Diferentes fases del ciclo celular (G_0/G_1 , S, G_2/M) expresadas como porcentaje del número total de células estudiadas, en células control ayunadas (0.4% FBS), estimuladas con 10% FBS y estimuladas con un 10% de FBS + RG 20-100 (10 y 30 $\mu\text{g/ml}$). Cada punto representa la media \pm ESM de 3 experimentos cada uno por duplicado.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Tabla 11):

	G₀/G₁	S	G₂/M
0.4% FBS	83.6 ± 2.3 %	4.5 ± 1.1 %	12.2 ± 2.0 %
10% FBS sin Ac	62.9 ± 3.6 %	16.2 ± 1.8 %	20.8 ± 2.2 %
10% FBS	56.0 ± 2.2 %	18.7 ± 1.5 %	25.2 ± 3.3 %
RG 20-100 30 µg/ml	59.2 ± 3.8 %	15.4 ± 0.9 %	25.3 ± 2.1 %
RG 20-100 10 µg/ml	60.7 ± 2.6 %	17.8 ± 2.8 %	21.3 ± 2.6 %

Tabla 11

El registro obtenido en el citómetro de flujo se puede observar en la Figura 55 donde el pico de la izquierda indica el porcentaje de células en fase G₀/G₁ el pico central el porcentaje en fase S y el pico derecho el porcentaje en fase G₂/M.

Sin embargo, a pesar de no haber una diferencia significativa en el % de fase S (fase de síntesis) entre el grupo control (10% FBS) y los tratados con RG 20-100, pudimos observar al estudiar la incorporación de BrdU al núcleo celular, que las células independientemente de encontrarse en fase S podían estar o no sintetizando DNA, es decir, podían encontrarse paradas en fase S o no haber empezado a sintetizar DNA. De esta manera, observamos que las células tratadas con ajo sintetizaban en fase S menos DNA que las células control. Esto se puede observar en la siguiente Figura 56 que expresa dentro de la fase S el porcentaje de células que están sintetizando DNA y las que no lo hacen.

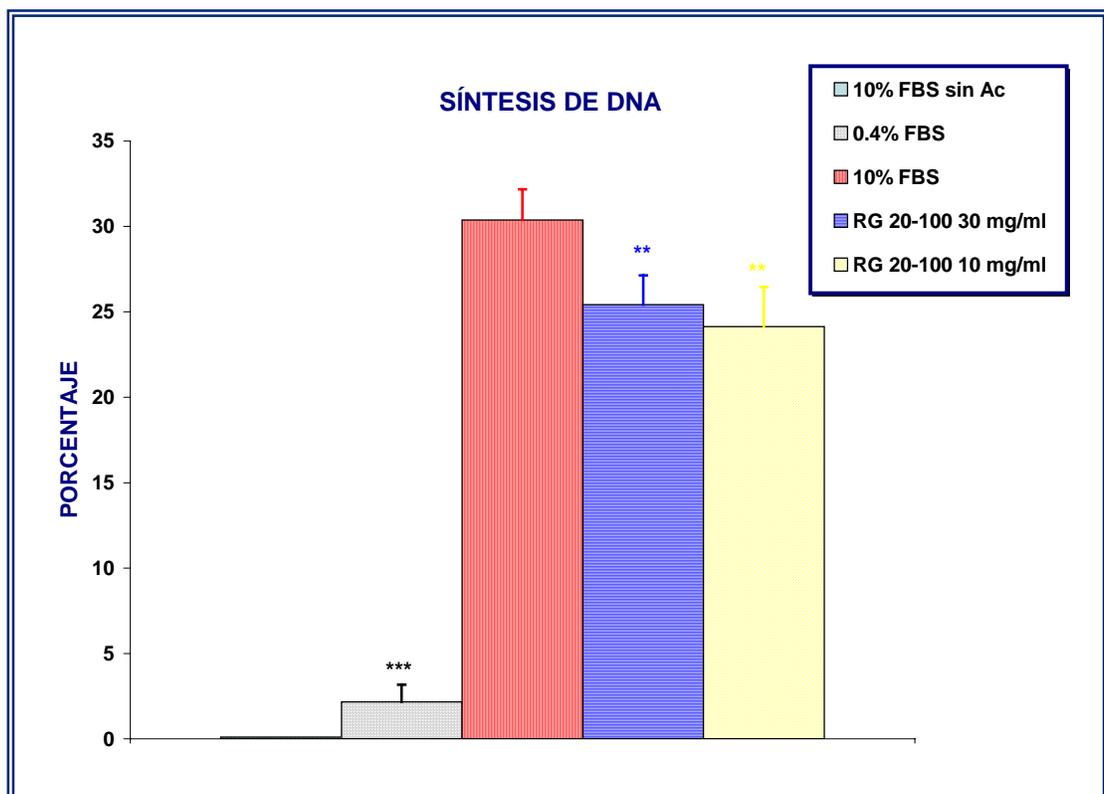


Figura 56.- Incorporación de BrdU al núcleo celular en células musculares lisas de aorta control (0.4% FBS y 10% FBS con y sin anticuerpo (Ac) IgG) y células tratadas con RG 20-100 (10 y 30 $\mu\text{g/ml}$)

Como se puede observar en la Figura 56, el grupo al que no se le añadió IgG no presenta señal de incorporación de BrdU como era de esperar. El grupo ayunado presentó una mínima incorporación y el grupo estimulado con un 10% FBS incorporó una cantidad de BrdU mucho mayor ($30.38 \pm 1.8\%$). Los grupos tratados con RG 20-100 mostraron una menor incorporación de BrdU ($25.43 \pm 1.7\%$ y $24.14 \pm 2.3\%$ con 30 y 10 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente).

Los resultados obtenidos fueron los indicados a continuación en la Tabla 12:

	Incorporación de BrdU (%)
0.4% FBS	$2.1 \pm 1.0 \%$
10% FBS sin Ac	$0 \pm 0 \%$
10% FBS	$30.3 \pm 1.8 \%$
RG 20-100 30 $\mu\text{g/ml}$	$25.4 \pm 1.7 \%$
RG 20-100 10 $\mu\text{g/ml}$	$24.1 \pm 2.3 \%$

Tabla 12

Si observamos esto en el registro obtenido en el citómetro de flujo (Figuras 57 y 58), distinguimos diferentes áreas que indican:

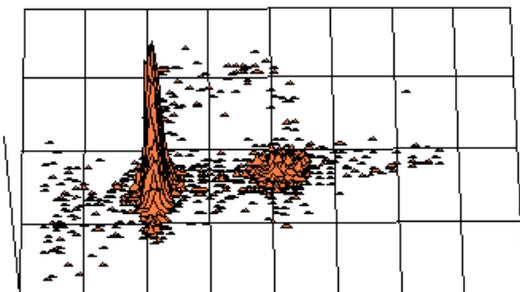
R2: % de fase G_0/G_1

R3: % de fase S (no sintetizando DNA)

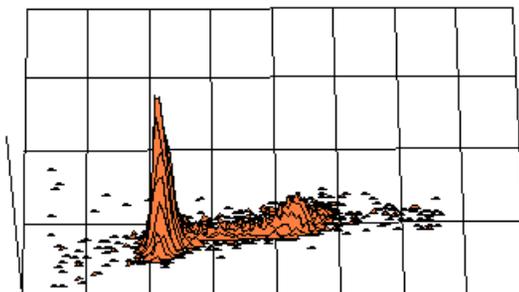
R4: % de fase G_2/M

R8: % de fase S (sintetizando DNA)

0.4% FBS



10% FBS sin IgG



10% FBS

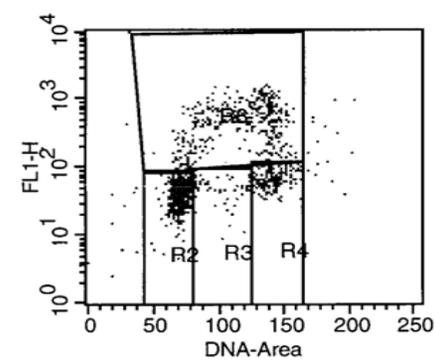
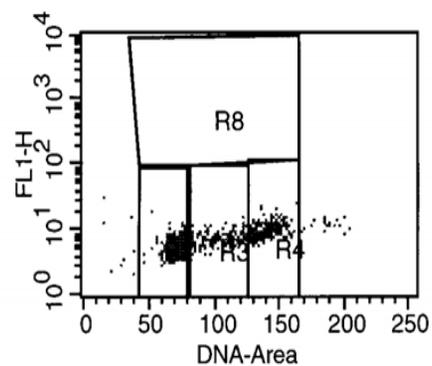
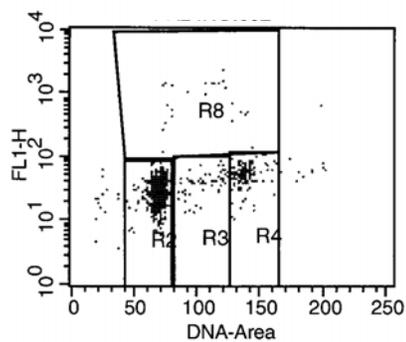
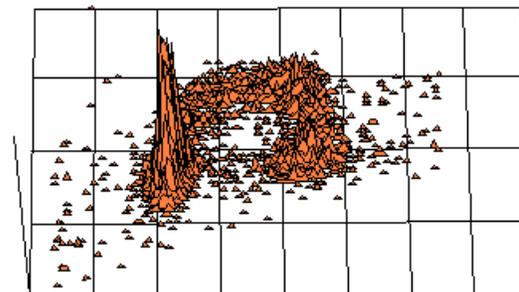
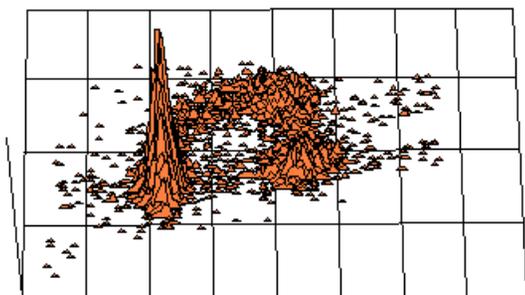


Figura 57.- Incorporación de BrdU a células ayunadas (0.4% FBS), células control sin anticuerpo (10% FBS sin IgG) y células control normal (10% FBS). La fila de arriba muestra el registro en el citómetro de flujo, y la fila de abajo el correspondiente análisis por zonas (R8: células en fase S sintetizando DNA).

RG 20-100 30 $\mu\text{g/ml}$



RG 20-100 10 $\mu\text{g/ml}$

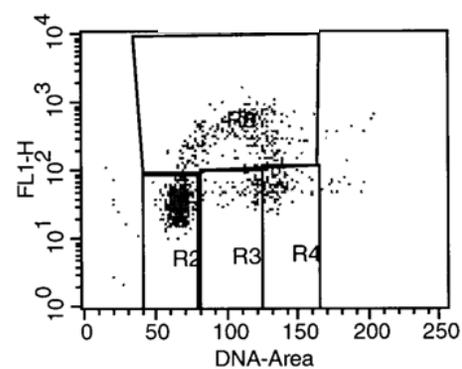
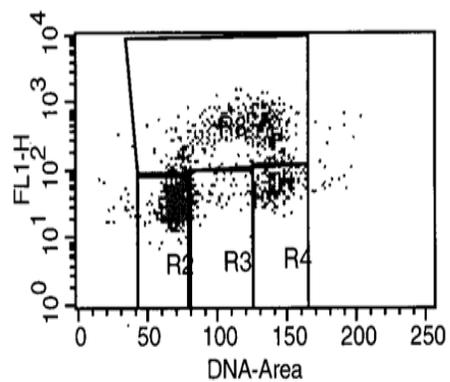
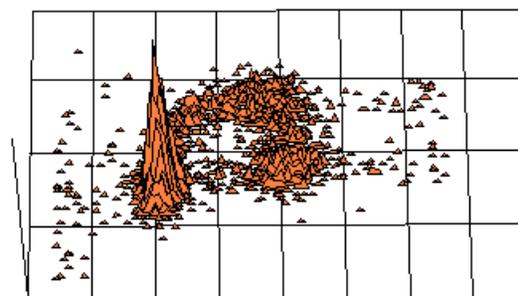


Figura 58.- Incorporación de BrdU a células tratadas con RG 20-100 (10 y 30 $\mu\text{g/ml}$). La fila de arriba muestra el registro en el citómetro de flujo, y la fila de abajo el correspondiente análisis por zonas (R8: células en fase S sintetizando DNA).

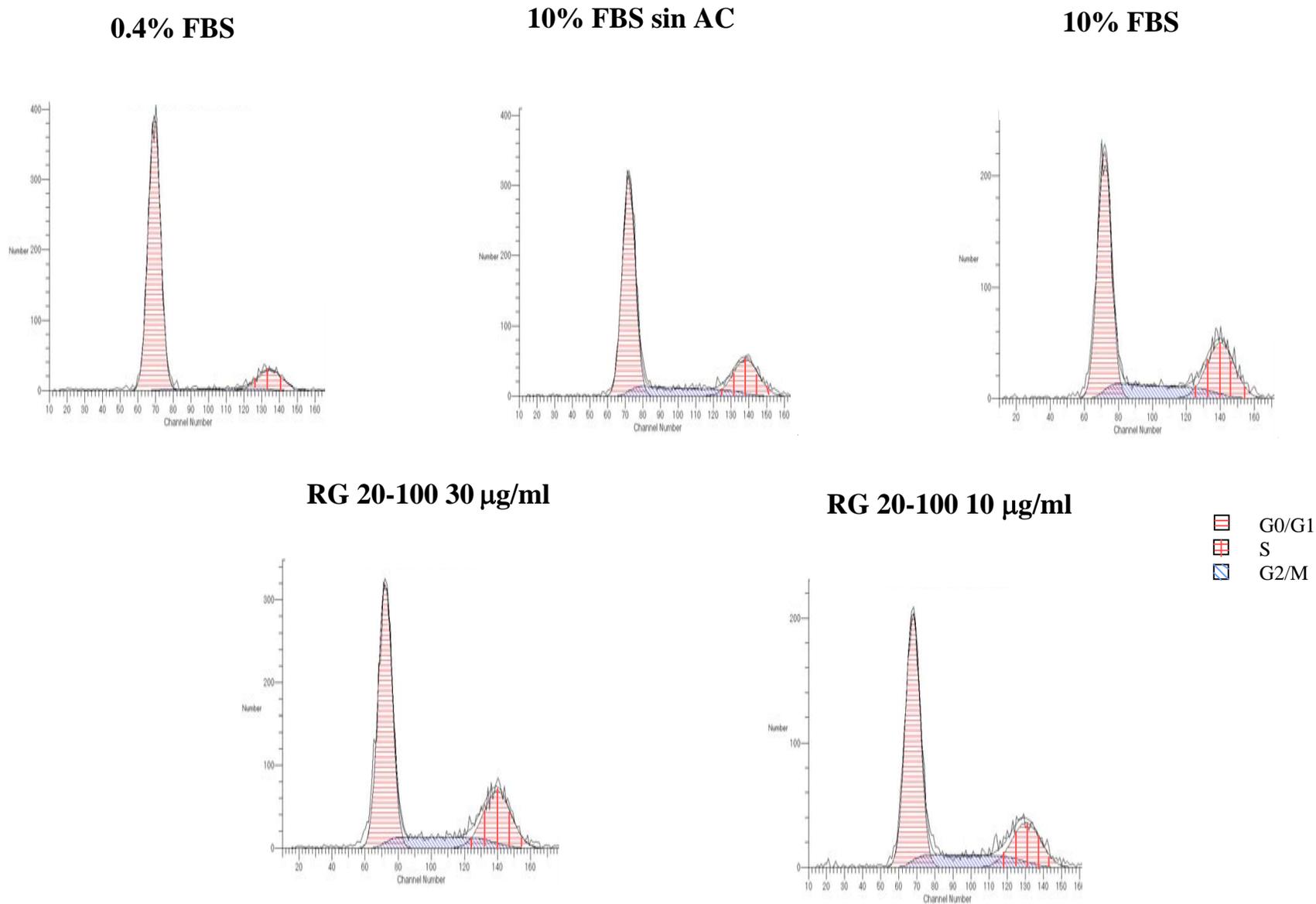
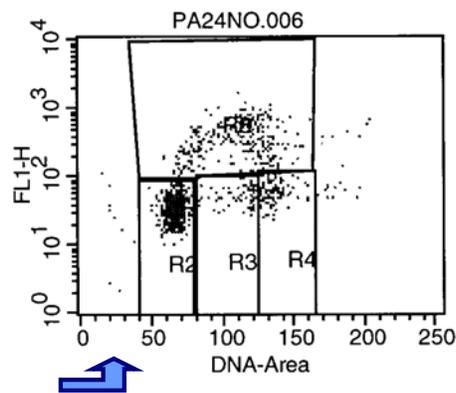


Figura 55.- Diferentes fases del ciclo celular (G_0/G_1 , S, G_2/M) en células control ayunadas (0.4% FBS), estimuladas con 10% FBS y estimuladas con un 10% de FBS + RG 20-100 (10 y 30 µg/ml).

Asimismo, si se observa el registro de la incorporación de BrdU obtenido en el citómetro de flujo (Figuras 57 y 58) también se puede deducir si la fracción RG 20-100 produce o no apoptosis, ya que si observamos la zona de la izquierda (0-50 DNA-area)(flecha azul), podemos ver la posible apoptosis producida en las células. Así, si comparamos en las Figuras 57 y 58 la apoptosis de los grupos control con la apoptosis de los grupos tratados, observamos que no existen diferencias significativas entre ellos.



DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en el mundo occidental. Existen evidencias de que la rotura de placas ateroscleróticas seguida de la formación de trombos es el fenómeno responsable de las manifestaciones clínicas más graves.

Se han identificado como factores de riesgo de sufrir estas enfermedades cardiovasculares los niveles elevados de colesterol y LDL y los bajos niveles de HDL, así como la elevada presión arterial, la obesidad, diabetes y los elevados niveles de factores hemostáticos. La primera línea de actuación a la hora de combatir o prevenir estos factores de riesgo es la modificación de la dieta y el aumento de la actividad física (Pyörälä y cols., 1994).

Ya desde la antigüedad el ajo ha sido estudiado por sus efectos beneficiosos en la salud (Harris, 1995), y en los últimos años son numerosas las investigaciones entorno al ajo o alguno de sus componentes. Sin embargo, también es significativa la controversia en cuanto a sus propiedades. Sticher y cols. en 1991 dieron una explicación a este hecho al sugerir que estas diferencias observadas se debían a las diferencias en la cantidad de componentes activos y en la forma de elaboración de las distintas preparaciones de ajo. Los extractos y fracciones de ajo utilizadas en esta tesis doctoral, no han sido previamente estudiadas, asimismo, la forma de elaboración era novedosa y de propiedades desconocidas. Nos propusimos por tanto, su estudio sobre la reactividad vascular y sobre los niveles de colesterol en un modelo de aterosclerosis inducida en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol durante cuatro meses (estudio crónico *ex vivo*). Asimismo, nos propusimos el estudio de su posible mecanismo de acción realizando un estudio *in vitro* en aorta y mesentérica de rata wistar. Y por último, estudiamos su efecto directo sobre células musculares vasculares lisas de aorta de rata en cultivo celular.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

I.- ESTUDIO CRÓNICO EX VIVO: EFECTO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL DESARROLLO DE LA ATEROSCLEROSIS EN RATAS HIPERCOLESTEROLÉMICAS.

