

La inhibición selectiva de la ciclooxigenasa-2 mejora la disfunción endotelial y disminuye el estado inflamatorio en pacientes claudicantes

Aurora Flórez, Joaquín de Haro, Esther Martínez, César Varela, Silvia Bleda y Francisco Acín

Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Hospital Universitario de Getafe. Getafe. Madrid. España.

Introducción y objetivos. En el origen de la arteriosclerosis, actúan la disfunción endotelial y un estado proinflamatorio. En esta situación, una expresión aumentada de ciclooxigenasa-2 (COX-2) produce un incremento de sustancias vasoconstrictoras y proinflamatorias. El objetivo de este estudio es conocer la contribución de la actividad de la COX-2 en la disfunción endotelial existente en la enfermedad arterial periférica (EAP).

Métodos. Estudiamos la dilatación de la arteria braquial mediada por flujo (DABMF), las concentraciones de endotelina, proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) y el perfil lipídico de 40 pacientes claudicantes. Asignamos aleatoriamente a 20 pacientes a un grupo en el que se administró el inhibidor selectivo de la COX-2 celecoxib durante 1 semana (grupo 1), y otros 20 actuaron como controles (grupo 2).

Resultados. En el grupo 1, la DABMF aumentó significativamente 3 h después de la primera dosis de celecoxib ($3,33\% \pm 4,11\%$ frente a $6,97\% \pm 3,27\%$; $p = 0,008$) y tras 1 semana ($3,33\% \pm 4,11$ frente a $7,09\% \pm 4,4\%$; $p = 0,001$). Las concentraciones de endotelina disminuyeron significativamente en el grupo 1 ($2,92 \pm 1,87$ frente a $1,93 \pm 1,07$ pg/ml; $p = 0,018$), así como los de PCRus ($4,78 \pm 2,73$ frente a $2,95 \pm 2,11$ mg/l; $p = 0,023$) y colesterol de las lipoproteínas de baja densidad ($106,38 \pm 18,89$ frente a $90,8 \pm 28,58$ mg/dl; $p = 0,019$). Ninguno de estos parámetros cambió significativamente en el grupo 2.

Conclusiones. Los productos de la COX-2 contribuyen a la disfunción endotelial y el estado inflamatorio de la EAP. Los resultados de este estudio confirman la implicación de estos fenómenos en el origen de la arteriosclerosis. Esto puede suponer una nueva vía de estudio de posibles alternativas terapéuticas para los estadios incipientes de la enfermedad.

Palabras clave: Arteriosclerosis. Endotelio. Endotelina. Inflamación. Enfermedad vascular periférica.

VÉASE EDITORIAL EN PÁGS. 839-42

Correspondencia: Dra. A. Flórez González.
Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Hospital Universitario de Getafe.
Ctra. de Toledo, Km 12,500. 28905 Getafe. Madrid. España.
Correo electrónico: aurora.florez@terra.es

Recibido el 22 de julio de 2008.

Aceptado para su publicación el 25 de marzo de 2009.

Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition Reduces Endothelial Dysfunction and Improves Inflammatory Status in Patients With Intermittent Claudication

Introduction and objectives. Both endothelial dysfunction and a proinflammatory state are present during the early stages of atherosclerosis. In this context, increased expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) results in higher levels of vasoconstrictive and proinflammatory substances. The aim of this study was to investigate the influence of COX-2 activity on endothelial dysfunction associated with peripheral arterial disease (PAD).

Methods. Brachial artery flow-mediated dilatation (BAFMD), endothelin and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) levels, and the lipid profile were assessed in 40 patients with intermittent claudication. Of these, 20 were randomly assigned to a group in which they received the selective COX-2 inhibitor celecoxib for 1 week (Group 1), while the other 20 served as controls (Group 2).