I.1.- EFECTOS SOBRE EL PESO CORPORAL, DEL CORAZÓN, HÍGADO Y RIÑONES

Los resultados obtenidos demostraron que ni el tratamiento con una dieta hipercolesterolémica, ni con los extractos y fracciones de ajo producían alteraciones en el peso de las ratas al final de los cuatro meses de estudio. Estos hallazgos están de acuerdo con los encontrados por otros investigadores: Efendy y cols. 1997, Isaacsohn y cols. 1998 y Berthold y cols. 1998. Sin embargo, otros estudios han detallado un menor incremento del peso corporal cuando se administraba aceite de ajo y una dieta rica en lípidos a ratas, comparado con el aumento de peso que se producía en ratas alimentadas con una dieta rica en lípidos sólo (Shoetan y cols., 1984).

Respecto a los riñones, se observó un aumento significativo del tamaño en el grupo hipercolesterolémico, que se previno en los grupos tratados con ajo. Diversos estudios han demostrado una implicación directa de los lípidos sanguíneos como moduladores del daño glomerular progresivo (Guijarro y Keane, 1994; Guijarro y cols., 1995). En estos estudios, hay evidencias de que la hipercolesterolemia produce un daño glomerular tanto a corto como a largo plazo. Entre los efectos a corto plazo, aparecen un flujo temprano de macrófagos hacia el riñón lo que se asocia con un aumento del tamaño glomerular, una expansión de la matriz mesangial, depósitos lipídicos, y formación de células espumosas. También se ha observado mediante técnicas inmunocitoquímicas un aumento del colágeno tipo IV, de la fibronectina y laminina en ratas alimentadas con colesterol, así como un aumento de la expresión del factor TGF- β 1 que mediaría la acumulación de matriz mesangial en los estados hipercolesterolémicos. Como se mencionó en la introducción, ha sido ampliamente demostrado por numerosos autores la capacidad del ajo de disminuir los lípidos sanguíneos así como su capacidad antioxidante, lo que podría explicar la prevención

en el aumento del tamaño de riñón observado en los grupos tratados con ajo frente al grupo hipercolesterolémico.

El hígado es el principal lugar donde se produce la síntesis de colesterol y lipoproteínas y donde se produce el aclaramiento o eliminación del mismo (Spady y Dietschy, 1985; Dietschy y cols., 1993). En nuestro estudio observamos un aumento significativo del tamaño del hígado en el grupo tratado con la dieta rica en colesterol, que se previno con todos los grupos alimentados con ajo. Este aumento del tamaño del hígado se podría explicar ya que en la hipercolesterolemia se ve aumentada la necesidad de aclaramiento del colesterol, produciéndose un transporte masivo de colesterol al mismo (Miller y cols., 1985). Por otra parte, el ajo aumenta la degradación lipídica (Shoetan y cols., 1984) que se produce en el hígado, esto podría explicar la prevención en el aumento del tamaño del mismo. Algunos estudios animales también demostraron que algunos componentes del ajo inhibían la síntesis de lípidos por las células del hígado (Qureshi y cols., 1983 a y b; Yeh y Yeh, 1994).

I.2.- EFECTOS DEL AJO SOBRE EL COLESTEROL TOTAL

Los niveles elevados de colesterol están directamente relacionados con un aumento del riesgo de sufrir una enfermedad coronaria (Verschuren y cols., 1995). Niveles por encima de 5.17 mmol/l (200 mg/dl) se consideran el punto por encima del cual se deberían considerar estrategias de reducción de los niveles de colesterol. Los fármacos usados para disminuir los niveles de colesterol incluyen los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (estatinas), secuestradores de los ácidos biliares, fibratos y nicotínatos. Sin embargo, ninguno de estas opciones farmacológicas carecen de efectos adversos y algunos se han asociado con una potencial carcinogenicidad (Newman y Hulley, 1996), por ello, en los países industrializados del oeste está aumentando cada vez más el uso de alternativas o medicinas complementarias (Eisenberg y cols., 1993).

El colesterol, los triglicéridos y otras moléculas grasas de nuestra sangre, provienen de tres posibles fuentes:

- Ingestión de comida rica en grasa: lo que nuestro cuerpo no use, será almacenado en los tejidos y “desbordado” en el torrente sanguíneo.

- Lipogénesis endógena: casi todas las células de nuestro organismo pueden fabricar moléculas grasas, pero la principal fuente son las células del hígado y del tejido adiposo.

- Por una disminución de la degradación y eliminación de lípidos: normalmente, nuestro cuerpo degrada las moléculas grasas a través de un proceso normal de gasto de energía y con la excreción de los subproductos. Si éste proceso no tiene lugar regular o eficientemente, se producirá un acúmulo de lípidos en el cuerpo.

Respecto a la segunda y la tercera fuente, hay ciertos factores como el alcohol que pueden contribuir al acúmulo de lípidos en sangre y tejidos. El alcohol, produce por un lado, un aumento en la síntesis endógena de colesterol y otros lípidos, y por otro, una disminución de la degradación de los lípidos de la dieta. Sin embargo, cuando las ratas eran alimentadas con una dieta rica en grasa y se les daba alcohol mezclado con aceite de ajo, no se observó ningún aumento de lípidos tisulares o sanguíneos, lo que indicaba que el ajo disminuía la lipogénesis endógena y/o aumentaba la degradación lipídica (Shoetan y cols., 1984).

Como se ha explicado anteriormente distintos estudios animales también demostraron que algunos componentes del ajo inhibían la síntesis de lípidos por las células del hígado (Qureshi y cols., 1983 a y b; Yeh y Yeh, 1994). Así, el ajo disminuye la actividad de varias enzimas lipogénicas incluyendo la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y la enzima málica (Chi, 1982; Chi y cols., 1982; Qureshi y cols., 1983 a y b), así como la enzima colesterogénica 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (Qureshi y cols., 1983 a, 1983 b; Qureshi y cols., 1987). De esta forma, resulta razonable pensar que el efecto hipolipidémico del ajo es consecuencia de su capacidad de disminuir la lipogénesis y la colesterogénesis en el hígado. Sin embargo, la máxima inhibición de la colesterogénesis hepática parece requerir múltiples componentes del ajo, tanto hidrofóbicos, hidrofílicos, o ambos.

Por otra parte, estudios llevados a cabo por Itokawa y cols. en 1973 y Adoga y Osuoi en 1986 demostraron que alimentando a ratas con ajo se produce una disminución de la actividad de algunas enzimas importantes implicadas en la síntesis de lípidos, no sólo en el hígado, sino también en otros tejidos adiposos.

Se postula, por tanto, que el ajo actúa sobre las tres principales causas de hiperlipidemia:

1. “Mueve” los lípidos de sus depósitos tisulares hacia la circulación sanguínea, y posterior excreción del organismo.
2. Inhibe o reduce la lipógenesis endógena.
3. Aumenta la degradación de los lípidos y la eliminación de los subproductos por el tracto intestinal.

Estos mecanismos podrían explicar la reducción de los niveles de colesterol encontrados en este estudio, sin embargo, sería necesario estudiar más a fondo estos extractos para elucidar su posible mecanismo de acción. No obstante, las fracciones 20-100 contienen un alto porcentaje de saponinas esteroídicas, y ha sido demostrada anteriormente por diversos autores la capacidad de las mismas de inhibir la absorción intestinal de colesterol así como su capacidad de reducir el colesterol en diversos modelos animales (Harwood y cols., 1993; Hosttetman y Marston, 1995; Matsuura, 2001); Esto podría explicar el descenso importante en los niveles de colesterol encontrado con estas fracciones.

Sin embargo, existe una gran controversia respecto a las propiedades hipolipemiantes del ajo; muchos estudios han demostrado la capacidad de ciertas preparaciones de ajo de disminuir los lípidos sanguíneos, aunque también otros han encontrado poca o ninguna actividad (Arora y Arora 1981; Simons y cols., 1995). Los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre los niveles de colesterol coincidieron con otros estudios previos que demostraron la eficacia del ajo para disminuir los niveles de colesterol total. Algunos de estos estudios se encuentran recogidos en la tabla siguiente:

Autor	Preparación de ajo	Trata- miento	Colesterol total		Triglicéridos	
			Antes	Después	Antes	Después
Auer, 1990	Kwai, 600mg	12 sem.	268	230 *	171	140*
Zimmerman y Zimmerman, 1990	Kwai, 900mg	3 sem.	287	260(9%)	253	206(19%)
Vorberg y Schneider, 1990	Kwai,900mg	16 sem.	294	230***	207	156*
Brosche y cols, 1990	Kwai,600mg	3 meses	260	240***	207	174*
Jain y cols., 1993	Kwai,900mg	12 sem.	262	247**	151	165
Morcos, 1997	Aceite de pescado+ ajo 1200mg	1 mes		↓ 11%		↓34%
Lash y cols., 1998	No conocida	12 sem.		↓5-6%		
Stevinson y cols., 2000 (revisión 13 estudios)	monopreparacio -nes	≤10 meses		↓ 0.41 mmol/l		

Tabla 13

*Kwai: preparación estándar con un 1.3% de alicina

*Los asteriscos representan la significación (*p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001), o el porcentaje de cambio (%).

* Todos los estudios se realizaron en humanos.

I.3.- EFECTOS DEL AJO SOBRE LAS HDL Y LDL

Como ya se conoce, la utilización de una dieta hipercolesterolémica conduce a un aumento de los niveles plasmáticos de colesterol total y LDL, y a una disminución de los de HDL con respecto a una dieta normocolesterolémica. Esto supone el depósito de las lipoproteínas en la pared vascular que serán oxidadas

modificándose su comportamiento biológico y pasando a ser citotóxicas y lesivas para el endotelio, y quimiotácticas para los monocitos que las fagocitan transformándose en células espumosas. La muerte y lisis de estas células desencadena un proceso inflamatorio que tiene como resultado la formación de la placa de ateroma.

En esta tesis doctoral observamos al final del cuarto mes de tratamiento, que la dieta rica en colesterol administrada al grupo control hipercolesterolémico produjo un aumento significativo del colesterol total y de las LDL y una disminución de las HDL. El tratamiento con ajo produjo una disminución de LDL en prácticamente todos los grupos y un aumento de HDL en el grupo RG 20-100 respecto al grupo hipercolesterolémico al final del cuarto mes de tratamiento. Esto coincide con los estudios llevados a cabo por Lau y cols. en 1987 que demostraban una disminución de las LDL a partir del tercer mes de tratamiento y con estudios más recientes llevados a cabo por Stevinson y cols. en el año 2000 que tras reunir los datos de otros 13 estudios llevados a cabo en pacientes hipercolesterolémicos con un total de 796 personas concluyó que el ajo producía un aumento de las HDL, una disminución de las LDL y una disminución del colesterol total en un 5.3%.

I4.- EFECTOS SOBRE LA PLACA DE ATEROMA

La oxidación de las LDLox juega un importante papel en la iniciación y progresión de la aterosclerosis (Steinberg y cols., 1989; Cox y Cohen, 1996; Aviram, 2000). Esta oxidación promueve la disfunción endotelial de los vasos sanguíneos por ejercer en su endotelio una citotoxicidad directa (Kuzuya y cols., 1991) al aumentar las propiedades quimiotácticas de los monocitos (Quinn y cols., 1987), y al transformar los macrófagos en células espumosas (Henriksen y cols., 1981). Todos estos eventos contribuyen a la aparición de la aterosclerosis. Por otra parte, el desarrollo de la placa de ateroma tiene un origen multifactorial, otros factores también contribuyen a su desarrollo: en la hipercolesterolemia se produce además, la reducción de la cantidad de colesterol transportado por las HDL en relación con el transportado por las LDL, el aumento de la liberación de factores quimiotácticos y

mitógenos para las células musculares, se pierde la superficie antitrombogénica, dominando la actividad procoagulante y disminuye la síntesis de NO que previene la adhesión de leucocitos a la pared arterial actuando de forma sinérgica con las PGI₂ (Radomski y cols., 1987).

Las alteraciones funcionales producidas por el aumento de los niveles de colesterol y LDL oxidadas en la circulación o en la pared arterial contribuyen a la aparición de manifestaciones clínicas en pacientes con aterosclerosis como consecuencia de la ruptura de la placa, que al liberar su contenido al torrente sanguíneo produce la activación de las plaquetas, la formación de trombos y la oclusión del vaso. Las LDL oxidadas podrían promover la ruptura de la placa. La capacidad de las LDL oxidadas para aumentar la sensibilidad del vaso a estímulos contráctiles podría favorecer esta ruptura. Además, la alteración de la función endotelial ocasionada por las LDL oxidadas aumentaría el estrés de rozamiento en la circulación coronaria, lo que contribuye a disminuir la estabilidad de la placa y favorecer su ruptura (Loree y cols., 1992). La agregación plaquetaria que se produce cuando existe un endotelio disfuncionante, como ocurre en vasos ateroscleróticos, estaría agravada por las LDL oxidadas dando lugar a vasoespasmo, y dependiendo de la gravedad del trombo, a infarto y muerte.

Existen múltiples estudios sobre diferentes extractos de ajo que confirman la capacidad de los mismos de reducir el tamaño de la placa aterosclerótica, así como los cambios que inducen en la apariencia histológica de la placa fibrosa grasa en la arteria carótida derecha. De igual modo, se ha observado una disminución de la formación de las estrías grasas y de la acumulación del colesterol en la aorta torácica (Heinle y Betz, 1994; Berthold y cols., 1998; Stevinson y cols., 2000; Campbell y cols., 2001). Algunos incluso han observado estos efectos independientemente de cualquier cambio en los niveles de colesterol total (Efendy y cols., 1997). Con los extractos usados en esta tesis doctoral, observamos una disminución significativa de la extensión de lesiones ateroscleróticas con todos los grupos estudiados. Si a su vez, nos fijamos en la disminución de las LDL, el aumento de las HDL y el aumento del óxido nítrico observado en los demás experimentos realizados, se podría explicar

esta disminución de la placa aterosclerótica. Además, ha sido ampliamente descrita la propiedad antioxidante del ajo, y por tanto su capacidad de evitar la oxidación de las LDL (Lewin y Popov, 1994). Esto también podría contribuir al efecto obtenido, aunque no ha sido estudiado en esta tesis doctoral.

I.5.- EFECTOS SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR

Durante el proceso de aterosclerosis se han observado alteraciones en la reactividad vascular, incluyendo una disminución de la vasodilatación dependiente de endotelio y un aumento de la respuesta frente a noradrenalina (Howes y cols., 1997).

I.5.1.- RESPUESTA FRENTE A AGENTES VASOCONSTRICTORES

En nuestro estudio observamos en el grupo hipercolesterolémico al cabo de los cuatro meses de tratamiento un aumento en la respuesta a noradrenalina. Esto se podría explicar al observar el aumento paralelo observado en las LDL. Existen evidencias de que las lipoproteínas podrían aumentar la respuesta vascular frente a agentes vasoconstrictores por acción directa sobre el músculo liso vascular y a través de mecanismos que no están relacionados con la alteración de la relajación mediada por NO. Se ha propuesto como razón del aumento de la respuesta vasoconstrictora de los vasos ateroscleróticos frente a determinados agonistas el incremento del número de receptores adrenérgicos o de su afinidad (Nanda y Henry, 1982) pero no parece ser adecuada porque cuando se elimina el calcio extracelular o se bloquea su entrada en las células, el aumento de la sensibilidad frente a noradrenalina inducida por el colesterol desaparece (Broderick y cols., 1989). Otra posible explicación sería la alteración de la membrana de las células musculares lisas como consecuencia de la exposición a colesterol, haciéndola más sensible ante la estimulación de los receptores adrenérgicos (Broderick y cols., 1989).

La oxidación de las LDL parece ser un factor importante en la potenciación de estos efectos vasoconstrictores (Galle y Bassenge, 1991). Los mecanismos

involucrados en el aumento de las respuestas vasoconstrictoras en presencia de LDL oxidadas no están del todo claros. Strickberger y cols., en 1988, indicaron que los niveles de calcio en músculo liso de arterias ateroscleróticas de conejos eran elevados. En células musculares lisas en cultivo, se observó que el aumento de colesterol en la membrana plasmática producía un aumento de los niveles de calcio en el citoplasma de estas células (Gleason y cols., 1991). Puesto que los bloqueantes de canales de calcio anulan este efecto, se ha sugerido que un aumento en el contenido de colesterol de las membranas celulares podría producir alteraciones en la bicapa lipídica e inducir cambios en la conformación o en la posición de las proteínas de los canales de calcio, activando de esta forma canales que previamente eran “silenciosos”. Así, el aumento de la respuesta vascular frente a vasoconstrictores asociada a la hipercolesterolemia parece estar mediada por cambios en el contenido de colesterol de las membranas de las células del músculo liso vascular lo que resulta en un aumento de la entrada de calcio. La idea del aumento generalizado de la permeabilidad de la membrana al calcio en las células musculares lisas como consecuencia de la exposición a niveles elevados de colesterol es sostenida por algunos (Yokoyama y Henry, 1979; Orlov y cols., 1993; Thorin y cols., 1994) pero no por todos los estudios (Heistad y cols., 1984). Fleischhacker y cols., en el 2000 observaron también cambios significativos en la distribución del Ca^{2+} subcelular en células musculares lisas, así como un aumento de aniones superóxido en arterias uterinas de pacientes hipercolesterolémicos, lo que produciría una disminución de la relajación dependiente de endotelio así como un aumento en la contractilidad vascular en respuesta a NA o KCl.

Los niveles elevados de LDL podrían aumentar también las respuestas vasoconstrictoras como consecuencia del aumento de la liberación de endotelina. En pacientes con hipercolesterolemia se han encontrado niveles elevados de ET-1 en plasma en relación con los controles (Haak y cols., 1994). Se ha observado que las LDL oxidadas inducen la expresión y liberación de endotelina en células endoteliales de humanos (Boulanger y cols., 1992), y que esta potencia las respuestas vasoconstrictoras frente a noradrenalina (Yang y cols., 1990). Sin embargo, no se sabe hasta qué punto el aumento de la liberación de endotelina es consecuencia de la

falta de actividad del NO, puesto que el NO es capaz de suprimir la liberación de esta (Cao y cols., 1994).

Así, en nuestros experimentos, cuando estudiamos los efectos sobre la reactividad vascular en arteria aorta, encontramos un aumento de la reactividad frente a NA como consecuencia de la dieta hipercolesterolémica, lo que está de acuerdo con trabajos anteriores (Nanda y Henry, 1982; Heistad y cols., 1984; Broderick y cols., 1989). Sin embargo, a pesar de la capacidad de todos los extractos y fracciones de ajo de disminuir las LDL observada anteriormente, así como su capacidad antioxidante, lo que podría hacer esperar una prevención de este aumento de la contractilidad, sólo se previno en el caso de la fracción RG 20-W, aunque no de forma significativa.