Results. In Group 1, BAFMD increased significantly both 3 hours after the first dose of celecoxib (3.33 ± 4.11 vs. $6.97 \pm 3.27\%$; $P = .008$) and 1 week after (3.33 ± 4.11 vs. $7.09 \pm 4.40\%$; $P = .001$). The endothelin level decreased significantly in Group 1 (2.92 ± 1.87 vs. 1.93 ± 1.07 pg/ml; $P = .018$), as did the levels of hsCRP (4.78 ± 2.73 vs. 2.95 ± 2.11 mg/l; $P = .023$) and low-density lipoprotein cholesterol (106.38 ± 18.89 vs. 90.8 ± 28.58 mg/dl; $P = .019$). In Group 2, none of these parameters changed significantly.

Conclusions. COX-2 products contribute to endothelial dysfunction and an inflammatory state in PAD. This study's findings provide evidence that these phenomena are implicated in the initiation of atherosclerosis and could prove a new means of investigating alternative approaches to the treatment of early-stage disease.

Key words: Atherosclerosis. Endothelium. Endothelin. Inflammation. Peripheral arterial disease.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

INTRODUCCIÓN

La arteriosclerosis es un proceso inflamatorio sistémico, en el que está implicada una disfunción de las células endoteliales de la pared del vaso¹.

ABREVIATURAS

COX-2: ciclooxigenasa-2.

DABMF: dilatación de la arteria braquial mediada por flujo.

PCRus: proteína C reactiva medida por inmunoanálisis ultrasensible.

TG: triglicéridos.

Las prostaglandinas son una familia de mediadores lipídicos fundamentales en la inflamación². La ciclooxigenasa (COX) o prostaglandina H sintetasa es la enzima que cataliza el primer paso en la transformación del ácido araquidónico en los distintos tipos de prostaglandinas³. Existen dos isoformas de COX, la COX-1 o constitutiva, que se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos, y la COX-2 o inducible, que se expresa en respuesta a distintos estímulos proinflamatorios^{4,5}.

Se ha demostrado la presencia de COX-2 en arterias ateromatosas, pero no en vasos sanos, lo que indica un papel de esta enzima en la formación o mantenimiento de las placas de ateroma⁶.

Existen fármacos antiinflamatorios que inhiben selectivamente la COX-2, con diferentes perfiles de efectos gástricos y cardiovasculares⁷⁻¹⁰. En concreto, con el inhibidor selectivo de la COX-2 celecoxib se ha demostrado en estudios experimentales una reducción de las lesiones arterioscleróticas¹¹ y en pacientes hipertensos y con cardiopatía isquémica, una mejoría de la función endotelial y una disminución de la respuesta inflamatoria sistémica^{12,13}.

Según esos hallazgos, nos planteamos realizar un estudio con el objetivo de evaluar la acción de un fármaco antiinflamatorio sin acción antiagregante, el inhibidor selectivo de la COX-2 celecoxib, en la función endotelial (estimada por la dilatación de la arteria braquial mediada por flujo y la concentración de endotelina) y la inflamación (estimada por la concentración de proteína C reactiva ultrasensible [PCRus]) en pacientes con enfermedad arterial periférica.

MÉTODOS

Realizamos un estudio prospectivo experimental con un grupo de 40 pacientes con isquemia crónica en las extremidades inferiores con grados IIA y IIB de la Fontaine, reclutados en las consultas externas de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario de Getafe (Madrid, España).

Excluimos del estudio a los pacientes con hipertensión mal controlada, diabetes insulino dependiente, insuficiencia renal avanzada o insuficiencia cardiaca o en tratamiento crónico con nitratos o

antiinflamatorios distintos del ácido acetilsalicílico, para evitar sesgos. Todos los pacientes estaban en tratamiento con ácido acetilsalicílico.

El Comité Ético del Hospital Universitario de Getafe dio su aprobación para la realización del estudio.

En la primera visita, realizamos a todos los pacientes una anamnesis detallada, un índice tobillo/brazo y una analítica con determinación de PCRus y perfil lipídico, guardando una muestra de plasma para la ulterior determinación de endotelina. También se midió el diámetro de la arteria braquial mediado por flujo (DABMF). En esa primera visita, se aleatorizó a los pacientes a dos grupos con una técnica de aleatorización simple mediante tabla de números aleatorios. Se creó un grupo experimental y un grupo control (n = 20 en cada grupo), y todos los pacientes firmaron previamente un consentimiento informado. A los pacientes del grupo experimental se les administró celecoxib 200 mg/12 h durante 1 semana (se utilizan las dosis descritas en la literatura previa^{12,13} y los protocolos de seguimiento descritos para observar cambios en la función endotelial debidos al efecto del celecoxib). El grupo control no recibió ningún tratamiento.

A las 3 h de la aleatorización se midió en todos los pacientes el DABMF, y 1 semana después se repitieron el DABMF y las mismas determinaciones analíticas que en la primera visita (PCRus, perfil lipídico y endotelina).

Para medir el DABMF utilizamos la siguiente técnica: se visualiza mediante eco-Doppler la arteria braquial por encima del pliegue del codo en una sección longitudinal y se realizan tres mediciones del diámetro entre las interfases íntima y media. Se hincha un manguito de presión a 250 mmHg durante 5 min, y 70 s después de liberar la presión se realizan otras tres mediciones del diámetro. Para calcular la DABMF se utiliza la siguiente fórmula: la media de los diámetros postisquémicos menos la media de los diámetros basales dividido entre la media de los diámetros basales, expresado en porcentaje¹⁴. Las mediciones de la DABMF y las demás determinaciones analíticas fueron cegadas para el médico examinador, que no conocía si el paciente estaba incluido en el grupo experimental o en el control.

La PCRus se determinó con un inmunoanálisis ultrasensible¹⁵ automatizado (Roche Diagnostics) con un límite inferior de detección de 0,2 mg/l y un coeficiente de variación del 4,2% en 4 mg/l y el 6,3% en 1 mg/l.

Las concentraciones de colesterol total, colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y triglicéridos (TG) se midieron por espectrometría de absorción molecular (Roche Diagnostics); el de las lipoproteínas de baja densidad (cLDL) se

TABLA 1. Comparación de las características basales de ambos grupos

| | Experimental (n = 20) | Control (n = 20) | p |
|--------------------------|-----------------------|------------------|------|
| Mujeres, n | 2 | 2 | 1 |
| Varones, n | 18 | 18 | 1 |
| Hipertensión, n | 14 | 16 | 0,46 |
| Diabetes, n | 9 | 7 | 0,51 |
| Dislipemia, n | 10 | 11 | 0,75 |
| Tabaco, n | 11 | 8 | 0,62 |
| Cardiopatía isquémica, n | 2 | 5 | 0,21 |
| EPOC, n | 1 | 2 | 0,54 |
| ACVA/AIT, n | 2 | 3 | 0,63 |
| Grado IIA, n | 14 | 17 | 0,25 |
| Grado IIB, n | 6 | 3 | 0,25 |
| Edad (años) | 64,5 ± 9,33 | 61,2 ± 11,41 | 0,25 |
| DABMF (%) | 3,33 ± 4,11 | 5,19 ± 2,68 | 0,10 |
| cLDL (mg/dl) | 106,38 ± 18,89 | 114,75 ± 36,18 | 0,36 |
| PCRus (mg/l) | 4,78 ± 2,73 | 3,31 ± 2,51 | 0,11 |
| Endotelina (pg/ml) | 2,92 ± 1,78 | 2,70 ± 1,72 | 0,69 |
| ITB | 0,61 ± 0,14 | 0,65 ± 0,11 | 0,25 |

ACVA/AIT: accidente cerebrovascular agudo/accidente isquémico transitorio; cLDL: colesterol de las lipoproteínas de baja densidad; DABMF: dilatación de la arteria braquial mediada por flujo; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; IRC: insuficiencia renal crónica; ITB: índice tobillo-brazo; PCRus: proteína C reactiva ultrasensible.

estimó mediante la siguiente fórmula: colesterol total – cHDL – TG / 5 = cLDL (siendo TG / 5 el colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad [cVLDL]).