1.5.2.- RELAJACIÓN DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE ENDOTELIO

Numerosos estudios han demostrado la falta de actividad del óxido nítrico en respuesta a agonistas como la acetilcolina o bradiquinina en arterias ateroscleróticas de conejos u otras especies, y en pacientes con enfermedad coronaria (Harrison, 1996; Matthys y Bult, 1997). Sin embargo, algunos estudios muestran que la superficie del vaso cubierta por endotelio es similar en vasos normales y ateroscleróticos (Frieman y cols., 1986; Simonsen y cols., 1991). En estudios realizados en aorta de conejo donde se encuentra alterada la relajación colinérgica, se ha visto que el endotelio permanece intacto y sólo se observan ligeros cambios en la estructura de la célula endotelial (Habib y cols., 1986; Verbeuren y cols., 1986). Por tanto, la alteración de la relajación dependiente de endotelio en vasos ateroscleróticos podría no ser atribuida a la pérdida de endotelio. Estas alteraciones en la relajación parecen deberse a un proceso multifactorial que implicaría cambios a nivel del músculo liso, disminución de la liberación de factor relajante derivado de endotelio y destrucción del NO por los constituyentes de la placa de ateroma (Verbeuren y cols., 1986, 1990).

Minor y cols., en 1990 detectaron un aumento de la producción de NO vascular en situaciones de hipercolesterolemia con lo que la alteración de la vasodilatación mediada por NO sería resultado de una falta de eficacia del NO más que de una falta de producción de este. Existen estudios que muestran un aumento de la expresión de la NO sintasa inducible en estados avanzados de aterosclerosis (Esaki y cols., 1997) que, en las áreas necrosadas de la placa, parece ser capaz de generar grandes cantidades de O_2^- (Xia y Zweier, 1997). Sin embargo, estudios realizados por Hernández-Perera y cols. y Vidal y cols. en 1998 mostraron que las LDL oxidadas reducían la expresión de la NO sintasa en las células endoteliales por lo que en la disfunción endotelial estarían implicados tanto el aumento de la degradación de NO como la reducción de su síntesis.

Otra alteración que podría contribuir a la disminución de la relajación inducida por ACh en situaciones de hipercolesterolemia sería el engrosamiento de la pared vascular que se comporta como una barrera dificultando la difusión del NO hacia las células musculares lisas (Ross, 1993; Ross, 1999).

Un tercer factor que podría participar en la alteración de la respuesta dependiente de endotelio en situaciones de aterosclerosis serían los cambios en la composición lipídica y fluidez de la membrana que alteran la afinidad del músculo vascular por EDRF o la liberación de EDRF (Lurie y cols., 1985). Cambios en la composición lipídica de las membranas de las células endoteliales podrían producir alteraciones en la afinidad o el número de receptores de tal forma que el EDRF no pudiera ser producido por el endotelio.

La oxidación de las LDL parece ser un factor importante en la alteración de la vasodilatación dependiente de endotelio por las LDL (Galle y Bassenge, 1991). Se han propuesto varios mecanismos para justificar este hecho. La administración de SOD atenúa el deterioro de la relajación endotelio dependiente inducido por el colesterol en conejos (White y cols., 1994). Galle y Bassenge, en 1991, mostraron que el NO liberado de células endoteliales en cultivo era inactivado por las LDL oxidadas. En otro estudio, la estimulación de la guanilato ciclasa en el músculo liso

vascular por el NO era disminuida de forma dosis dependiente por las LDL oxidadas (Schmidt y cols., 1991). Lípidos como la lisolecitina y la lisofosfatidilcolina de las LDL oxidadas parecen participar en la inactivación del NO por las LDL oxidadas (Mangin y cols., 1993). También existen evidencias de que las LDL aumentan la producción de anión superóxido (O_2^-) por las células endoteliales (Ohara y cols., 1993), resultando en un aumento de la inactivación del NO.

Los efectos de otras lipoproteínas sobre la reactividad vascular han sido poco estudiados. Estudios epidemiológicos han mostrado una relación inversa entre los niveles de HDL en suero y el desarrollo de aterosclerosis (Dawber, 1980; Philip y cols., 1987), pero el mecanismo fisiopatológico aún no está claro. Las HDL parecen revertir la inhibición de la relajación dependiente de endotelio en respuesta a ACh que tiene lugar en presencia de LDL en preparaciones de aorta de conejo (Matsuda y cols., 1993). Algunos trabajos han sugerido que las HDL podrían proteger a las LDL frente a la modificación oxidativa, estando involucradas en este efecto algunas de las enzimas localizadas en las HDL, principalmente la paraoxonasa (Mackness y Durrington, 1995). De esta forma niveles elevados de HDL podrían proteger frente a la alteración de la respuesta vasodilatadora mediada por NO que acompaña a niveles altos de LDL.

Nuestros resultados confirman estudios previos que muestran una disfunción endotelial en arterias aorta procedentes de animales hipercolesterolémicos (Verbeuren y cols., 1986; Jayakody y cols., 1988). Respecto a los grupos tratados con ajo, aunque prácticamente todos mejoraron la relajación inducida por ACh, sólo las fracciones 20-W se acercaron de forma significativa a la relajación del grupo control normal. Se han propuesto varios mecanismos por los cuales se podría explicar este efecto: el ajo aumenta la actividad de la óxido nítrico sintasa, la enzima que aumenta los niveles de óxido nítrico en el cuerpo (Das y cols., 1995a, 1995b), también se ha descrito su capacidad antilipidémica (Zimmerman y Zimmerman, 1990; Jain y cols., 1993) y antioxidante (Yamasaki y cols., 1994) evitando así la oxidación de las LDL y el posible daño endotelial, además, el ajo produce una disminución del grosor de la neointima mejorando la difusión del NO (Heinle y Betz, 1994). Por otra

parte, el análisis de los aminoácidos del ajo reveló que es una fuente rica de L-arginina, el precursor del NO, sin embargo, no se vio que fuera la responsable de la activación de la NOs (Das y cols., 1996).

En contraste, la relajación independiente de endotelio, no se vio alterada al final del tratamiento con la dieta hipercolesterolémica, pero sin embargo, empeoró con varias de las fracciones y extractos excepto con RG 20-W, FG 20-W, FG 20-100 y FG 20-20.

II.- ESTUDIO IN VITRO: EFECTO DE LAS FRACCIONES Y EXTRACTOS DE AJO SOBRE EL MÚSCULO LISO VASCULAR

II.1.- AORTA: EFECTOS SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR

II.1.1.- EFECTOS DIRECTOS EN AORTA

Existen diferentes mecanismos propuestos para el efecto vasodilatador que ejerce el ajo:

- Algunos estudios han demostrado que el ajo es un potente vasodilatador (Siegel y cols., 1991; Agel y cols., 1991) y que este mecanismo podría ser debido a una inhibición de la entrada de calcio extracelular así como a una inhibición de la salida de calcio intracelular.

- Otros estudios sugieren que este efecto es debido a la propiedad del ajo de aumentar la actividad de la óxido nítrico sintasa, la enzima que aumenta los niveles de óxido nítrico en el organismo (Das y cols., 1995a, 1995b).

- Y a su vez, otros estudios adjudican este efecto vasodilatador a una posible acción del ajo sobre la apertura de los canales de K^+ dependientes de calcio en la membrana del músculo liso vascular, produciendo una hiperpolarización. Esta

hiperpolarización cierra aproximadamente el 20% de los canales de calcio tipo L, produciéndose una vasodilatación (Siegel, 1992, 1999).

- Finalmente hay investigadores que proponen un mecanismo dual, es decir, que la relajación de las arterias producida por el ajo tiene un componente predominantemente endotelial (aumenta la producción de NO), pero también tiene un efecto directo sobre el músculo liso vascular probablemente vía hiperpolarización de la membrana celular y/o inhibición de la apertura de los canales de calcio (Fallon y cols., 1998)

En una primera parte del estudio in vitro, nos propusimos estudiar los efectos directos de los extractos y fracciones de ajo sobre arteria aorta de ratas wistar. Para ello, estudiamos diferentes parámetros:

- A nivel basal, es decir, el efecto producido sobre arterias con una contracción basal de 1 gramo. No se produjeron efectos significativos que alteraran la tensión basal.

- Los resultados obtenidos en nuestro estudio cuando relajamos con ajo arterias precontraídas con NA 10^{-6} M ó KCl 80 mM, muestran que con la mayoría de los extractos y fracciones estudiados se produjo una relajación de la contracción que en la mayoría de los casos fue mayor si la arteria estaba precontraída con NA 10^{-6} M que con KCl 80 mM:

* Fracciones 20-20: relajaron la contracción producida por NA pero no la de KCl. Al contraer con KCl la relajación posterior no puede ser debida a una salida de potasio con la consiguiente hiperpolarización sino a otros mecanismos en los que estaría implicado el calcio. Así, si las fracciones 20-20 relajan la contracción de NA y sin embargo al contraer con KCl esta relajación desaparece, sugiere que la relajación producida por estas fracciones podría ser debida mayoritariamente a una hiperpolarización. Esto coincide con los estudios realizados por Siegel y cols. en 1992 y 1999.

* Extractos (RG EXT y FG EXT): en este caso, la relajación de la contracción por NA fue significativamente mayor que la relajación de la contracción producida por KCl, que no desapareció totalmente. Esto sugiere que además de un mecanismo a través de la hiperpolarización, podría existir algún otro mecanismo implicado probablemente calcio-dependiente.

*Fracciones 20-100: las fracciones 20-100 relajaron prácticamente lo mismo (casi el 100%) en ambos casos (NA y KCl). Esto sugiere que el mecanismo vasodilatador es debido a otro diferente de la hiperpolarización, posiblemente relacionado con el calcio.

- Respecto a la inhibición de la contracción producida por NA 10^{-6} M o KCl 80 mM, también fue mayor cuando se contraía con NA 10^{-6} M que cuando se hacía con KCl 80 mM, sólo en los casos de las fracciones 20-100 esta inhibición fue similar. Esto sugiere que en todos los casos habría una inhibición tanto de la entrada de calcio extracelular como de la salida de calcio del retículo. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por Siegel y cols. en 1991 y Agel y cols. en 1991. En las fracciones 20-100 estarían implicados por igual en esta inhibición los canales de calcio dependientes de agonista (NA) (ROC) como los canales de calcio dependientes voltaje (KCl) (VOCs), mientras que en las demás fracciones o extractos, predominaría una inhibición de los canales de calcio dependientes de agonista (ROC).

II.1.2.- MECANISMO DE ACCIÓN DE RG 20-100

En la segunda parte de nuestro estudio *in vitro* intentamos elucidar el posible mecanismo de acción de RG 20-100 sobre la reactividad vascular, ya que con los resultados anteriormente obtenidos observamos que esta fracción era la que ejercía un efecto mayor sobre la reactividad vascular de forma general, aunque muy similar a la fracción FG 20-100. Sin embargo consideramos más interesante centrarnos en la fracción cruda en lugar de la congelada al ser más habitual su uso en la alimentación.

Así quisimos estudiar más en profundidad si ejercía un efecto sobre el endotelio vascular, sobre el músculo liso o sobre ambos. De este modo, a nivel de endotelio, realizamos diferentes experimentos:

- Observamos que en presencia de indometacina (inhibidor de las prostaglandinas) la curva de relajación con ajo no era significativamente diferente de la obtenida en ausencia de indometacina, lo que hacía prever que la relajación producida por ajo no estaba mediada a través de las prostaglandinas.
- En presencia de L-NAME la curva de relajación con ajo tampoco fue significativamente diferente de la obtenida en ausencia de L-NAME. Esto indicaba la no implicación del NO en la relajación producida por la fracción RG 20-100 y un posible efecto directo del ajo sobre el músculo liso vascular,
- Para corroborar que el mecanismo de acción era independiente de endotelio, relajamos con ajo las arterias precontraídas con NA 10^{-6} M en presencia o en ausencia de endotelio, y observamos una relajación idéntica en ambos casos. Esto confirmaba la ausencia de efecto de los factores derivados de endotelio en la relajación producida por ajo.

De esta forma, procedimos a estudiar el efecto directo de RG 20-100 sobre el músculo liso vascular:

- Para ello, estudiamos la influencia que pudiera tener el ajo sobre la curva de relajación producida por NPS (relajación independiente de endotelio), y observamos que no se producían diferencias significativas en esta relajación cuando se incubaba con ajo, lo que sugería al menos, la ausencia de toxicidad del ajo sobre el músculo liso vascular ya que no empeoraba la curva a las dosis estudiadas. Asimismo, tampoco activaría el mecanismo donador de NO del NPS, lo que podría sugerir que no actuaría estimulando la guanilato ciclasa ni el GMPc. Por otra parte, tampoco actúa sobre el endotelio como se ha visto

anteriormente, por lo que podríamos postular un mecanismo de acción directo sobre los canales de calcio como un antagonista de calcio.

- Así, quisimos valorar el posible efecto que RG 20-100 pudiera tener sobre la entrada de calcio extracelular o sobre la salida de calcio del retículo sarcoplásmico, ambos mecanismos que desencadenan la vasoconstricción. En nuestro caso, RG 20-100 produjo una disminución de la entrada de calcio extracelular de forma dosis-dependiente como se muestra en los experimentos realizados en medio Krebs 0Ca, así como una inhibición de la salida de calcio del retículo sarcoplásmico como muestra el experimento de Hester. Estas dos circunstancias podrían explicar el posible mecanismo vasodilatador de la fracción RG 20-100 y estaría de acuerdo con Siegel y cols. (1991) y con Agel y cols. (1991). Por otra parte, la ausencia total de efecto sobre el endotelio, sólo ha sido descrita hasta la fecha por Kaye y cols. en el 2000 al estudiar la alicina, un potente vasodilatador presente en el ajo, en el lecho pulmonar de rata.

II.2.- MESENTÉRICA: EFECTOS SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR

Paralelamente al estudio anterior, procedimos a realizar experimentos similares en arteria mesentérica, con el fin de elucidar posibles diferencias entre ambos lechos vasculares, puesto que en la microcirculación periférica es el EDHF el que contribuye mayoritariamente a la relajación dependiente de endotelio (Harasawa y cols., 1997), y el calcio extracelular el que contribuye a su contracción (Cauvin y cols., 1984). Existen estudios sobre la alicina (un componente del ajo) que observaron una vasodilatación del lecho mesentérico que era independiente de la liberación de prostaglandinas o de un mecanismo β -adrenérgico (Mayeux y cols., 1988).

Al igual que en el caso de la aorta, los resultados obtenidos cuando relajamos con ajo arterias precontraídas con NA 10^{-6} M ó KCl 80 mM, muestran que con todos

los extractos y fracciones estudiados se produjo una relajación de la contracción. Sin embargo, pudimos distinguir algunas diferencias: en general todas las fracciones y extractos relajaron más el lecho mesentérico que la aorta, pero en el caso de las fracciones 20-100 esta diferencia no fue significativa ya que en ambos casos la relajación fue próxima al 100%. Podemos resumir los datos obtenidos en la arteria mesentérica:

*Fracciones 20-20: a diferencia de la aorta donde el ajo no relajó la contracción inducida por KCl, en arteria mesentérica si relajó esta contracción y de manera similar al efecto producido con la contracción con NA. Esto implicaría un mecanismo de acción que podría no depender de la hiperpolarización. A pesar de que en la arteria mesentérica ha sido descrita la implicación mayoritaria del EDHF en la relajación de la misma, en este caso estaría implicado otro mecanismo en la relajación, probablemente un bloqueo de la entrada del calcio extracelular.

*Extractos (RG EXT y FG EXT): la relajación de la contracción por NA fue, al igual que en la aorta, significativamente mayor que la relajación de la contracción producida por KCl. Esto sugiere que además de un mecanismo a través de la hiperpolarización, podría existir algún/os otro/s mecanismo/s implicado/s.

*Fracciones 20-100: Al igual que en la aorta las fracciones 20-100 relajaron prácticamente lo mismo (casi el 100%) en ambos casos (NA y KCl). Esto sugiere que el mecanismo vasodilatador es debido a otro diferente de la hiperpolarización y relacionado con el calcio extracelular.

Por otra parte sólo las fracciones 20-100 inhibieron la contracción producida por NA 10^{-6} M y la contracción producida por KCl 80 mM (en este último caso también la inhibió RG 20-20 pero en menor medida). Esto sugiere que la fracción 20-100 produciría una inhibición de la entrada de calcio extracelular. En las fracciones

20-100 estarían implicados por igual en esta inhibición los canales de calcio dependientes de agonista (NA) (ROC) como los canales de calcio dependientes voltaje (KCl) (VOCs).

III.- CULTIVOS CELULARES

Como se indicó en la introducción son múltiples los autores que han descrito los efectos antiproliferativos del ajo: Lee y cols. en 1994, Orekhov y cols. en 1995, Efendy y cols. en 1997, Sooranna y cols., 1997. En nuestro estudio, observamos una inhibición de la proliferación de células musculares lisas de aorta de rata al incubar con dos de las dosis más altas utilizadas (30 y 10 µg/ml). Para comprobar si este efecto era debido a una toxicidad celular y no a una inhibición de la proliferación, medimos la LDH liberada en presencia de ajo, observando que no existía una diferencia significativa con la cantidad de LDH liberada por las células en situación control, lo que evidenciaba una ausencia de toxicidad a las dosis ensayadas. Además, el análisis realizado por citometría de flujo evidenciaba que la presencia de RG 20-100 en el medio de cultivo no producía una apoptosis mayor que en situación control. Esta falta de toxicidad coincide con los resultados obtenidos por Cho y Xu en el año 2000 que observaron que en cultivo de hepatocitos el ajo no producía citotoxicidad a dosis por debajo de 50µg/ml.

Los mecanismos sugeridos por diferentes autores para explicar este efecto antiproliferativo son los siguientes:

- Prevención de la progresión de las células de la fase G₁ a la fase S, y por tanto se produciría una acumulación de las células en la fase G₁ (Xie y cols., 1992).
- Arresto de las células en fase G₂/M debido a una inhibición de la kinasa p34^{cdc2} (Zheng y cols., 1997; Knowles y Milner, 2001).
- Alteración profunda de la fosforilación de varias proteínas del músculo liso incluyendo cambios en las fosfotirosinas.