La concentración de endotelina se determinó a partir de muestras de sangre venosa, que se guardaron en hielo inmediatamente después de su extracción y se centrifugaron en el mismo día en todos los casos. Se congeló el plasma obtenido a –20 °C hasta el momento de la determinación, para la que ese utilizó un ELISA (Endothelin assay kit IBL) con dos anticuerpos de alta especificidad. El test tiene un límite inferior de detección de 0,36 pg/ml y un coeficiente de variación del 3,1% en 27,15 pg/ml y el 7,1% en 3,08 pg/ml.

Análisis estadístico

Se estimó el tamaño muestral requerido con base en estudios piloto realizados previamente^{12,13}, donde la distribución y la dispersión de los valores de los cambios porcentuales de la DABMF resultan superponibles, para obtener un poder estadístico mínimo del 80% para detectar un cambio de 0,1 mm y 2 puntos porcentuales de DABMF, con un valor de $\alpha = 0,05$.

Para el estudio de la distribución de normalidad de las variables utilizamos el test de Kolmogorov-Smirnov. Comparamos las medias de las variables paramétricas mediante el test de la t de Student para muestras independientes o apareadas, según el caso. En la comparación de medias de variables no paramétricas, aplicamos el test de la U de Mann-Whitney, y para la comparación de variables

dicotómicas usamos el de la χ^2 . Los cálculos se realizaron con el programa SPSS® versión 15.0, y se expresaron los datos como media ± desviación estándar, considerando la significación estadística para un valor de $p < 0,05$ en un análisis bilateral.

RESULTADOS

No hubo pérdidas de pacientes durante el estudio, y el cumplimiento terapéutico fue del 100%. El único efecto adverso que observamos fueron molestias gastrointestinales leves en 2 pacientes.

Comparamos las características de los dos grupos entre sí, y observamos que eran homogéneos en cuanto a los factores de riesgo cardiovascular, el grado de isquemia crónica y las variables de estudio en su determinación basal. Destacamos que son pacientes con enfermedad arterial periférica en fases iniciales en su mayoría (tabla 1).

Al analizar los resultados de comparar las variables en los pacientes del grupo experimental, encontramos que la DABMF aumentó significativamente 3 h después de la primera dosis de celecoxib (3,33% ± 4,11% frente a 6,97% ± 3,27%; $p = 0,008$), y este aumento se mantuvo a la semana de iniciar el tratamiento (3,33% ± 4,11% frente a 7,09% ± 4,4%; $p = 0,001$) (fig. 1).

También obtuvimos una disminución significativa de las cifras de PCRus a la semana en este grupo experimental (4,78 ± 2,73 frente a 2,95 ± 2,11; $p = 0,023$), así como una disminución de la endotelina (ET) plasmática (2,92 ± 1,78 frente a 1,93 ± 1,07; $p = 0,018$) y el cLDL (106,38 ± 18,89 frente a 90,8 ± 28,58; $p = 0,019$).

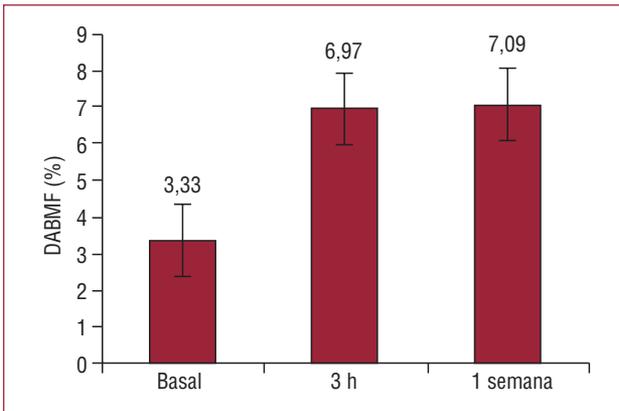


Fig. 1. Comparación entre la dilatación de la arteria braquial mediada por flujo (DABMF) basal, a las 3 h y a la semana en el grupo experimental. La diferencia fue significativa en ambas comparaciones ($p = 0,008$ y $p = 0,001$ entre basal y 3 h y entre basal y 1 semana respectivamente).