Además existen otros mecanismos in vivo que podrían explicar asimismo la capacidad antiproliferativa del ajo:

- Por la inhibición de la agregación plaquetaria producida por el ajo (Aritz-Castro y cols., 1992; Lawson y cols., 1992); Esto prevendría la liberación de factores de crecimiento (ej. PDGF), y de las sustancias quimioatrayentes de las plaquetas (Ross y cols., 1974; Asada y cols., 1992), y produciría una disminución de la respuesta hiperplásica de las células musculares lisas secundaria al daño vascular.
- Por el aumento del NO que el ajo produce en el organismo.
- Existen evidencias de la habilidad antineoplásica in vivo e in vitro del componente alil sulfuro presente en el ajo. Esto se explica por un aumento de la fluidez de la membrana celular y una supresión de la adhesión mediada por la integrina IIb-IIa, producida por alteraciones en el colesterol, ácido araquidónico, fofolípidos y/o tioles de la membrana. Este efecto depende de la concentración y duración de la exposición a los componentes azufrados. El alil sulfuro también actúa suprimiendo la proliferación celular al bloquear las células en fase G₂/M (Knowles y Milner, 2000).

Como ya se explicó anteriormente, la fracción RG 20-100 es un potente vasodilatador, con un mecanismo de acción relacionado con la inhibición de la entrada de calcio extracelular y la salida de calcio del retículo sarcoplásmico de la célula muscular. Numerosos estudios han demostrado las propiedades inhibitoras del crecimiento celular de las sustancias vasodilatadoras (Ide y cols., 1994; Gibbons, 1995) lo que podría explicar la capacidad antiproliferativa de RG 20-100.

Con el fin de elucidar en qué punto del ciclo celular actuaba la fracción estudiada, realizamos un estudio por citometría de flujo y aunque no observamos ningún cambio significativo en el porcentaje de células distribuidas en las distintas fases del ciclo (G₀/G₁, S, G₂/M) entre el grupo control y el tratado, el análisis de la síntesis de DNA en la fase S reveló una menor síntesis en los grupos tratados con RG 20-100 lo

que podría explicar el retraso en la división y proliferación celular encontrada a los 8 días de tratamiento con RG 20-100.

CONCLUSIONES

1.- El suplemento con ajo previno el aumento en los niveles plasmáticos de colesterol y disminuyó las LDL en todos los grupos estudiados. En el grupo tratado con RG 20-100 se produjo asimismo, un aumento de las HDL, por lo que se podría considerar a esta fracción como la más favorable para la prevención de la hipercolesterolemia, con un mecanismo de acción probablemente relacionado con su contenido en saponinas esteroídicas.

2.- Los extractos y fracciones de ajo estudiados *ex vivo* durante cuatro meses mejoraron la reactividad vascular de la aorta de ratas hipercolesterolémicas, a través de un mecanismo de acción relacionado con el aumento de óxido nítrico y la prevención en la formación de la placa aterosclerótica.

3.- Todos los extractos estudiados actúan como vasodilatadores *in vitro* e inhibidores de la contracción, siendo las fracciones 20-100 las más potentes.

4.- La fracción RG 20-100 que tiene un efecto vasodilatador endotelio-independiente, ejerce un efecto directo sobre el músculo liso vascular actuando como antagonista de calcio al inhibir la entrada de calcio extracelular y la salida de calcio del retículo sarcoplásmico.

5.- La fracción RG 20-100 inhibe la proliferación de células musculares lisas de aorta de rata a las dosis de 10 y 30 $\mu\text{g/ml}$. Este efecto, independiente de toxicidad celular, es debido a una inhibición en la síntesis de DNA.

En conclusión podemos decir que los extractos y fracciones de ajo estudiados en esta tesis doctoral actúan mejorando la función vascular cuando son administrados de forma crónica, a través de un mecanismo en el que está implicado el óxido nítrico y la prevención en la formación de placas ateroscleróticas. Y que sin embargo, la administración *in vitro* produce un efecto vasodilatador directo sobre el músculo liso vascular dependiente de calcio. Siendo en ambas situaciones la fracción RG 20-100 la más activa.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDULLAH, T.H., KANDIL, O., ELKADI, A., CARTER, J. (1988). Garlic revisited: therapeutic for the major diseases of our time?. *J. Natl. Med. Asso.*, 80:439-445.
- ABDULLAH, T.H., KIRKPATRIC, D.V., CARTER, J. (1989). Enhancement of natural killer cell activity in AIDS with garlic. *J. Oncology*, 2:52-59.
- ABOUL-ENEIN, A.M. (1986). Inhibition of tumor growth with possible immunity by Egyptian garlic extracts. *Die Nahrung*, 30:161-167.
- ADER, R. (1981). *Psychoneuroimmunology*. Academic Press. Animal models in the study of brain, behavior and bodily disease. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1981;59:11-26.
- ADETUMBI, M.A., LAU, B.H.S. (1983). *Allium sativum* (garlic)-a natural antibiotic. *Med. Hypotheses*, 12:227-233.
- ADOGA, G.I., OSUOI, J. (1986). Effect of garlic oil extract on serum, liver and kidney enzymes of rats fed on high sucrose and alcohol diets. *Biochem. Int.*, 13:615-622.
- AGARWAL, K.C. (1991). Role of Adenosine and Adenine Nucleotides in the biological systems. *Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam*, p.457.
- AGARWAL, K.C. (1996). Therapeutic actions of garlic constituents. *Med. Res. Rev.*, 16:111-124.
- AGEL, M.B., GHARAIBAH, M.N., SALHAB, A.S. (1991). Direct relaxant effects of garlic juice on smooth muscle and cardiac muscles. *J. Ethnopharmacol.*, 33:13-20.
- AGROTIS, A., SALTIS, J., BOBIK, A. (1994). Transforming growth factor- β_1 gene activation and growth of smooth muscle from hypertensive rats. *Hypertension*, 23: 593-599.
- AHMED, R.S., SHARMA, S.B. (1997). Biochemical studies on combined effects of garlic (*Allium sativum* Linn) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) in albino rats. *Indian J. Exp. Biol.*, 35: 841-843.
- ALI, M., BORDIA, T., MUSTAFA, T. (1999). Effect of raw versus boiled aqueous extract of garlic and onion on platelet aggregation. *Prostagl. Leuko. Ess. Fatty acids*, 60: 43-47.
- ALI, M., THOMSON, M., AFZAL, M. (2000a). Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. *Prostagl. Leuko. Ess. Fatty Acids*, 62: 55-73.

- ALI, M., AL-QATTAN, K.K., AL-ENEZI, F., KHANAFER, R.M.A., MUSTAFA, T. (2000b). Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. *Prostagl. Leuko. Ess. Fatty Acids*, 62: 253-259.
- AL-QATTAN, K.K., ALNAQEEB, M.A., ALI, M. (1999). The antihypertensive effect of garlic (*Allium sativum*) in the rat two-kidney-one-clip Goldblatt model. *J. Ethnopharmacol.*, 66: 217-222.
- ANDERSON, T.J., GERHARD, M.D., MEREDITH, I.T., CHARBONNEAU, F., DELAGRANGE, D., GREAGER, M.A., SELWYN, A.P., GANZ, P. (1995a). Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.*, 75:71B-75B.
- ANDERSON, T.J., MEREDITH, I.T., YEUNG, A., FREI, B., SELWYN, A.P., GANZ, P. (1995b). The effect of cholesterol lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N. Eng. J. Med.*, 332:488-493.
- APITZ-CASTRO, R., CABRERA, S., CRUZ, M.R., LEDEZMA, E., JAIN, M.K. (1983). Effects of garlic extracts and of these pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure. *Thromb. Res.*, 32:155-169.
- APITZ-CASTRO, R., BADIMON, J.J., BADIMON, L. (1992). Effect of ajoene, the major platelet compound from garlic, on platelet thrombus formation. *Thromb. Res.*, 65(2): 145-155.
- AQEL, M.B., GHARAIBAH, M.N., SALHAB, A.S. (1991). Direct relaxant effects of garlic juice on smooth and cardiac muscles. *J. Ethnopharm.*, 33: 13-19.
- ARCHER, S., HUANG, J., HAMPL, V., NELSON, D., SHULTZ, P., WEIR, E. (1994). Nitric oxide and cyclic GMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K⁺ channel by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 7583-7587.
- ARORA, R.C., ARORA, S. (1981). Comparative effect of clofibrate, garlic and onion on alimentary hyperlipemia. *Atherosclerosis*, 39:447-452.
- ASADA, Y., HAYASHI, T., TANIMURA, N., KISANUKI, A., SUMIYOSHI, A. (1992). Replication of endothelial cells and smooth muscle cells induced in vivo by hypercholesterolaemia and material release from platelet-rich white thrombus. *J. Pathol.*, 166:69-75.
- AUER, W., EIBER, A., HERTKORN, E., HOEHFELD, E., KOEHRLE, U., LORENZ, A., MADER, F., MERX, W., OTTO, G., SCHMID-OTTO, B.

- (1990). Hypertension and hyperlipidaemia: garlic help in mild cases. *Brit. J. Clin. Pract.*, 69: 3-6.
- AUGUSTI, K.T., MATHEW, P.T. (1973). Effect of long-term feeding of the aqueous extracts of onion (*Allium cepa* Linn.) and garlic (*Allium sativum* Linn.) on normal rats. *Ind. J. Exp. Biol.*, 11:239-241.
- AVIRAM, M., MAOR, I. (1994). Phospholipase D-modified low density lipoprotein is taken up by macrophages at increased rate. A possible role for phosphatidic acid. *J. Clin. Invest.*, 91:1942-1952.
- AVIRAM, M. (2000). Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radical Res.*, 33: S85-S97.
- BARNES, P.J., LIU, S. (1995). Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol. Rev.* 47: 87-131.
- BARRIE, S.A., WRIGHT, J.V., PIZZORNO, J.E. (1987). Effects of garlic oil on platelet aggregation, serum lipids and blood pressure in humans. *J. Orthomolecular Med.*, 2:15-21.
- BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A., FREEMAN, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1620-1624.
- BELMAN, S. (1983). Onion and garlic oils inhibit tumor promotion. *Carcinogenesis*, 4:1063-1072.
- BENHAM, C., TSIEN, R. (1987). A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature*, 328: 275-278.
- BERTHOLD, H.K., SUDHOP, T., VON BERGMANN, K. (1998). Effect of a garlic preparation on serum lipoproteins and cholesterol metabolism: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.*, 279: 1900-1902.
- BLOCK, E., AHMAD, S., CATALFAMO, J.L., JAIN, M.K., APITZ-CASTRO, R., CRUZ, M.R. (1984). (E,Z)-ajoene, a potent antithrombotic agent from garlic. *J. Am. Chem. Soc.* 106:8295-8296.
- BLOCK, E. (1985). The chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.*, 252:114-119.
- BOLTON, S., NULL, G., TROETEL, W.M. (1982). The medical uses of garlic-fact and fiction. *Am. Pharm.*, 22:40-43

- BORDIA, A.K., BANSAL, H.C. (1973). Essential oil of garlic in prevention of atherosclerosis. *Lancet*, 2:1491
- BORDIA, A.K., ARORA, S.K., KOTHARI, L.K., JAIN, K.C., RATHORE, B.S., RATHORE, A.S., DUBE, M.K., BHU, N. (1975). The protective action of essential oils of onion and garlic in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 22:103-109.
- BORDIA, A.K., JOSHI, H.K., SANADHYA, Y.K., BHU, N. (1977). Effect of essential oil of garlic on serum fibrinolytic activity in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 28:155-159.
- BORDIA, A. (1978). Effect of garlic on human platelet aggregation in vitro. *Atherosclerosis*, 30: 355-360.
- BORDIA, A.K., VERMA, S.K. (1978). Garlic on the reversibility of experimental atherosclerosis. *Indian Heart J.* 30:47-50.
- BORDIA, A., VERMA, S.K. (1980). Effect of garlic feeding on regression of experimental atherosclerosis in rabbits. *Artery* 7:428-437.
- BORDIA, A. (1981). Effect of garlic on blood lipids in patients with coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34:2100-2103.
- BORDIA, A.K., VERMA, S.K., KHABIA, B.L., VYAS, A., RATHORE, A.S., BHU, N., BEDI, H.K. (1987). The effectiveness of active principle of garlic and onion on blood lipids and experimental atherosclerosis in rabbits and their comparison with clofibrate. *J. Assoc. Phys. India*, 25:509-516.
- BORDIA, T., MOHAMMED, N., THOMSON, M., ALI, M. (1996). An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 54: 183-186.
- BOREN, J., OLIN, K., LEE, I., CHAIT, A., WIGHT, T.N., INNERARITY, T.L. (1998). Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J. Clin. Invest.*, 101: 2658-2664.
- BORING, L., GOSLING, J., CLEARY, M., CHARO, I.F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2-I-mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394: 894-897.
- BOULANGER, C.M., TANNER, F.C., BEA, M.L., HAHN, A.W.A., WERNER, A., LÜSHER, T.C. (1992). Oxidized low density lipoprotein induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ. Res.*, 70:1191-1197.

- BRODERICK, R., BIALECKI, R., TULENKO, T.N. (1989). Cholesterol-induced changes in rabbit arterial smooth muscle sensitivity to adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol.*, 257: H170-H178.
- BROSCHÉ, T., PLATT, D., DORNER, H. (1990). The effect of a garlic preparation on the composition of plasma lipoproteins and erythrocyte membranes in geriatric subjects. *Brit. J. Clin. Pract. Suppl* (69), 44: 12-19.
- BUHL, R. (1994). Imbalance between oxidants and antioxidants in the lungs of HIV-seropositive individuals. *Chem. Biol. Interact.* 91:147-153.
- BUI, M.N., SACK, M.N., MOUTSATOS, G., LU, D.Y., KATZ, P., McCOWN, R., BREALL, J.A., RACKLEY, C.E. (1996). Autoantibody titers to oxidized low density lipoprotein in patients with coronary atherosclerosis. *Am. Heart J.*, 131:663-667.
- BUIATTI, E., PALLI, D., DECARLI, A., AMADORI, D., AVELLINI, C., BIANCHI, S., BISERNI, R., CIPRIANI, F., COCCO, P., GIACOSA, A. (1989). A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int. J. Cancer*, 44: 611-616.
- BUNKENBURG, B., VAN AMELSVOORT, T., ROGG, H., WOOD, J.M. (1992). Receptor-mediated effects of angiotensin II on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 20: 746-754.
- BURGES, W.H., MACIAG, T. (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 575-606.
- BUSSE, R., FÖRSTERMANN, U., MATSUDA, H., POHL, U. (1984). The role of prostaglandins in the endothelium-mediated vasodilatory response to hypoxia. *Pflügers Arch.*, 401: 77-83.
- BYCHKOV, R., GOLLASCH, M., STEINKE, T., RIED, C., FRIEDRICH, C., HALLER, H. (1998). Calcium-activated potassium channels and nitrate-induced vasodilation in human coronary arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285: 293-298.
- BYRNE, D.J., NEIL, H.A.W., VALLANCE, D.T., WINDER, A.F. (1999). A pilot study of garlic consumption shows no significant effect on markers of oxidation or subfraction composition of low-density lipoprotein including lipoprotein(a) after allowance for non-compliance and the placebo effect. *Clin. Chim. Acta*, 285: 21-33.
- CAMPBELL, J.H., EFENDY, J.L., SMITH, N.J., CAMPBELL, G.R. (2001). Molecular basis by which garlic suppresses atherosclerosis. *J. Nutrition (suppl)*, 131: 1006-1009.

- CAMPBELL, W.B., GEBREMEDHIN, D., PRATT, P.F., HARDER, D.R. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing. *Circ. Res.*, 78: 415-423.
- CAO, W.B., ZENG, Z.P., ZHU, Y.J., LUO, W.C., CAI, B.Q. (1994). Inhibition of nitric oxide synthesis increases de secretion of endothelin-1 in vivo and in cultured endothelial cells. *Clin. Med. J.*, 107: 822-826.
- CAREW, T.E., HAYES, S.B., KOSCHINSKY, T., STEINBERG, D. (1976). A mechanism by which high-density lipoproteins may slow the atherogenic process. *Lancet* 1:1315.
- CASTELLI, W.P. (1984). Epidemiology of coronary heart disease. *Am. J. Med.* 76:4-10.
- CASTELLOT, J.J., FARREAU, L.V., KARNOVSKY, M.J., ROSENBERG, R.D. (1982). Inhibition of vascular smooth muscle growth by endothelial cell-derived heparin: possible role of platelet endoglycosidase. *J. Biol. Chem.*, 257: 11256-11260.
- CAUVIN, C., SAIDA, K., VAN BREEMEN, C. (1984). Extracelular Ca dependence and diltiazem inhibition of contraction in rabbit conduit arteries and mesenteric resistance vessels. *Blood Vessels*, 21: 23-29.
- CELERMAJER, D.S., SORENSEN, K.E., GOOCH, V.M., SPIEGELHALTER, D.J., MILLER, O.I., SULLIVAN, I.D., LLOYD, J.K., DEANFIELD, J.E. (1992). Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 340:1111.
- CELLINI, L., DI CAMPLI, E., MASULLI, M., DI BARTOLOMEO, S., ALLOCATI, N. (1996). Inhibition of Helicobacter pylori by garlic extract (Allium sativum). *Immunol Med Microbiol.*, 13:273-277.
- CHALLIER, B., PERARNAU, J-M., VIEL, J-F. (1998). Garlic, onion and cereal fibre as protective factors for breast cancer: a French case-control study. *Euro J. Epidemiol.*, 14: 737-747.
- CHANG, M.W., JOHNSON, M.A. (1980). Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. *J. Nutr.*, 110:931-936.
- CHI, M.S. (1982). Effects of garlic products on lipid metabolism in cholesterol-fed rats (41494). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 171: 174-178.
- CHI, M.S., KOH, E.T., STEWARD, T.J. (1982). Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. *J. Nutr.*, 112:241-248.

- CHIN, J.H., AZHAR, S., HOFFMAN, B.B. (1992). Inactivation of endothelial dependent relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J. Clin. Invest.*, 89:10-18.
- CHO, B.H., XU, S. (2000). Effects of allyl mercaptan and various allium-derived compounds on cholesterol synthesis and secretion in Hep-G2 cells. *Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 126: 195-201.
- CHRISTEN, S., THOMAS, S.R., GARNER, B., STOCKER, R. (1994). Inhibition by interferon- γ of human mononuclear cell-mediated low density lipoprotein oxidation. Participation of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *J. Clin. Invest.*, 93:2149-2158.
- CHULIÁ, T., GONZALEZ, P., DEL RIO, M., TEJERINA, T. (1995). Comparative study of elgodipine and nisoldipine on the contractile responses of various isolated blood vessels. *Eur. J. Pharmacol.*, 285: 115-123.
- CHUNG, J.G., CHEN, G.W., WU, L.T., CHANG, H.L., LIN, J.G., YEH, C.C., WANG, T.F. (1998). Effects of garlic compounds diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. *Am. J. Clin. Med.*, XXIV (3-4): 353-364.
- CLOWES, A.W., CLOWES, M.M., GOWN, A.M., WIGHT, T.N. (1984). Localization of proteoheparan sulfate in rat aorta. *Histochemistry*, 80: 379-384.
- CLOWES, A.W., CLOWES, M.M. (1986). Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: III. Heparin inhibits rat smooth muscle mitogenesis and migration. *Circ. Res.*, 58: 839-845.
- COFFIER, E., CERRINA, J., JOUVIN-MORCHE, E., BENVENISTE, J. (1983). Inhibition of rabbit platelet aggregation by the Ca^{2+} antagonists verapamil and diltiazem and by trifluorperzaine. *Thromb. Res.*, 31:565-572.
- COHEN, R.A., VANHOUTTE, P.M. (1995). Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation.*, 92: 3337-3349.
- COHEN, R.A., WEISBROD, R., GERICKE, M., YAGHOUBI, M., BIERL, C., BOLOTINA, V. (1999). Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and inhibition of stores-operated Ca^{2+} influx. *Circ. Res.*, 84: 210-219.
- COLEMAN, R.A., GRIX, S.P., HEAD, S.A., LOUTTIT, J.B., MALLET, A., SHELDRIK, R.L.G. (1994). A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins*, 47: 151-166.

- COLLINS, R.G., VELJI, R., GUEVARA, N.V., HICKS, M.J., CHAN, L., BEAUDET, A.L. (2000). P-selectin or intracellular adhesion molecule (ICAM-1) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 191: 189-194.
- COX, D.A., COHEN, M.L. (1996). Effects of oxidized low density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacol. Rev.*, 48: 3-19
- COX, R.H., TULENKO, T.N. (1995). Altered contractile and ion channel function in rabbit portal vein with dietary atherosclerosis. *Am. J. Physiol.*, 268:H2522-H2530.
- CYRUS, T., WITZTUM, J.L., RADER, D.J., TANGIRALA, R., FAZIO, S., LINTON, M.F., FUNK, C.D. (1999). Disruption of 12/15-lipoxygenase diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 103: 1597-1604.
- DAS, I., KHAN, N.S., SOORANNA, S.R. (1995a). Potent activation of nitric oxide synthase by garlic: a basis for its therapeutic applications. *Curr. Med. Res. Opin.*, 13:257-265.
- DAS, I., KHAN, N.S., SOORANNA, S.R. (1995b). Nitric oxide synthase activation is an unique mechanism of garlic action. *Biochem. Soc. Trans.*, 23: 136S.
- DAS, I., HIRANI, J., SOORANNA, S. (1996). Arginine is not responsible for the activation of nitric oxide synthase by garlic. *J. Ethnopharmacol.*, 53: 5-9.
- DAVIES, M.J., WOOLF, N., ROWLES, P.M., PEPPER, J. (1988). Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human in human coronary arteries. *Br. Heart J.*, 69: 459-464.
- DAVIES, M.J., MENINGER, G., ZAWIEJA, D. (1992). Stretch-activated single channel and whole cell currents in vascular smooth muscles. *Am. J. Physiol.*, 262: C1083-C1088.
- DAWBER, T.R. (1980). The Framingham study. The epidemiology of atherosclerotic disease. Haward University Press, Cambridge, MA.
- DE BRUYN, V.H., NUNO, D.W., CAPPELLI-BIGAZZI, M., DOLE, W.P., LAMPING, K.G. (1994). Effect of acute hypertension in the coronary circulation: role of mechanical factors and oxygen radicals. *J. Hypertension*, 12:163-175.
- DE CANDOLLE, A. (1896). Origine des plantes cultivées. Ed. Félix alcan. (fácsimil).

- DIETSCHY, J.M., WOOLLETT, L.A., SPADY, D.K. (1993). The interaction of dietary cholesterol and specific fatty acids in the regulation of LDL receptor activity and plasma LDL-cholesterol concentrations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 676:11-26.
- DIRSCH, V.M., GERBES, A.L., VOLLMAR, A.M. (1998). Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor $\kappa\beta$. *Molec. Pharmacol.*, 53: 402-407.
- DOLBEARE, F., GRATZNER, H., PALLAVICINI, M.G., GRAY, J.W. (1983). Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80: 5573-5577.
- DOLBEARE, F., BEISKER, W., PALLAVICINI, M.G., VANDERLAAN, M., GRAY, J.W. (1985). Cytochemistry for bromodeoxyuridine/DNA analysis; stoichiometry and sensitivity. *Cytometry*, 6: 521-530.
- DONG, Z.M., CHAPMAN, S.M., BROWN, A.A., FRENETTE, P.S., HYNES, R.O., WAGNER, D.D. (1998). The combined role of P- and E- selectins in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 102: 145-152.
- DORANT, E., VAN DEN BRANDT, P.A., GOLDBOHM, R.A. (1994). A prospective cohort study on Allium vegetable consumption, garlic supplement use, and the risk of lung carcinoma in the Netherlands. *Cancer Res.*, 54:6148-6159.
- DZAU, V.J., GIBBONS, G.H. (1991). Endothelium and growth factors in vascular remodeling in hypertension. *Hypertension*, 18(suppl III): 115-121.
- EDWARDS, G., WESTON, A.H. (1998). Endothelium-derived hyperpolarizing factor- a critical appraisal. *Progress in Drug Research*, edited by E. Jucker, 50: 107-133.
- EDWARDS, G., DORA, K.A., GARDENER, M.J., GARLAND, C.J., WESTON, A.H. (1998). K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, 396 :269-272.
- EDWARDS, G., GARDENER, M.J., WESTON, A.H. (1999). K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor: an alternative working hypothesis. *En: Endothelium-Dependent Hyperpolarizations*, edited by P.M. Vanhoutte., 109-116.
- EFENDY, J.L., SIMMONS, D.L., CAMPBELL, G.R., CAMPBELL, J.H. (1997). The effect of the aged garlic extract, 'Kyolic', on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 132:37-42.

- EILAT, S., OESTRAICHER, Y., RABINKOV, A., OHAD, D., MIRELMAN, D., BATTLER, A., ELДАР, M., VERED, Z. (1995). Alteration of lipid profile in hyperlipidemic rabbits by allicin, an active constituent of garlic. *Coron Artery Dis.*, 6: 985-990.
- EISENBERG, D.M., KESSLER, R.C., FOSTER, C., NORLOCK, F.E., CALKINS, D.R., DELBANCO, T.L. (1993). Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs, and patterns of use. *New England J. Med.*, 328: 246-252.
- ESAKI, T., HAYASHI, T., MUTO, E., YAMADA, K., KUZUYA, M., IGUCHI, A. (1997). Expression of inducible nitric oxide synthase in T lymphocytes and macrophages of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 128: 39-44.
- FALLON, M.B., ABRAMS, G.A., ABDEL-RAZEK, T.T., DAI, J., CHEN, S.J., CHEN, Y.F., LUO, B., OPARIL, S., KU, D.D. (1998). Garlic prevents hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am. Physiol. Soc.*, 275(2 Pt 1):L283-L287.
- FAZIO, S., BABAEV, V.R., MURRAY, A.B., HASTY, A.H., CARTER, K.J., GLEAVES, L.A., ATKINSON, J.B., LINTON, M.F. (1997). Increased atherogenesis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4647-4652.
- FEBBRAIO, M., PODREZ, E.A., SMITH, J.D., HAJJAR, D.P., HAZEN, S.L., HOFF, H.F., SHARMA, K., SILVERSTEIN, R.L. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerosis lesion development in mice. *J. Clin. Invest.*, 105: 1049-1056.
- FÉLÉTOU, M., VANHOUTTE, P.M. (1988). Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 93: 515-524.
- FISHER, M.S., KRIPKE, M.L. (1977). Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. *Proc. Atl. Acad. Sci. USA*, 74:1688-1696.
- FISHER, M.S., KRIPKE, M.L. (1982). Suppressor T lymphocytes control the development of primary skin cancers in ultraviolet-irradiated mice. *Science*, 216:1133-1140.
- FLEISCHHACKER, E., ESENABHALU, V.E., HOLZMANN, S., SKRABAL, F., KOIDL, B., KOSTNER, G.M., GRAIER, W.F. (2000). In human hypercholesterolemia increased reactivity of vascular smooth muscle cells is due to altered subcellular Ca(2+) distribution. *Atherosclerosis*, 149: 33-42.

- FRIEMAN, P.C., MITCHELL, G.G., HEISTAD, D.D., ARMSTRONG, M.L., HARRISON, D.G. (1986). Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ. Res.*, 58: 783-789.
- FUJIWARA, M., NAKATA, T. (1967). Induction of tumour immunity with tumour cells treated with extract of garlic (*Allium sativum*). *Nature*, 216:83-87.
- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.*, 288: 373-376.
- FURCHGOTT, R.F. (1984). The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24: 175-197.
- GALLE, J., BASSENGE, E., BUSSE, R. (1990). Oxidized low density lipoproteins potentiate vasoconstrictions to various agonists by direct interaction with vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, 66:1287-1293.
- GALLE, J., BASSENGE, E. (1991). Effects of native and oxidised low-density lipoproteins on endothelium-independent vasomotion. *Basic Res. Cardiol.*, 86 (Suppl. 2): 127-142.
- GANITKEVICH, V., ISENBERG, G. (1990). Contribution of two types of calcium channels to membrane conductance of single myocytes from guinea-pig coronary artery. *J. Physiol.*, 426: 19-42.
- GARLAND, C.J., MCPHERSON, G.A. (1992). Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.*, 105: 429-435.
- GARLAND, C.J., PLANE, F., KEMP, B.K., COCKS, T.M. (1995). Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16: 23-30.
- GEBHARDT, R. (1991). Inhibition of cholesterol biosynthesis by a water soluble garlic extract in primary cultures of rat hepatocytes. *Arzneimittelforschung*, 41:800-8004.
- GEBHARDT, R. (1993). Multiple inhibitory effects of garlic extracts on cholesterol synthesis in hepatocytes. *Lipids*, 28(7):613-619.
- GENG, Z.H., RONG, Y.Q., LAU, B.H.S. (1997). S-allyl cysteine inhibits nuclear factor kappa B activation in human T lymphocytes. *Free Radical Biol. Med.*, 23: 345-350.

- GENG, Z., LAU, B.H.S. (1997). Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytotherapy Res.*, 11:54-59.
- GEORGE, M., SHIBATA, E. (1995). Regulation of calcium-activated potassium channels by S-nitrosothiol compounds and cyclic guanosine monophosphate in rabbit coronary artery myocytes. *J. Invest. Med.*, 43: 451-458.
- GERHARD, G.T., DUELL, P.B. (1999). Homocysteine and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 10: 417-429.
- GHANNOUM, M.A. (1990). Inhibition of *Candida* adhesion to bucal epithelial cells by an aqueous extract of *Allium sativum* (garlic). *J. Appl. Bacteriol.*, 68:163-169.
- GIBBONS, G.H. (1995). Mechanisms of vascular remodeling in hypertension: role of autocrine-paracrine vasoactive factors. *Curr. Opinion Nephrol. Hypertens.*, 4: 189-196.
- GIMBRONE, M.A.Jr. (1999). Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am. J. Pathol.*, 155: 1-5.
- GLEASON, M.M., MEDOW, M.S., TULENKO, T.N. (1991). Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle. *Circ. Res.*, 69: 216-227.
- GOLDBOURT, U., NEUFELD, H.N. (1988). Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis*, 6: 357-377.
- GOLDSTEIN, J.L., HO, Y.K., BASU, S.K., BROWN, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 333-337.
- GOLINO, P., PISCIONE, F., WILLERSON, J.T., CAPELLI-BIGAZI, M., FOCACCIO, A., VILLARI, B., INDOLFI, C., RUSSOLILLO, E., CONDORELLI, M., CHIARIELLO, M. (1991). Divergent effects of serotonin on coronary artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N. Eng. J. Med.*, 324:641-648.
- GORDON, J.L., MARTIN, W. (1983) Endothelium-dependent relaxation of the pig aorta: relationship to stimulation of ⁸⁶Rb efflux from isolated endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, 79: 531-541.
- GRAINGER, D.J., KEMP, P.R., LIU, A.C., LAWN, R.M., METCALFE, J.C. (1994). Activation of transforming growth factor- β is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature*, 370: 460-462.

- GRATZNER., H.G., LEIF, R.C., INGRAM, P.J., CASTRO, A. (1975). The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 95: 84-88.
- GRIFFIN, S.A., BROWN, W.C.B., MACPHERSON, F., MAGRATH, J.C., WILSON, V.G., KORSGAARD, N., MULVANY, M.J., LEVER, A.F. (1991). Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a nonpressor mechanism. *Hypertension*, 17: 626-635.
- GROSS, V., ARNDT, H., ANDUS, T., PALITZSCH, K.D., SCHOLMERICH, J. (1994). Free radicals in inflammatory diseases pathophysiology and therapeutic implications. *Hepatogastroenterology*, 41:320-326.
- GU, L., OKADA, Y., CLINTON, S.K., GERARD, C., SUKHOVA, G.K., LIBBY, P., ROLLINS, B.J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein-deficient mice. *Mol. Cell*, 2: 275-281.
- GUIJARRO, C., KEANE, WF. (1994). Lipid-induced glomerular injury. *Nephron*, 67: 1-6.
- GUIJARRO, C., KASISKE, BL., KIM, Y., O'DONELL, MP., LEE, HS., KEANE, WF. (1995). Early glomerular changes in rats with dietary-induced hypercholesterolemia. *Am. J. Kidney Dis.*, 26: 152-161.
- GUO, N.L., LU, D.P., WOODS, G.L., REED, E., ZHOU, G.Z., ZHANG, L.B., WALDMAN, R.H. (1993). Demonstration of the anti-viral activity of garlic extract against human cytomegalovirus in vitro. *Chinese Med. J.*, 106:93-99.
- GUPTA, S., PABLO, A.M., JIANG, X.C., WANG, M., TALL, A.R., SCHINDLER, C. (1997). IFN- γ potentiates atherosclerosis in apoE knock-out mice. *J. Clin. Invest.*, 99: 2752-2761.
- HAAK, T., MARZ, W., JUNGSMANN, E. , HAUSSER, S., SIEKMEIER, R., GROSS, N., USADEL, K.H. (1994). Elevated endothelin levels in patients with hyperlipoproteinemia. *Clin. Investig.*, 72: 580-584.
- HABIB, J., BOSALLER, C., WELLS, S., WILLIAMS, C., MORRISSET, J., HENRY, P.D. (1986). Preservation of endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbit by treatment with the calcium blocker PN 200110. *Circ. Res.*, 58: 305-309.
- HALLIWELL, B. (1993). The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, 23 Suppl. 1:118-125.

- HALLIWELL, B. (1995). Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann. Rheum. Dis.*, 54:505-511.
- HARASAWA, U.L., SHIMOKAWA, H., NAKASHIMA, M., EGASHIRA, K., TAKESHITA, A. (1997). Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J. Clin. Invest.*, 100: 2793-2799.
- HARATS, D., BEN-NAIM, M., DABACH, Y., HOLLANDER, G., HAVIVI, E., STEIN, O., STEIN, Y. (1990). Effect of vitamin C and E supplementation on susceptibility of plasma lipoproteins to peroxidation induced by acute smoking. *Atherosclerosis*, 85: 47-54.
- HARMAN, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11:298-306.
- HARMAN, D. (1981). The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7124-7130.
- HARRIS, L. (1995). *The book of garlic*. Reading, MA: Addison-Wesley.
- HARRISON, D.G. (1996). Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production: a potential target for risk factor management. *Cardiol. Clin.*, 14: 1-15.
- HARWOOD, H.J., CHANDLER, C.E., PELLARIN, L.D., BANGERTER, F.W., WILKINS, R.W., LONG, C.A., COSGROVE, P.G., MALINOW, M.R., MARZETTA, C.A., PETTINI, J.L., SAVOY, Y.E., MAYNE, J.T. (1993). Pharmacologic consequences of cholesterol absorption inhibition: alteration in cholesterol metabolism and reduction in plasma cholesterol concentration induced by the synthetic saponin β -tigogenin cellobioside (CP-88818; tiqueside). *J. Lipid Res.*, 34: 377-395.
- HAYNES, W., WEBB, D. (1993). The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? *Clin. Sci.*, 84: 485-500.
- HEGELE, R.A. (1999). Paraoxonase-genes and disease. *Ann. Med.*, 31: 217-224.
- HEINLE, H., BETZ, E. (1994). Effects of dietary garlic supplementation in a rat model of atherosclerosis. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 44(I), Nr. 5: 614-617.
- HEISTAD, D., ARMSTRONG, M., PIEGORS, D., MARK, A. (1984). Augmented responses to vasoconstrictor stimuli in hypercholesterolemic and atherosclerotic monkeys. *Circ. Res.*, 54: 711-718.
- HENRIKSEN, T., MAHONEY, E.M., STEINBERG, D. (1981). Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated

with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6449-6504.

HENRY, R., CANNON, D., WINKELMAN, J. (1974). Clinical chemistry principles and technics. *Harper, M. & Hagerstown, D. Eds.*

HERNÁNDEZ-PERERA, O., PÉREZ-SALA, D., NAVARRO-ANTOLÍN, J., SÁNCHEZ-PASCUALA, R., HERNÁNDEZ, G., DÍAZ, C., LAMAS, S. (1998). Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 101: 2711-2719.

HESTER, K., O'CONNOR, D., BECKER, E. (1987). Effects of nicorandil on receptor-mediated Ca^{2+} release and Ca^{2+} entry in vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 10(suppl. 8): S44-S48.

HIKINO, H., TOHKIN, M., KISO, Y., NAMIKI, T., NISHIMURA, S., TAKEYAMA, K. (1986). Antihepatotoxic actions of *Allium sativum* bulbs. *Planta Medica*, 3:163-168.

HIMPENS, B., MISSIAEN, L., CASTEELS, R. (1995). Ca^{2+} homeostasis in vascular smooth muscle. *J. Vasc. Res.*, 32: 207-219.

HIRATA, K., MIKI, N., KURODA, Y., SAKODA, T., KAWASHIMA, S., YOKOHAMA, M. (1995). Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ. Res.*, 76: 958-962.

HIRATA, M., KOHSE, K., CHANG, C., IKEBE, T., MURAD, R. (1990). Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 265: 1268-1273.

HOFMANN, M.A., DRURY, S., FU, C., QU, W., TAGUCHI, A., LU, Y., AVILA, C., KAMBHAM, N., BIERHAUS, A., NAWROTH, P., NEURATH, M.F., SLATTERY, T., BEACH, D., McCLARY, J., NAGASHIMA, M., MORSER, J., STERN, D., SCHMIDT, A.M. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97: 889-901.

HOLLAN, S. (1995). Free radicals in health and disease. *Haematologia Budap.*, 26:177-183.

HOLVOET, P., COLLEN, D. (1994). Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J.*, 8:1279-1284.