Sin embargo, al realizar estas comparaciones en el grupo control, no se obtuvieron diferencias significativas en estas variables entre la primera consulta y 1 semana después de la inclusión en el estudio (DABMF, $5,19 \pm 2,68$ frente a $3,81 \pm 3,25$; $p = 0,069$; PCRus, $3,31 \pm 2,51$ frente a $4,38 \pm 3,28$; $p = 0,14$; ET, $2,7 \pm 1,72$ frente a $2,73 \pm 1,93$; $p = 0,65$; cLDL, $114,75 \pm 36,18$ frente a $120,83 \pm 35,54$; $p = 0,26$) (figs. 2-5).

También realizamos comparaciones entre ambos grupos de las variaciones de las variables al final del estudio (variables DABMF post-pre, PCRus pre-post, ET pre-post y cLDL pre-post), y obtuvimos un aumento significativo de la DABMF en el grupo experimental respecto al grupo control ($3,76 \pm 4,25$ frente a $-1,40 \pm 2,96$; $p = 0,001$), una disminución de la PCRus en el grupo experimental ($1,83 \pm 2,42$ frente a $-1,07 \pm 2,89$; $p = 0,002$) y un descenso de la ET ($0,99 \pm 1,47$ frente a $-0,03 \pm 1,82$; $p = 0,010$) y cLDL ($15,58 \pm 23,73$ frente a $-6,1 \pm 35,86$; $p = 0,011$) en el grupo experimental respecto al control (figs. 6-9).

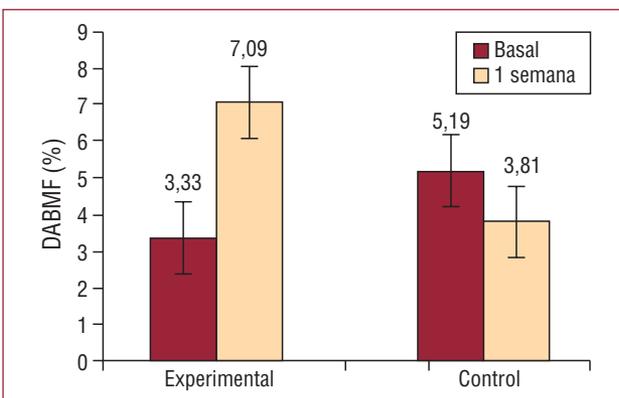


Fig. 2. Comparación entre dilatación de la arteria braquial mediada por flujo (DABMF) basal y a la semana en ambos grupos. En el grupo experimental la diferencia fue significativa ($p = 0,001$) y en el grupo control, no ($p = 0,069$).

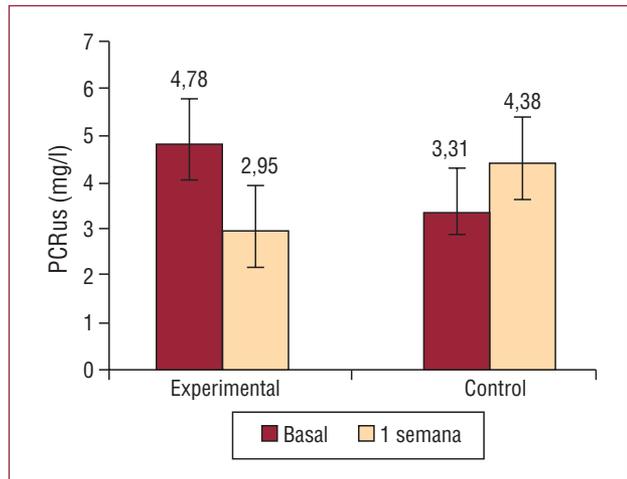


Fig. 3. Comparación entre proteína C reactiva ultrasensible (PCRus) basal y a la semana en ambos grupos. En el grupo experimental la diferencia fue significativa ($p = 0,023$) y en el grupo control, no ($p = 0,14$).