- HONG, J.Y., WANG, Z.Y., SMITH, T.J., ZHOU, S., SHI, S., PAN, J., YANG, C.S. (1992). Inhibitory effects of diallyl sulfide on the metabolism and tumorigenicity of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in A/J mouse lung. *Carcinogenesis*, 13:901-904.
- HORIE, T., MURAYAMA, T., MISHIMA, T., ITOH, F., MINAMIDE, Y., FUWA, T., AWAZU, S. (1989). Protection of liver microsomal membranes from lipid peroxidation by garlic extract. *Planta Med.*, 55:506-512.
- HORIE, T., AWAZU, S., ITAKURA, Y., FUWA, T. (1992). Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation. *Planta Med.*, 58:468-475.
- HOROWITZ, A., MENICE, C., LAPORTE, R., MORGAN, K. (1996). Mechanism of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.*, 76: 967-1003.
- HOSTETTMANN, K., MARSTON, A. eds (1995). In: *Saponins*, pp. 267-268. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- HOWES, L.G., ABBOTT, D., STRAZNICKY, N. (1997). Lipoproteins and cardiovascular reactivity. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 44: 319-324.
- HU, J.F., LIU, Y.Y., YU, Y.K., ZHAO, T.Z., LIU, S.D., WANG, Q.Q. (1991). Diet and cancer of the colon and rectum: a case-control study in China. *Int. J. Epidemiol.*, 20:362-369.
- HUSSAIN, S.P., JANNU, L.N., RAO, A.R. (1990). Chemopreventive action of garlic on methylcholanthrene-induced carcinogenesis in the uterine cervix of mice. *Cancer Lett.*, 49:175-180.
- IDE, N., LAU, B.H.S. (1997). Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *J. Pharm. Pharmacol.*, 49: 908-911.
- IDE, S., KONDOH, M., SATOH, H., KARASAWA, A. (1994). Anti-proliferative effects of benidipine hydrochloride in porcine cultured vascular smooth muscle cells and in rats subjected to balloon catheter-induced endothelial denudation. *Biol. Pharm. Bull.*, 17: 627-631.
- IGNARRO, L.J., BUGA, G., WOOD, K., BYRNES, R., CHAUDHURI, G. (1987). Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9265-9269.
- IINO, M. (1989). Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.*, 94: 363-386.

- IMAI, J., IDE, N., NAGAE, S., MORIGUCHI, T., MATSUURA, H., ITAKURA, Y. (1994). Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.*, 60:417-422.
- INOUE, A., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., KAYUSA, Y., MIYAUCHI, T., GOY, K., MASAKI, T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2863-2867.
- IP, C., LISK, D., STOEWSAND, G.S. (1992). Mammary cancer prevention by regular garlic and selenium-enriched garlic. *Nutr. Cancer*, 17:279-285.
- ISMAIL, M.F., GAD, M.Z., HAMDY, M.A. (1999). Study of the hypolipidemic properties of pectin, garlic, and ginseng in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacol. Res.*, 39: 157-166.
- ISSACSOHN, J.L., MOSER, M., STEIN, E.A., DUDLEY, K., DAVEY, J.A., LISKOV, E., BLACK, H.R. (1998). Garlic powder and plasma lipids and lipoproteins. *Arch. Intern. Med.*, 158: 1189-1194.
- ITOKAWA, Y., INOUE, K., SASAGAWA, S., FUJIWARA, M. (1973). Effect of S-methylcysteine and related sulfur-containing amino acids on lipid metabolism of experimental hypercholesterolemic rats. *J. Nutr.*, 103:88-92.
- IVANDIC, B., CASTELLANI, L.W., WANG, X.P., QIAO, J.H., MEHRABIAN, M., NAVAB, M., FOGELMAN, A.M., GRASS, D.S., SWANSON, M.E., DE BEER, F., LUSIS, A.J. (1999). Role of group II secretory phospholipase A₂ in atherosclerosis I. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A₂. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 19: 1284-1290.
- JACOBY, W.B. (1978). The glutathione-S-transferase: A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol.*, 46: 383-414.
- JAIN, R.C., VYAS, C.R., MAHATMA, O.P. (1973). Hypoglycaemic action of onion and garlic. *Lancet*, 2:1491.
- JAIN, R.C., VYAS, C.R. (1975). Garlic in alloxan-induced diabetic rabbits. *Am. J. Clin. Nutr.*, 28:684-689.
- JAIN, M.K., APITZ-CASTRO, R. (1987). Effects of garlic on platelets, its antiagregant properties. *Trends Biochem. Sci.*, 12:252-258.
- JAIN, A.K., VARGAS, R., GOTZKOWSKY, S., MCMAHON, F.G. (1993). Can garlic reduce levels of serum lipids? A controlled clinical study. *Am. J. Med.*, 94:632-635.

- JANSEN, J., MÜLLER, B., KNOBLOCH, K. (1989). Alliin lyase from garlic, *Allium sativum*: Investigation on enzyme/substrate, enzyme/inhibitor interactions, on a new coenzyme. *Planta Medica*, 55:440-445.
- JAYAKODY, L., KAPPAGODA, T., SENARATNE, M.P.J., THOMSON, A.B.R. (1988). Impairment of endothelium-dependent relaxation: an early marker for atherosclerosis in the rabbit. *Br. J. Pharmacol.*, 94: 335-346.
- KAGAWA, K., MATSUTAKA, H., YAMAGUCHI, Y., FUKUHAMA, C. (1986). Garlic extract inhibits the enhanced peroxidation and production of lipids in carbon tetrachloride-induced liver injury. *Japanese J. Pharmacol.*, 42:19-23.
- KANDIL, O.M., ABDULLAH, T.H., ELKADI, A. (1987). Garlic and the immune system in humans: its effect on natural killer cells. *Federation Proceedings*, 46:441.
- KARAKI, H., SATO, K., OZAKI, H. (1991). Different effects of verapamil on cytosolic Ca²⁺ and contraction in norepinephrine-stimulated vascular smooth muscle. *Jpn. J. Pharmacol.*, 55: 35-42.
- KARAKI, H., MATSUDA, Y. (1996). RES-701-1: a novel endothelin ET_B receptor antagonist. *Cardiovasc. Drug Rev.*, 14: 17-35.
- KARAKI, H., OZAKI, H., HORI, M., MITSUI-SAITO, M., AMANO, K., HARADA, K., MIYAMOTO, S., NAKAZAWA, H., WON, K., SATO, K. (1997). Calcium movements, distribution and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.*, 49: 157-230.
- KAYE, A.D., DE WITT, B.J., ANWAR, M., SMITH, D.E., FENG, C.J., KADOWITZ, P.J., NOSSAMAN, B.D. (2000). Analysis of responses of garlic derivatives in the pulmonary vascular bed of the rat. *J. Appl. Physiol.*, 89: 353-358.
- KEANEY, J.F.Jr., GAZIANO, J.M., XU, A., FREI, B., CURRAN-CELENTANO, J., SHWAERY, G.T., LOSCALZO, J., VITA, J.A. (1994). Low-dose α -tocopherol improves and high-dose α -tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol fed rabbits. *J. Clin. Invest.*, 151:431-437.
- KEY, T.J.A., SILCOCKS, P.B., DAVEY, G.K., APPLEBY, P.N., BISHOP, D.T. (1997). A case-control study of diet and prostate cancer. *Brit. J. Cancer*, 76: 648-687.
- KHAN, S., HIGDON, N., MEISHERI, K. (1998). Coronary vasorelaxation by nitroglycerin: Involvement of plasmalemmal calcium-activated K⁺ channels and intracellular Ca²⁺ stores. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284: 838-846.

- KNOT, H.J., ZIMMERMANN, P.A., NELSON, M.T. (1996). Extracellular K⁺ induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁺ channels. *J. Physiol.*, 492: 419-430.
- KNOWLES, L.M., MILNER, J.A. (2000). Allyl sulfides modify cell growth. *Drug Metabol. Drug Interact.*, 17: 81-107.
- KNOWLES, L.M., MILNER, J.A. (2001). Possible mechanism by which allyl sulfides suppress neoplastic cell proliferation. *J. Nutrition (suppl)*, 131: 1061-1070.
- KO, Y., GÖRG, A., APPENHEIMER, M., WIECZOREK, A.J., DÜSING, R., VETTER, H., SACHINIDIS, A. (1992). Losartan inhibits angiotensin II-induced stimulation of phosphoinositide signaling system in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.*, 227: 215-223.
- KOCH, P., JAGER, W., HYSEK, J., KORPERT, B. (1992) *Garlic and onion extracts. In vitro inhibition of adenosine deaminase. Phytotherapy Res.*, 6:50-52.
- KOSCIELNY, J., KLUSSENDORF, D., LATZA, R., SCHMITT, R., RADTKE, H., SIEGEL, G., KIESEWETTER, H. (1999). The antiatherosclerotic effect of *Allium sativum*. *Atherosclerosis*, 144: 237-249.
- KOUROUNAKIS, P.N., REKKA, E.A. (1991). Effect on active oxygen species of alliin and *Allium sativum* (garlic) powder. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 49:252-258.
- KRITCHEVSKY, D., TEPPER, S.A., MORRISEY, R., KLURFELD, D. (1980). Influence of garlic oil on cholesterol metabolism in rats. *Nutr. Reports Int.*, 22:641-645.
- KUGIYAMA, K., KERNS, S.A., MORRISETT, J.D., ROBERTS, R., HENRY, P.D. (1990). Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low density lipoproteins. *Nature*, 344:160-162.
- KUKREJA, R.C., KONTOS, H.A., HESS, M.L., ELLIS, E.F. (1986). PGH synthase and lipooxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ. Res.*, 59: 612-619.
- KUMAR, M., BERWAL, J.S. (1998). Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). *J. Appl. Microbiol.*, 84: 213-215.
- KUZUYA, M., NAITO, M., FUNAKI, C., HAYASHI, T., ASAI, K., KUZUYA, F. (1991). Lipid peroxide and transition metals are required for the toxicity of oxidized low density lipoprotein to cultured endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1096: 155-161.

- LAMPING, K.G., PIEGORS, D.J., BENZULY, K.H., ARMSTRONG, M.L., HEISTAD, D.D. (1994). Enhanced coronary vasoconstrictive response to serotonin subsides after removal of dietary cholesterol in atherosclerotic monkeys. *Atheroscler. Thromb.*, 14:951-957.
- LANCASTER, J.E., COLLIN, H.A. (1981). Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant. Sci. Lett.*, 22:169-176.
- LASH, J.P., CARDOSO, L.R., MESLER, P.M., WALCZAC, D.A., POLLAK, R. (1998). The effect of garlic on hypercholesterolemia in renal transplant patients. *Transplantation Proc.*, 30: 189-191.
- LAU, B.H.S., ADETUMBI, M.A., SANCHEZ, A. (1983). *Allium sativum* (garlic) and atherosclerosis: a review. *Nutr. Res.*, 3:119-126.
- LAU, B.H.S., WOOLLEY, J.L., MARSH, C.L., BARKER, G.R., KOOBS, D.H., TORREY, R.R. (1986). Superiority of intralesional immunotherapy with *Corynebacterium parvum* and *Allium sativum* in control of murine transitional cell carcinoma. *J. Urol.*, 136:701-705.
- LAU, B.H.S., LAM, F., WANG-CHENG, R. (1987). Effect of an odor-modified garlic preparation on blood lipids. *Nutr. Res.*, 7:139-149.
- LAU, B.H.S. (1989a). Anticoagulant and lipid regulating effects of garlic (*Allium sativum*). In New Protective Roles of Selected Nutrients in Human Nutrition, Gene A. Spiller and James Scala, editors, Alan R. Liss, publisher, p. 295.
- LAU, B.H.S. (1989b). Detoxifying, radioprotective, and phagocyte-enhancing effects of garlic. *Intern. Clin. Nutr. Rev.*, 9:27-33.
- LAU, B.H.S. YAMASAKI, T., GRIDLEY, D.S. (1991). Garlic compounds modulate macrophage and T-lymphocyte functions. *Mol. Biotherapy*, 3:103-108.
- LAU, B.H.S. (1995). Phytochemical research at LLU. *Alumni. J.*, Nov.-Dec.:8.
- LAWSON, L.D., RANSOM, D.K., HUGHES, B.G. (1992). The inhibition of whole blood-aggregation by compounds in garlic clove extracts and commercial garlic products. *Thromb. Res.*, 65(2):141-156.
- LEDUC, I., MELOCHE, S. (1995). Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 270: 4401-4404.
- LEE, E.S., STEINER, M., LIN, R. (1994). Thioallyl compounds: Potent inhibitors of cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1221(1):73-77.

- LEGNANI, C., FRASCARO, M., GUAZZALOCA, G., LUDOVICI, S., CESARANO, G., COCCHERI, P. (1993). Effects of a dried garlic preparation on fibrinolysis and platelet aggregation in healthy subjects. *Arzneimittelforschung*, 43(2): 119-122.
- LEVI, F., PASCHE, C., LA VECCHIA, C., LUCCHINI, F., FRANCESCHI, S. (1999). Food groups and colorectal cancer risk. *Brit. J. Cancer*, 79: 1283-1287.
- LEVIN, E. (1995). Endothelins. *N. Engl. J. Med.*, 333: 356-363.
- LEWIN, G., POPOV, I. (1994). Antioxidant effects of aqueous garlic extract. 2nd communication: Inhibition of the Cu²⁺-initiated oxidation of low density lipoproteins. *Arzneim. Forsch.*, 44:604-610
- LIBBY, P. (1999). Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.*, 247: 349-358.
- LIU, J., LIN, R.I., MILNER, J.A. (1992). Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors and DNA adducts by garlic powder. *Carcinogenesis*, 13:1847-1852.
- LOEPER, M., DEBRAY, M. (1921). Antihypertensive action of garlic extract. *Bull Soc. Med.*, 37:1032-1039.
- LOREE, H.M., KAMM, R.D., STRINGFELLOW, R.G., LEE, R.T. (1992). Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ. Res.*, 71: 850-858.
- LUDMER, P.L., SELWYN, A.P., SHOOK, T.L., WAYNE, R.R., MUDGE, G.H., ALEXANDER, R.W., GANZ, P. (1986). Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Eng. J. Med.*, 315: 1046-1051.
- LURIE, K.G., CHIN, J.H., HOFFMAN, B.B. (1985). Decreased membrane fluidity and β -adrenergic responsiveness in atherosclerotic quail. *Am. J. Physiol.*, 249: H380-H385.
- LÜSCHER, T.F., BOULANGER, C.M., DOHI, Y., YANG, Z. (1992). Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension*, 2: 117-130.
- LÜSCHER T.F., TANNER F.C., TSCHUDI M.R. (1993). Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *An. Rev. Med.*, 44:395-418.
- LÜSCHER, T.F., OEMAR, B.S., BOULANGER, C.M., HAHN, A.W.A. (1996). Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors. *En:*

Lindpainter K, Ganten D, eds. Molecular reviews in cardiovascular medicine. London: Chapman and Hall, 96-104.

LUSIS, A.J., WEINREB, A., DRAKE, T.A. (1998). *In text book of Cardiovascular Medicine (ed Topol, E.J.), (Lippincott-Raven Philadelphia), 2389-2413.*

LUSIS, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407: 233-241.

MACKNESS, M.I., DURRINGTON, P.N. (1995). HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 115: 243-253.

MADER, F.H. (1990). Treatment of hyperlipidemia with garlic powder tablets. *Arzneim. Forsch. Drug Res.*, 40: 1111-1116.

MAJESKY, MW., SCHWARTZ, S.M., CLOWES, M.M., CLOWES, A.W. (1987). Heparin regulates smooth muscle cell S phase entry in the injured rat carotid artery. *Circ. Res.*, 61: 296-300.

MAKHEJA, A.N., BAILEY, J.M. (1990). Antiplatelet constituents of garlic and onion. *Agents and Actions.*, 29: 360-363

MANGIN, E.L., KUGIYAMA, K., NGUY, J.H., KERNS, S.A., HENRY, P.D. (1993). Effects of lysolipids and oxidatively modified low density lipoprotein on endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Circ. Res.*, 72: 161-166.

MANSON, M.M., BALL, H.W.L., BARRET, M.C., CLARK, H.L., JUDAH, D.J., WILLIAMSON, G., NEAL, G.E. (1997). Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phase I and II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B₁ metabolism. *Carcinogenesis*, 18: 1729-1738.

MARATHE, S., KURIAKOSE, G., WILLIAMS, K.J., TABAS, I. (1999). Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 19: 2648-2658.

MARCHAND, L.L., HANKIN, J.H., WILKENS, L.R., KOLONEL, L.N., ENGLYST, H.N., LYU, L.C. (1997). Dietary fiber and colorectal cancer risk. *Epidemiol.*, 8: 658-664.

MARSH, C.L., TORREY, R.R., WOOLLEY, J.L., BARKER, G.R., LAU, B.H.S. (1987). Superiority of intravesical immunotherapy with *Corynebacterium parvum* and *Allium sativum* in control of murine bladder cancer. *J. Urol.*, 137:359-363.

- MARTIN, N., BARDISA, L., PANTOJA, C., ROMÁN, R., VARGAS, M. (1992). Experimental cardiovascular depressant effects of garlic (*Allium sativum*) dialysate. *J. Ethnopharm.*, 37: 145-149.
- MARTIN, G.R., DANNER, D.B., HOLBROOK, N.J. (1993). Aging-causes and defenses. *Annu. Rev. Med.*, 44:419-427.
- MARX, J.L. (1985). The immune system “Belongs in the Body”. *Science*, 227:1190-1200.
- MASAKI, T., YANAGISAWA, M., GOTO, K. (1992). Physiology and pharmacology of endothelins. *Med. Res. Rev.*, 12: 391- 421.
- MATSUDA, H. (2001). Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease. *J. Nutrition (suppl)*, 131: 1000-1005.
- MATSUDA, Y., HIRATA, K., INOUE, N., SUEMATSU, M., KAWASHIMA, S., AKITA, M., YOKOYAMA, M. (1993). High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidised low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ. Res.*, 72: 1103-1109.
- MATTHYS, K.E., BULT, H. (1997). Nitric oxide function in atherosclerosis. *Mediators Inflamm.*, 6: 3-21.
- MAYEUX, P.R., AGRAWAL, K.C., TOU, J.-S. H., KING, B.T., LIPPTON, H.L., HYMAN, A.L., KADOWITZ, P.J., McNAMARA, D.B. (1988). The pharmacological effects of allicin, a constituent of garlic oil. *Agents and Actions*, 25:1/2 182-190.
- McCRINDLE, B.W., HELDEN, E., CONNER, W.T. (1998). Garlic extract therapy in children with hypercholesterolemia. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 152: 1089-1094.
- McDANIEL, N., CHEN, X., SINGER, H., MURPHY, R., REMBOLD, C. (1992). Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing $[Ca^{2+}]_i$ and uncoupling stress from myosin phosphorylation. *Am. J. Physiol.*, 263:C461-C467.
- McMAHON, F.G., VARGAS, R. (1993). Can garlic lower blood pressure?. A pilot study. *Pharmacotherapy*, 13:406-410.
- McMANUS, J.F.A., MOWRY, R.W. (1968). Técnica histológica. *Atika.*, 136-140.
- MEHRABIAN, M., WEN, P.Z., FISLER, J., DAVIES, R.C., LUSIS, A.J. (1998). Genetic loci controlling body fat, lipoprotein metabolism, and insulin levels in a multifactorial mouse model. *J. Clin. Invest.*, 101:2485-2496.

- MEI, X., WANG, M.L., XU, H.X., PAN, X.P., GAO, C.Y., HAN, N., FU, M.Y. (1982). Garlic and gastric cancer. *Acta Nutr. Sinica*, 4:53-56.
- MILLER, G.J., MILLER, N.E. (1975). Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet*, 1:16.
- MILLER, N.E., LA VILLE, A., CROOK, D. (1985). Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by high-density lipoprotein in rabbit. *Nature*, 314: 109-111.
- MINOR, R.L.Jr, MYERS, P.R., GUERRA, R.Jr., BATES, J.N., HARRISON, D.G. (1990). Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J. Clin. Invest.*, 86: 2109-2116.
- MIWA, Y., HIRATA, K., MATSUDA, Y. (1994). Augmented receptor-mediated Ca^{2+} mobilization causes supersensitivity of contractile responses to serotonin in atherosclerotic arteries. *Circ. Res.*, 75:1096-1102.
- MIYOSHI, Y., NAKAYA, Y., WAKATSUKI, T., KAKAYA, S., FUJINO, K., SAITO, K., INOUI, I. (1992). Endothelin blocks ATP-sensitive K^+ channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Circ. Res.*, 70: 612-616.
- MOMBOULI, J.V., VANHOUTTE, P.M. (1997). Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol. Sci.*, 18: 252-256.
- MONCADA, S., GERMAN, A.G., HIGGS, E.A., VANE, J.R. (1977). Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb. Res.*, 11:323-344.
- MORCOS, N.C. (1997). Modulation of lipid profile by fish oil and garlic combination. *J. Natl. Med. Assoc.*, 89: 673-678.
- MORIGUCHI, T., SAITO, H., NISHIYAMA, N. (1994a). Effect of aged garlic extract (AGE) on improvements of learning and memory performances in senescence accelerated mouse. In *The SAM Model of Senescence*, T. Takeda, editor, Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands, p.447.
- MORIGUCHI, T., TAKASHINA, K., CHU, P.J., SAITO, H., NISHIYAMA, N. (1994b). Prolongation of life span and improved learning in the senescence accelerated mouse produced by aged garlic extract. *Biol. Pharm. Bull.* 17:1589-1594.
- MORIOKA, N., SZE, L.L., MORTON, D.L., IRIE, R.F. (1993). A protein fraction from aged garlic extract enhances cytotoxicity and proliferation of human

- lymphocytes mediated by interleukin-2 and concanavalin A. *Cancer Immunol. Immunother.*, 37:316-321.
- MOULTAN, K.S., FOLKMAN, J. (1999). In *Molecular Basis of Cardiovascular Disease* (ed. Chien, K. R.) (Saunders, Philadelphia), 393-410.
- MÜGGE, A., BRANDES, R.P., BOGER, R.H., DWENGER, A., BODE-BOGER, S., KIENKE, S., FROLICH, J.C., LICHTLEN, P.R. (1994). Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 24: 994-998.
- MULVANY, M.J., HALPERN, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.*, 41: 19-26.
- MUROHARA, T., KUGIYAMA, K., OHGUSHI, M., SUGIYAMA, S., OHTA, Y., YASUE, H. (1994). LPC in oxidized LDL elicits vasoconstriction and inhibits endothelium-dependent relaxation. *Am. J. Physiol.*, 267:H2441-H2449.
- MURPHY, M., BRAYDEN, J. (1995). Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J. Physiol.*, 486: 47-58.
- MYERS, P.R., WRIGHT, T.F., TANNER, M.A., OSTLUND, R.E.Jr. (1994). The effects of native LDL and oxidized LDL on EDRF bioactivity and nitric oxide production in vascular endothelium. *J. Lab. Clin. Med.*, 124:672-683.
- NAGAI, K. (1973). Experimental studies on the preventive effect of garlic extract against infection with influenza virus. *Japanese J. Inf. Dis.*, 47:321-330.
- NAKAGAWA, S., YOSHIDA, S., HIRAO, Y., KASUGA, S., FUWA, T. (1985). Cytoprotective activity of components of garlic, ginseng and ciuwjia on hepatocyte injury induced by carbon tetrachloride in vitro. *Hiroshima J. Med. Sci.*, 34:303-307.
- NAKASHIMA, M., MOMBOULI, J.V., TAYLOR, A.A., VANHOUTTE, P.M. (1993). Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J. Clin. Invest.*, 92: 2867-2871.
- NAKATA, T., FUJIWARA, M. (1975). Adjuvant action of garlic sugar solution in animals immunized with Ehrlich ascites tumor cells attenuated with alliin. *Gann.*, 66:417-422.
- NANDA, V., HENRY, P.D. (1982). Increased serotonergic and alpha-adrenergic receptors in aortas from rabbits fed a high cholesterol diet. *Clin. Res.*, 30: 209A.

- NATHAN, L., CHAUDHURI, G. (1997). Estrogens and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37: 477-515.
- NEES, S., GERLACH, E. (1983). *Topics and Perspectives in Adenosin Research*, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, p. 347.
- NEGORO, N., KANAYAMA, Y., HARAGUCHI, M., UMETANI, N., NISHIMURA, M., KONISHI, Y., IWAI, J., OKAMURA, M., INOUE, T., TAKEDA T. (1995). Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J. Clin. Invest.*, 95: 1140-1150.
- NELSON, M.T., STANDEN, N.B., BRAYDEN, J., WORLEY, J.F. (1988). Noradrenaline contracts arterieise by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature*, 336:382-385.
- NEWMAN, T.B., HULLEY, S.B. (1996). Carcinogenicity of lipid-lowering drugs. *JAMA*, 275: 55-60.
- OHARA, Y., PETERSON, T.E., HARRISON, D.G. (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.*, 91: 2546-2551.
- OHGUSHI, M., KUGIYAMA, K., FUKUNAGA, K., MUROHARA, T., SUGIYAMA, S., MIYAMOTO, E., YASUE, H. (1993). Protein kinase C inhibitors prevent impairment of endothelium-dependent relaxation by oxidatively modified LDL. *Atheroscl. Thromb.*, 13:1525-1532.
- OHYA, Y., SPERALAKIS, N. (1991). Involment of a GTP-binding protein in stimulating action of angiotensin II on calcium channels in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, 68: 763-771.
- OREKHOV, A.N., TERTOV, V.V., SOBENIN, I.A., PIVOVAROVA, E.M. (1995). Direct anti-atherosclerosis-related effects of garlic. *Ann-Med.* 27(1):63-65.
- OREKHOV, A.N., TERTOV, V.V. (1997). In-vitro effect of garlic powder extract on lipid content in normal and atherosclerotic human aortic cells. *Lipids*, 32: 1055-1060.
- ORLOV, S., RESINK, T., BERNHARDT, J., FERRACIN, F., BUHLER, F. (1993). Vascular smooth muscle cell calcium fluxes. Regulation by angiotensin II and lipoproteins. *Hypertension*, 21: 195-203.
- OURY, T.D., DAY, B.J., CRAPO, J.D. (1996). Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Laboratory Investigation*, 75: 617-636.

- OWENS, G.K., GEISTERFER, A.A.T., YANG, Y.W.H., KOMORIYA, A. (1988). Transforming growth factor β -induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Biol.*, 107: 771-780.
- PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526.
- PAN, X.Y. (1985). Comparison of the cytotoxic effect of fresh garlic, diallyl trisulfide, 5-fluorouracil, mitomycin C and cis-DDP on two lines of gastric cancer cells. *Chung-Hua Chung Liu Tsa Chih*, 7:103-107.
- PARKER, L.L., PIWNICA-WORMS, H. (1992). Inactivation of the p^{34cdc2}-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*, 257:1955-1957.
- PARSAEE, H., McEWAN, J.R., SUNIL, J., McDERMOT, J. (1992). Differential sensitivities of the prostacyclin and nitric oxide biosynthetic pathways to cytosolic calcium in bovine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 1013-1019.
- PARTHASARATHY, S., WIELAND, E., STEINBERG, D. (1989). A role for endothelial cell lipooxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1046-1050.
- PATUMRAJ, S., TEWIT, S., AMATYAKUL, S., JARIYAPONGSKUL, A., MANEESRI, S., KASANTIKUL, V., SHEPRO, D. (2000). Comparative effects of garlic and aspirin on diabetic cardiovascular complications. *Drug Deliv.*, 7: 91-96.
- PETKOV, V. (1949). A pharmacological study of garlic (*Allium sativum* L.). *Annuaire de l'Universite de Sofia, faculte de Medecine*, t. XXVIII 885.
- PETKOV, V. (1950). On the action of garlic (*Allium sativum* L.) on the blood pressure. *Sovremenna Medicina*, 1:5-9.
- PETKOV, V. (1953). New experimental data about the pharmacodynamics of some plant species. *Sofia: Nauka i Iskustve*, 227-230.
- PETKOV, V. (1962). Uber die Pharmakodynamik einiger in Bulgarien wildwachsender bzw angebaute Arzneipflanzen. *Zeitschrift fur arztliche Fortbildung*, 56: 430-435.
- PETKOV, V., STOEV, V., BAKALOV, D., PETEV, L. (1965). The Bulgarian drug Satal as a remedy for lead intoxication in industrial conditions. *Higiena Truda i Profesionalnie Zabolevania*, 4:42-48.

- PETKOV, V. (1979). Plants with hypotensive, antiatheromatous and coronarodilatating action. *Am. J. Chinese Med.*, 3:197-203.
- PHELPS, S., HARRIS, W. (1993). Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. *Lipids*, 28(5):475-477.
- PHILIP, M.C., JOHNSON, W.J., ROTHBLAT, G.H. (1987). Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim. Biophys. Acta.*, 906: 223-228.
- PIOTROWSKI, G. (1948). L'ail en therapeutique. *Praxis*, 488.
- PLANE, F., BRUCKDORFER, K.R., KERR, P., STEUER, A., JACOBS, M. (1992). Oxidative modification of low-density lipoprotein and the inhibition of relaxations mediated by endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 105:216-222.
- PLANE, F., WILEY, K., JEREMY, J., COHEN, R., GARLAND, C. (1998). Evidence that different mechanisms underlie smooth muscle relaxation to nitric oxide and nitric oxide donors in the rabbit isolated carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*, 123: 1351-1358.
- PODREZ, E.A., FEBBRAIO, M., SHEIBANI, N., SCHMITT, D., SILVERSTEIN, R.L., HAJJAR, D.P., COHEN, P.A., FRAZIER, W.A., HOFF, H.F., HAZEN, S.L. (2000). Macrophage scavenger receptor CD36 is the major for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J. Clin. Invest.*, 105: 1095-1108.
- POPOV, I., BLUMSTEIN, A., LEWIN, G. (1994). Antioxidant effects of aqueous garlic extract. 1st communication: direct detection using the photochemiluminescence. *Arzneim. Forsch.*, 44:602-610.
- PYÖRÄLÄ, K., DE BACKER, G., GRAHAM, I., POOLE-WILSON, P., WOOD, D. (1994). Prevention of coronary heart disease in clinical practise. Recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society, and European Society of Hypertension. *Eur. Heart J.*, 15: 1300-1331.
- QUAYLE, J.M., NELSON, M.T., STANDEN, N.B. (1996). The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. *J. Physiol.*, 494: 715-726.
- QUINN, M.T., PARTHASARATHY, S., FONG, L.G., STEINBERG, D. (1987). Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2995-2998.

- QURESHI, A.A., ABUIRMEILEH, N., DIN, Z.Z., ELSON, C.E., BURGER, W.C. (1983a). Inhibition of cholesterol and fatty acid biosynthesis in liver enzymes and chicken hepatocytes by polar fractions of garlic. *Lipids*, 18:343-348.
- QURESHI, A.A., DIN, Z.Z., ABUIRMEILEH, N., BURGER, W.C., AHMAD, Y., ELSON, C.E. (1983b). Suppression of avian hepatic lipid metabolism by solvent extracts of garlic: impact on serum lipids. *J. Nutr.*, 113: 1746-1755.
- QURESHI, A.A., CRENSHAW, T.D., ABUIRMEILEH, N., PETERSON, D.M., ELSON, C.E. (1987). Influence of minor plant constituents on porcine hepatic lipid metabolism. Impact on serum lipids. *Atherosclerosis*, 64:109-115.
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M.J., MONCADA, S. (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, 92: 639-646.
- RAHMAN, K., BILLINGTON, D. (2000). Dietary supplementation with garlic extract inhibits ADP-induced platelet aggregation in humans. *J. Nutrition*, 130: 2662-2665.
- RAPOPORT, R.M., SCHWARTZ, K., MURAD, F. (1985). Effect of sodium-potassium pump inhibitors and membrane-depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation and cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta. *Circ. Res.*, 57: 164-170.
- REDDY, K.K., BULLIYYA, G., CHANDRAIAH, T.R., KUMARI, K.S., REDDANNA, P., THYAGARAJU, K. (1991). Serum lipids and lipid peroxidation pattern in industrial and rural workers in India. *Age*, 14:33-40.
- REEVE, V.E. BOSNIC, M., ROZINOVA, E., BOEHM-WILCOX, C. (1993). A garlic extract protects from ultraviolet B (280-320 nm) radiation-induced suppression of contact hypersensitivity. *Photochem. Photobiol.*, 58:813-818.
- REILLY, C.F., KINDY, M.S., BOWEN, K.E., ROSENBERG, R.D., SOHNENSHEIN, G.E. (1989). Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G₁ phase of the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 264: 6990-6995.
- RILEY, V. (1981). Psychoneuroendocrine influences on immunocompetence and neoplasia. *Science*, 212:1100-1106.
- ROSS, R., GLOMSET, J., KARIYA, B., HARKER, L. (1974). A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:1207-1210.

- ROSS, R., RAINES, E.W., BOWEN-POPE, D.F. (1986). The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 46: 155-169.
- ROSS, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362: 801-809.
- ROSS, R. (1999). Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, 340: 115-126.
- RUBANYI, G.M., VANHOUTTE, P.M. (1986). Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 19: H815-H821.
- RUBANYI, G.M., POLOKOFF, M. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.*, 46: 325-415.
- RUIZ, E., TEJERINA, T. (1998). Relaxant effect of L-citrulline in rabbit vascular smooth muscle relaxation. *Br. J. Pharmacol.*, 125: 186-192.
- RUIZ-VELASCO, V., ZHONG, J., HUME, J., KEEF, K. (1998). Modulation of Ca²⁺ channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ. Res.*, 82: 557-565.
- SAGAR, S., KALLO, I.J., KAUL, N., GANGULY, N.K., SHARMA, B.K. (1992). Oxygen free radicles in essential hypertension. *Mol. Cell Biochem.*, 111:103-108.
- SAINANI, G.S., DESAI, D.B., MORE, K.N. (1976). Onion, garlic and atherosclerosis. *Lancet*, 1:575.
- SAINANI, G.S., DESAI, D.B., GORHE, N.H., NATU, S.M., PISE, D.V., SAINANI, P.G. (1979a). Dietary garlic, onion and some coagulation parameters in Jain community. *J. Asso. Phys. India*, 27:707-712.
- SAINANI, G.S., DESAI, D.B., GORHE, N.H., NATU, S.M., PISE, D.V., SAINANI, P.G. (1979b). Effect of dietary garlic and onion on serum lipid profile in Jain community. *Indian J. Med. Res.*, 69:776-780.
- SAN-BLAS, G., URBINA, J.A., MARCHAN, E., CONTRERAS, L.M., SORIAIS, F., SAN-BLAS, F. (1997). Inhibition of Parachccidioides brasiliensis by ajoene is associated with blockade of phosphatylcholine biosynthesis. *Microbiol.*, 143: 1581-1586.
- SAPPEY, C., LECLERCQ, P., COUDRAY, C., FAURE, P., MICOUD, M., FAVIER, A. (1994). Vitamin, trace element and peroxide status in HIV

seropositive patients: asymptomatic patients present a severe beta-carotene deficiency. *Clin. Chim. Acta.*, 230:35-40.

SASO, Y., KITAMURA, K., YASOSHIMA, A., IWASAKI, H.O., TAKASHIMA, K., DOI, K., MORITA, T. (1992). Rapid induction of atherosclerosis in rabbits. *Histol. Histopathol.*, 7: 315-330.

SATO, K., OZAKI, H., KARAKI, H. (1988). Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator Fura 2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246: 294-300.

SAXENA, K.K., GUPTA, B., KULSHRESTHA, V.K., SRIVASTAVA, R.K., PRASAD, D.N. (1980). Effect of garlic pretreatment on isoprenaline-induced myocardial necrosis in albino rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 24:233-240.

SCHAFFER, E.M., LIU, J.Z., GREEN, J., DANGLER, H.A., MILNER, J.A. (1996). Garlic and associated allyl sulfur components inhibit N-methyl-N-nitrosourea induced rat mammary carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 102:199-204.

SCHEFFLER, E., HUBER, L., FRÜHBI, S., SCHULZ, I., ZIEGLER, R., DRESEL, H.A. (1990). Alteration of plasma low density lipoprotein from smokers. *Atherosclerosis*, 82: 261-265.

SCHINI, V.B., VANHOUTTE, P.M. (1991). Endothelin-1: a novel vasoactive peptide. *Pharmacol. Toxicol.*, 69: 1-7.

SCHMIDT, K., GRAIER, W.F., KOSTNER, G.M., MAYER, B., BOHME, E., KUKOVETZ, W.R. (1991). Stimulation of soluble guanylate cyclase by endothelium-dependent relaxing factor is antagonized by Oxidized low-density lipoprotein. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 17 (Suppl 3): S83-S88.

SCHMUNK, G.A., LEFER, A.M. (1982). Anti-aggregatory actions of calcium channel blockers in cat platelets. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 35:179-185.

SCHONBECK, U., MACH, F., SUKHOVA, G.K., HERMAN, M., GRABER, P., KEHRY, M.R., LIBBY, P. (2000a). CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.*, 156: 7-14.

SCHÖNBECK, U., SUKHOVA, G.K., SHIMIZU, K., MACH, F., LIBBY, P. (2000b). Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7458-7463.

- SCHWARTZ, R.S., MURPHY, J.G., EDWARDS, W.D., CAMRUD, A.R., VLIESTRA, R.E., HOLMES, D.R. (1990). Restenosis after balloon angioplasty: a practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation*, 82: 2190-2200.
- SELLKE, F.W., ARMSTRONG, M.L., HARRISON, D.G. (1990). Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation*, 81:1586-1593.
- SENDL, A., ELBL, G., STEINKE, B., REDL, K., BREU, W., WAGNER, H. (1992). Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta Med.*, 58: 1-7.
- SHEELA, C.G., KUMUD, K., AUGUSTI, K.T. (1995). Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide acids in rats. *Planta Med.*, 61:356-361.
- SHENOY, N.R., CHOUGHULEY, A.S.U. (1992). Inhibitory effect of diet related sulphhydryl compounds on the formation of carcinogenic nitrosamines. *Cancer Lett.*, 65:227.
- SHIH, D.M., XIA, Y.R., WANG, X.P., MILLER, E., CASTELLANI, L.W., SUBBANAGOUNDER, G., CHEROUTRE, H., FAULL, K.F., BERLINER, J.A., WITZTUM, J.L., LUSIS, A.J. (2000). Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.*, 276: 17527-17535.
- SHIH, P.T., BRENAN, M.L., VORA, D.K., TERRITO, M.C., STRAHL, D., ELICES, M.J., LUSIS, A.J., BERLINER, J.A. (1999). Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ Res.*, 84: 345-351.
- SHIMOKAWA, H., VANHOUTTE, P.M. (1989a). Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circ. Res.*, 64:900-914.
- SHIMOKAWA H, VANHOUTTE PM. (1989b). Hypercholesterolemia causes generalized impairment of endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets in porcine arteries. *J. Am. Coll. Cardiol.* 13: 1402-1408.
- SHOETAN, A., AUGUSTI, K.T., JOSEPH, P.K. (1984). Hypolipidemic effects of garlic oil in rats fed ethanol and a high lipid diet. *Experientia*, 40:261-267.
- SIEGEL, G., WALTER, A., SCHNALKE, F., SCHMIDT, A., BUDDECKE, E., LOIRAND, G., STOCK, G. (1991). Potassium channel activation, hyperpolarization, and vascular relaxation. *Z. Kardiol.*, 80 Suppl. 7:9-14.