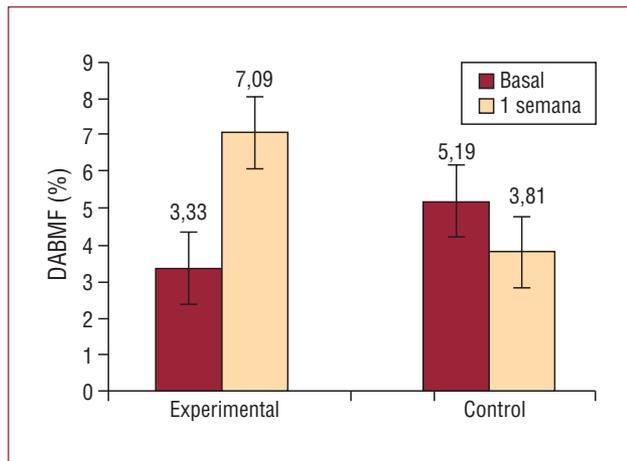


Fig. 4. Comparación entre endotelina (ET) basal y a la semana en ambos grupos. En el grupo experimental la diferencia fue significativa ($p = 0,018$) y en el grupo control, no ($p = 0,65$).

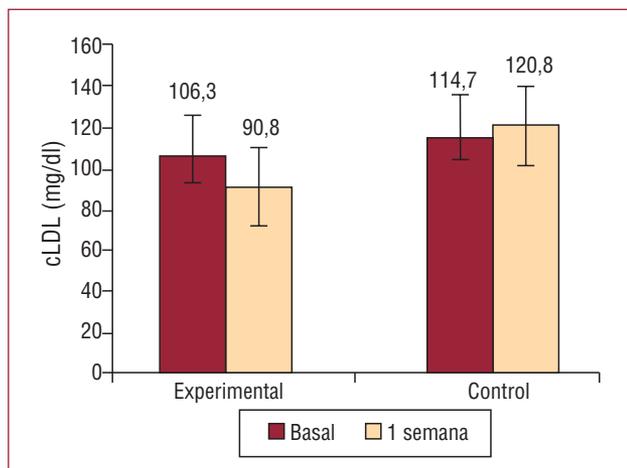


Fig. 5. Comparación entre el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (cLDL) basal y a la semana en ambos grupos. En el grupo experimental la diferencia fue significativa ($p = 0,019$) y en el grupo control, no ($p = 0,26$).

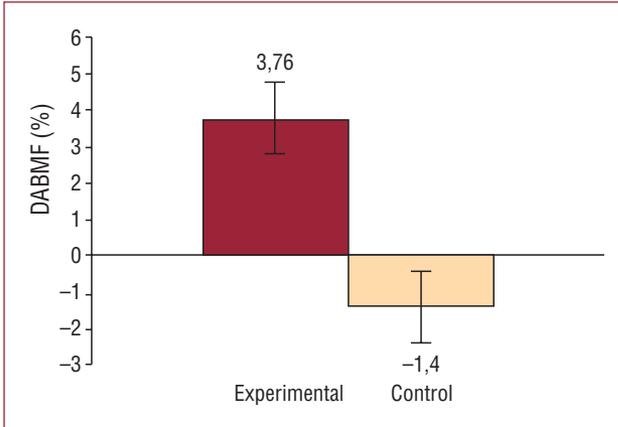


Fig. 6. Comparación del diferencial de dilatación de la arteria braquial mediada por flujo (DABMF post-pre) ($p = 0,001$).

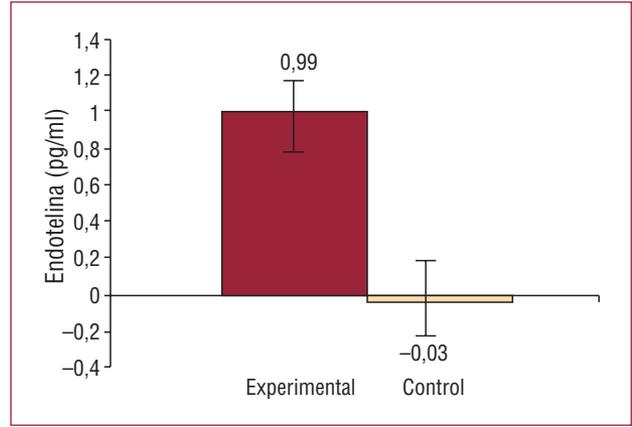


Fig. 8. Comparación del diferencial de endotelina pre-post ($p = 0,010$).