- SIEGEL, G., EMDEN, J., WENZEL, K., MIRONNEAU, J., STOCK, G. (1992). Potassium channel activation in vascular smooth muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 311:53-72.
- SIEGEL, G., WALTER, A., ENGEL, S., WALPER, A., MICHEL, F. (1999). Pleiotropic effects of garlic. *Wien Med. Wochenschr.*, 149 (8-10): 217-224.
- SILAGY, C.A., NEIL, A.W. (1994a). A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure. *J. Hypertension*, 12: 463-468.
- SILAGY, C.A., NEIL, A.W. (1994b). Garlic as a lipid-lowering agent-a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. R. Coll. Physicians Lond.*, 28: 39-45.
- SIMON, B.C., CUNNINGHAM, L.D., COHEN, R.A. (1990). Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J. Clin. Invest.*, 83:75-79.
- SIMONS, L.A., BALASUBRAMANIAM, S., VON KONIGSMARK, M., PARFITT, A., SIMONS, J., PETERS, W. (1995). On the effect of garlic on plasma lipids and lipoproteins in mild hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 113: 219-225.
- SIMONSEN, U., EHRNROOTH, E., GERDES, L.U., FAERGEMANN, O., BUCH, J., ANDREASEN, F., MULVANY, M.J. (1991). Functional properties in vitro of systemic small arteries from rabbits fed a cholesterol-rich diet for 12 weeks. *Clin. Sci.*, 80: 119-129.
- SIMONSON, M.S., WANN, S., MENE, P. (1989). Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.*, 83: 708-712.
- SINGH, A., SHUKLA, Y. (1998). Antitumor activity of diallyl sulfide in two-stage mouse skin model of carcinogenesis. *Biomed. Environ Sci.*, 11: 258-263.
- SINGH, S.V., PAN, S.S., SRIVASTAVA, S.K., XIA, H., HU, X., ZAREN, H.A., ORCHARD, J.L. (1998). Differential induction of NAD(P)H: quinone oxidoreductase by anticarcinogenic organosulfides from garlic. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 244: 917-920.
- SMITH, J.D., TROGAN, E., GINSBERG, M., GRIGAUX, C., TIAN, J., MIYATA, M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 8264-8268.

- SMITHIES, O., MAEDA, N. (1995). Gene targeting approaches to complex diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 5266-5272.
- SOMLYO, A., HIMPENS, B. (1989). Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J.* 5:2593-2599.
- SOMLYO, A.P., KITAZAWA, T., KOBAYASHI, S., GONG, M., SOMLYO, A.V. (1991). Pharmacological coupling: The membrane talk to the cross-bridges. *Regulation of smooth muscle contraction*. Ed. R. Moreland. Plenum Press, New York, 185-206.
- SOORANNA, S.R., PATEL, S., DAS, I. (1997). The effect of garlic on cell growth and cell division in cultured trophoblast and endothelial cell lines. *Biochem. Soc. Trans.*, 25: 456S.
- SPADY, D.K., DIETSCHY, J.M. (1985). Dietary saturated triacylglycerols suppress hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4526-4530.
- SPARNINS, V.L., MOTT, A.W., BARANY, G., WATTENBERG, L.W. (1986). Effects of allyl methyl trisulfide on glutathione S-transferase activity and benzopyrene-induced neoplasia in the mouse. *Nutr. Cancer*, 8:211-215.
- SPARNINS, V.L., BARANY, G., WATTENBERG, L.W. (1988). Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo(a)pyrene-induced neoplasia and glutathione S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis*, 9:131-134.
- SPARROW, C.P., OLSZEWSKI, J. (1992). Cellular oxidative modification of low density lipoprotein does not require lipooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:128-131.
- SRINIVASAN, V. (1969). A new antihypertensive agent. *Lancet*, 2:800.
- STAMLER, J., WENTWORTH, D., NEATON, J.D. (1986). Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous or graded? Findings in 356,222 primary screenees of the multiple risk factor intervention trial (MRFIT). *J. Am. Med. Assoc.*, 256:2823-2828.
- STEINBERG, D., PARTHASARATHY, S., CAREW, T.E., KHOO, J.C., WITZUM, J.L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320: 915-924.
- STEINBERG, D. (1991). Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation*, 84:1420-1425.

- STEINBERG, D. (1995). Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 369:39-48.
- STEINER, M., LIN, R.S. (1998). Changes in platelet function and susceptibility of lipoproteins to oxidation associated with administration of aged garlic extract. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 31: 904-908.
- STEINMETZ, K.A., POTTER, J.D., FOLSOM, A.R. (1993). Vegetables, fruits, and lung cancer in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Res.*, 53:536-540.
- STEINMETZ, K.A., KUSHI, L.H., BOSTICK, R.M., FOLSOM, A.R., POTTER, J.D. (1994). Vegetables, fruits, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 139:1-5.
- STEPP, D.W., TULENKO, T.N. (1994). Alterations in basal and serotonin stimulated calcium permeability and vasoconstriction in atherosclerotic aorta. *Atheroscler. Thromb.*, 14:1854-1859.
- STEVINSON, C., PITTLER, M.H., ERNST, E. (2000). Garlic for treating hypercholesterolemia. A meta-analysis of randomized clinical trials. *Ann. Intern. Med.*, 133: 420-429.
- STEWART-LEE, L., FORSTER, L.A., NOUROOZ-ZADEH, J., FERNS, G.A.A., ANGGARD, E.E. (1994). Vitamin E protects against impairment of endothelium-mediated relaxations in cholesterol fed rabbits. *Atheroscler. Thromb.*, 14:494-499.
- STICHER, O. (1991). Components of garlic. *Apoth. Ztg.*, 131: 403-408.
- STREBLOW, D.N., SODERBERG-NAUCLER, C., VIEIRA, J., SMITH, P., WAKABAYASHI, E., RUCHTI, F., MATTISON, K., ALTSCHULER, Y., NELSON, J.A. (1999). The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell*, 99: 511-520.
- STRICKBERGER, S.A., RUSSEK, L.N., PHAIR, R.D. (1988). Evidence for increased aortic plasma membrane calcium transport caused by experimental atherosclerosis in rabbits. *Circ. Res.*, 62: 75-80.
- SURH, Y.J., KIM, S.G., LIEM, A., LEE, J.W., MILLER, J.A. (1999). Inhibitory effects of isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl)carbamoyl]acetate (YH439) on benzo[a]pyrene-induced skin carcinogenesis and micronucleated reticulocyte formation in mice. *Mutat. Res.*, 423: 149-153.
- SWANSON, C.A., MAO, B.L., LI, J.Y., LUBIN, J.H., YAO, S.X. (1992). Dietary determinants of lung-cancer risk: results from a case-control study in Yunnan province, China. *Int. J. Cancer*, 50:876-881.

- TADI, P.P., TEEL, R.W., LAU, B.H.S. (1990). Anticandidal and anticarcinogenic potentials of garlic. *Int. Clin. Nutr. Rev.*, 10:423-428.
- TADI, P.P., TEEL, R.W., LAU, B.H.S. (1991). Organosulfur compounds of garlic modulate mutagenesis, metabolism, and DNA binding of aflatoxin B₁. *Nutr. Cancer*, 15:87-92.
- TAKASUGI, N., KOTOO, K., FUWA, T., SAITO, H. (1984). Effect of garlic on mice exposed to various stresses. *Oyo Yakuri-Pharmacometrics*, 28:991-1000.
- TAKASUGI, N., KIRA, K., FUWA, T. (1986). Effects of garlic extract preparation containing vitamins and ginseng-garlic preparation containing vitamin B₁ on mice exposed to stresses. *Oyo Yakuri-Pharmacometrics*, 31:967-970.
- TAMAOKI, J., TAGAYA, E., NISHIMURA, K., ISONO, K., NAGAI, A. (1997). Role of Na⁺-K⁺-ATPase in cyclic GMP-mediated relaxation of canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, 122: 112-116.
- TANAKA, M. (1982). Clinical studies of Kyoleopin on complaints following treatment of gynecological malignancies. *Japanese J. New Remedies*, 31:1349-1353.
- TANNER, F.C., NOLL, G., BOULANGER, C.M., LÜSHER, T.F. (1991). Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary artery: role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation*, 83:2012-2020.
- TEJERINA, T., SESIN, J., DELGADO, C., TAMARGO, J. (1988). Effect of milrione on contractility and ⁴⁵Ca movements in the isolated rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 148: 239-246.
- THORIN, E., HAMILTON, C., PRUNCIZAK, A., REID, J. (1994). Change in endothelial cell membrane properties after chronic exposure to oxidised low density lipoproteins. *J. Hypertens.*, 12 (Suppl.3): S180-183.
- TOGA, H., USHA, R.A.J. P., HILLYARD, R., KU, B., ANDERSON, J. (1991). Endothelin effects in isolated perfused lamb lungs: role of cyclooxygenase inhibition and vasomotor tone. *Am. J. Physiol.*, 261: H443-H450.
- TREASURE, C.B., KLEIN, J.L., WEINTRAUB, W.S., TALLEY, J.D., STILLABOWER, M.E., KOSINSKI, A.S., ZHANG, J., BOCCUZZI, S.J., CEDARHOLM, J.C., ALEXANDER, R.W. (1995). Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary artery disease. *N. Eng. J. Med.*, 332:481-487.

- TSAI, Y., COLE, L.L., DAVIS, L.E., LOCKWOOD, S.J., SIMMONS, V., WILD, G.C. (1985). Antiviral properties of garlic: In vitro effects on influenza B, herpes simplex and coxsackie viruses. *Planta Medica*, 5:460-464.
- UMANS, J.G., LEVI, R. (1995). Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Ann. Rev. Physiol.*, 57: 771-790.
- VAN BREEMEN, C., CHEN, Q., LAHER, I. (1995). Superficial buffer barrier function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16: 98-105.
- VANDERHOEK, J.Y., MAKHEFA, A.N., BAILEY, J.M. (1980). Inhibition of fatty acid oxygenases by onion and garlic oils. *Biochem. Pharmacol.*, 29:3169-3173.
- VANHOUTTE, P.M. (1993). The other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation*, 87 (Suppl. V): V9-V17.
- VANHOUTTE, P.M. (1996). Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *En: The Netherlands: Harwood Academic publishers.*
- VANHOUTTE, P.M. (1997). Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur. Heart J.*, 18: E19-E29.
- VERBEUREN TJ, JORDAENS F, ZOUNEKEYN L, VAN HOVE C, COENE MC, HERMAN AG. (1986). Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. *Circ Res.* 58: 552-564.
- VERBEUREN, T.J., JORDAENS, F.H., VAN HOVE, C.E., VAN HOYDANCK, E.A., HERMAN, A.G. (1990). Release and vascular activity of endothelium-derived relaxing factor in atherosclerotic rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 191: 173-184.
- VERSCHUREN, W.M., JACOBS, D.R., BLOEMBERG, B.P., KROMHOUT, D., MENOTTI, A., ARAVANIS, C., y cols. (1995). Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of seven countries study. *JAMA*, 274: 131-136.
- VIDAL, F., COLOME, C., MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J., BADIMON, L. (1998). Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric oxide synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur. J. Biochem.*, 252: 378-384.
- VORBERG, G., SCHNEIDER, B. (1990). Therapy with garlic: results of a placebo-controlled double-blind study. *Brit. J. Clin. Pract. Suppl (44)*, 69: 7-11.

- WALSH, M. (1993). Regulation of vascular smooth muscle. *Can. J. Physiol.*, 72: 919-936.
- WARGOVICH, M.J., GOLDBERG, M.T. (1985). Diallyl sulfide: a naturally occurring thioether that inhibits carcinogen-induced nuclear damage to colon epithelial cells in vivo. *Mutation Res.*, 143:127-133.
- WARGOVICH, M.J. (1987). Diallyl sulfide, a flavor component of garlic (*Allium sativum*), inhibits dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Carcinogenesis*, 8:487-489.
- WARGOVICH, M.J., IMADA, O., STEPHENS, L.C. (1992). Inhibition and post-initiation chemopreventive effects of diallyl sulfide in esophageal carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 64:39.
- WARSHAFSKY, S., KAMER, R.S., SIVAK, S.L. (1993). Effects of garlic on total serum cholesterol. A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, 119: 599-605.
- WATSON, K.E., BOSTROM, K., RAVINDRANATH, R., LAM, T., NORTON, B., DEMER, L.L. (1994). TGF- β 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J. Clin. Invest.*, 93: 2106-2113.
- WATSON, A.D., LEITINGER, N., NAVAB, M., FAULL, K.F., HORKKO, S., WITZTUM, J.L., PALINSKI, W., SCHWENKE, D., SALOMON, R.G., SHA, W., SUBBANAGOUNDER, G., FOGELMAN, A.M., BERLINER, J.A. (1997). Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J. Biol. Chem.*, 272: 13597-13607.
- WEBB, D. (1997). Endothelin: from molecule to man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 44: 9-20.
- WEISBERGER, A.S., PENSKY, J. (1957). Tumor-inhibiting effects derived from an active principle of garlic (*Allium sativum*). *Science*, 126:1112-1117.
- WEISBERGER, A.S., PENSKY, J. (1958). Tumor inhibition by a sulfhydryl-blocking agent related to an active principle of garlic (*Allium sativum*). *Cancer Res.*, 18:1301-1308.
- WHITE, C.R., BROCK, T.A., CHANG, L., CRAPO, J., BRISCOE, P., KU, D., BRADLEY, W.A., GIANTURCO, S.H., GORE, J., FREEMAN, B.A., TARPEY, M.M. (1994). Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 1044-1048.
- WITZTUM JL. (1994). The role of oxidized LDL in the atherogenic process. *J Atheroscler. Thromb.* 1: 71-75.

- XIA, Y., ZWEIER, J.L. (1997). Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94: 6954-6958.
- XIE, J.Y., GAO, Y.M., SHEN, L.C. (1992). Flow cytometric analysis of the garlic oil effect on DNA content of cancer cell cycle. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 12:92-94.
- YAMADA, Y., AZUMA, K. (1977). Evaluation of the in vitro antifungal activity of allicin. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, 11: 743-749.
- YAMASAKI, T., LI, L., LAU, B.H.S. (1994). Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytotherapy Res.*, 8:408-415.
- YANAGISAWA, M., KURUHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K., MASAKI, T. (1988). A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332: 411-415.
- YANG, Z., RICHARD, V., VON SEGESSER, L., BAUER, E., STULZ, P., TURINA, M., LUSCHER, T.F. (1990). Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries. *Circulation.*, 82: 188-195.
- YEH, Y.Y., YEH, S.M. (1994). Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis. *Lipids*, 29:189-193.
- YOKOHAMA, M., HIRATA, K., MIYAKE, R., AKITA, H., ISHIKAWA, Y., FUKUZAZI, H. (1990). Lysophosphatidylcholine: essential role in the inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by oxidized low density lipoprotein. *Biophys. Res. Commun.*, 168:301-308.
- YOKOYAMA, M., HENRY, P.D. (1979). Sensitization of isolated canine coronary arteries to calcium ions after exposure to cholesterol. *Circ. Res.*, 45: 479-486.
- YOKOYAMA, K., UDA, N., TAKASUGI, N., FUWA, T. (1986). Anti-stress effects of garlic extract preparation containing vitamins and ginseng-garlic preparation containing vitamin B₁ in mice. *Oyo Yakuri-Pharmacometrics*, 31:977-984.
- YOSHIDA, H., IWATA, N., KARSUZAKI, H., NAGANAWA, R., ISHIKAWA, K., FUKUDA, H., FUJINO, T., SUZUKI, A. (1998). Antimicrobial activity of a compound isolated from an oil-macerated garlic extract. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62: 1014-1017.

- YOU, W.C., BLOT, W.J., CHANG, Y.S., ERSHOW, A., YANG, Z.T., AN, Q., HENDERSON, B.E., FRAUMENI, J.F., WANG, T.G. (1989). Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81:162-164.
- YOU, W., ZHANG, L., GAIL, M.H., MA, J.L., CHANG, Y.S., BLOT, W.J., LI, J.Y., ZHAO, C.L., LIU, W.D., LI, H.Q., HU, Y.R., BRAVO, J.C., CORREA, P., XU, G.W., FRAUMENI, J.F.Jr. (1998). Helicobacter pylori infection, garlic intake and precancerous lesions in a Chinese population at low risk of gastric cancer. *Internat. J. Epidemiol.*, 27: 941-944.
- YOUNG KOH, J., CHOI, D.W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neuroscience Methods*, 20: 83-90
- ZHANG, Y.X., SAITO, H., NISHIYAMA, N. (1994). Ameliorating effect of aged garlic extract (AGE) on learning behaviors in thymectomized senescence accelerated mouse (SAM). In *the SAM Model of Senescence*, T. Takeda, editor, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, p. 451.
- ZHAO, Y., WANG, J., RUBIN, L., YUAN, X. (1997). Inhibition of K_v and K_{Ca} channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. *Am. J. Physiol.*, 272: H904-H912.
- ZHENG, W., BLOT, W.J., SHU, X.Q., GAO, Y.T. (1992). Diet and other risk factors for laryngeal cancer in Shanghai, China. *Am. J. Epidemiol.*, 136:178-182.
- ZHENG, Y., MORIGUCHI, T., SAITO, H., NISHIYAMA, N. (1997). Improvement of age-related deterioration of learning behaviours and immune responses by aged garlic extract. In: *Nutraceuticals: Designer foods III Garlic, Soy and Licorice* (Lachance, P.P. & Paul, P., eds.), pp. 117-129. Food and Nutrition Press, Trumbell, CT.
- ZHEZIANG INSTITUTE OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE. (1986). The effect of essential oil of garlic on hyperlipidemia and platelet aggregation. *J. Trad. Chinese Med.*, 6:117-122.
- ZIMMERMAN, W., ZIMMERMAN, B. (1990). Reduction in elevated blood lipids in hospitalised patients by standarised garlic preparation. *Br. J. Clin. Prac. Suppl.*, 69: 20-23.