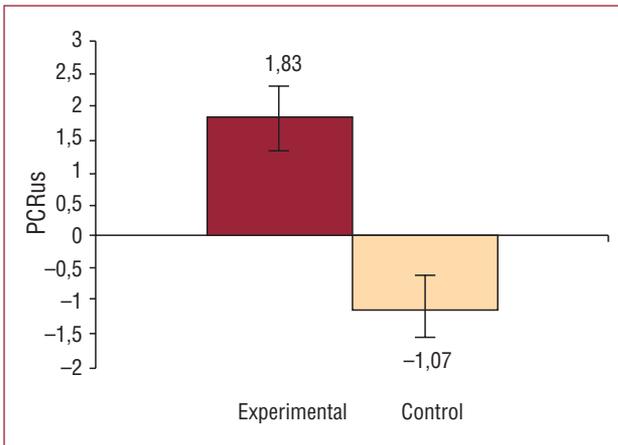


Fig. 7. Comparación del diferencial de PCRus pre-post ($p = 0,002$).

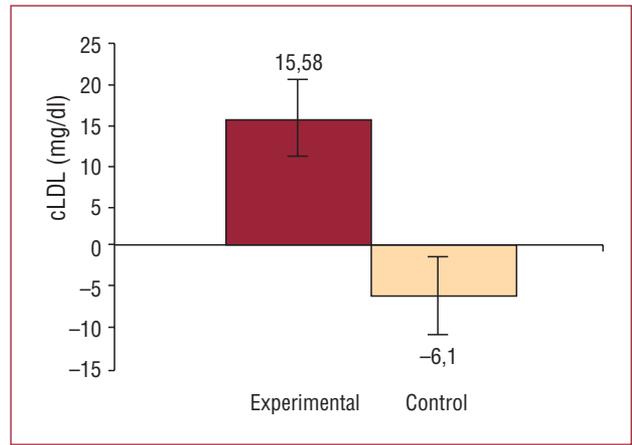


Fig. 9. Comparación del diferencial de cLDL pre-post ($p = 0,011$).

DISCUSIÓN

En estudios previos, se ha demostrado la implicación de la inflamación y la disfunción endotelial en la arteriosclerosis, y en concreto en la enfermedad arterial periférica¹⁶⁻¹⁹.

Con este estudio pretendemos valorar cómo influye la modulación de la inflamación en ella misma y en la función endotelial durante las etapas iniciales de la enfermedad arterial periférica. La COX-2 está implicada en estos procesos inflamatorios, y su inhibición selectiva nos permite calibrar el efecto de la modulación de la inflamación, ya que el celecoxib es un fármaco antiinflamatorio específico y sin actividad antiagregante.

Hasta donde conocemos, éste es el primer estudio que investiga el efecto de los inhibidores selectivos de la COX-2 en pacientes con enfermedad arterial periférica. Los resultados que obtenemos refuerzan los datos observados en pacientes hipertensos y con enfermedad coronaria, donde se implica a la inflamación y la disfunción endotelial en la patogenia de los procesos arterioscleróticos, abriendo una nueva

vía de estudio de posibilidades terapéuticas y de prevención.

En nuestros resultados, obtenemos una mejora de la dilatación dependiente de endotelio en los pacientes que tomaron celecoxib. Esto es congruente con los resultados de estudios realizados previamente en hipertensos, en los que se observa un aumento significativo de la DABMF a las 3 h y 1 semana de la primera dosis de celecoxib ($7,9\% \pm 4,5\%$; $9,9\% \pm 5,1\%$; $10,1\% \pm 6,1\%$; $p = 0,005$ y $p = 0,006$)¹², y pacientes con cardiopatía isquémica¹³, que no pueden explicarse por un efecto vasodilatador directo del fármaco²⁰. El incremento en la dilatación dependiente de endotelio puede explicarse porque las especies reactivas de oxígeno generadas por la COX-2 disminuyen la actividad biológica del óxido nítrico directamente y por su contribución a la peroxidación de lípidos^{21,22}. En un estudio realizado en pacientes coronarios, se demostró una mejora de la dilatación mediada por flujo tras el tratamiento con celecoxib durante 2 semanas comparado con placebo ($3,3\% \pm 0,4\%$ frente a $2\% \pm 0,5\%$; $p = 0,026$), pero no hubo cambios en

la dilatación tras la administración de glicerol trinitrato, que es independiente del endotelio ($9\% \pm 1,6\%$ frente a $9,5\% \pm 1,3\%$; $p = 0,75$)¹³.

También obtenemos una disminución en los valores de PCRus, que es un marcador bien conocido de inflamación crónica implicado en la aterogénesis^{16,19}. La disminución de la PCRus también puede contribuir a la mejora de la función endotelial, ya que también se ha demostrado que esta proteína reduce la biodisponibilidad del óxido nítrico, y esto y la respuesta inflamatoria sistémica por sí misma conllevan un deterioro de la función endotelial^{23,24}.

Distintas citocinas proinflamatorias (interleucina 1, factor de necrosis tumoral alfa, LPS) y factores de crecimiento (PDGF, EGF, FGF) inducen la expresión de COX-2 en monocitos²⁵, promoviendo su paso a macrófagos activados. La COX-2 se expresa ampliamente en monocitos, macrófagos, células musculares lisas y células endoteliales de arterias arterioscleróticas, pero no en arterias sanas⁶; por ello su inhibición selectiva nos permite estudiar los efectos en los tejidos afectados por la enfermedad. Los macrófagos que expresan COX-2 producen distintas citocinas, unas con efectos beneficiosos como la PGI₂ (prostaciclina) y otras proinflamatorias²⁶. En cuanto a la PGI₂, se sabe que al inhibir la COX-2 aumenta la actividad de la COX-1 que, aunque produce prostaciclina en menor cantidad, aseguraría cantidades probablemente suficientes para proteger el sistema cardiovascular^{27,28}. Al contrario que la PGI₂, la PGE₂ induce la producción de otras citocinas proinflamatorias como la interleucina 6, y estimula la liberación y activación de metaloproteinasas, que tienen un papel importante en la migración de los macrófagos. La quimiotaxis de los monocitos estimulada por LDL también es dependiente de la COX²⁹.

Otras acciones proaterogénicas mediadas por la producción de prostaglandinas por la COX-2 son el aumento de la permeabilidad vascular, la activación de la quimiotaxis, la migración de células musculares lisas y la síntesis de matriz extracelular, entre otras²⁶.

Los macrófagos activados también inducen un aumento en la producción de colesterol y un estado de inestabilidad de la placa y de disfunción endotelial.

Todas estas acciones respaldan la hipótesis de que la inhibición de la COX-2 conlleva una disminución de la aterogénesis, sobre todo en fases iniciales de la enfermedad, ya que el aumento de las LDL oxidadas produce una disminución en la expresión de COX-2, y en células espumosas maduras ya no se expresa esta enzima^{26,30}.

La ET es una proteína producida por las células endoteliales³¹ en respuesta a distintos estímulos

como la hipoxia, el cLDL y distintos factores procoagulantes. Se han encontrado valores de endotelina aumentados en pacientes con enfermedad coronaria y enfermedad arterial periférica, sobre todo en estadios precoces³²⁻³⁴. En este estudio encontramos una disminución de la ET en pacientes con claudicación intermitente, en su mayoría en etapas iniciales (grados IIA), tras la inhibición de la COX-2 con celecoxib. Esto podría deberse a la disminución del cLDL y del estado inflamatorio sistémico, y a su vez nos ayuda a explicar la mejora en la dilatación dependiente de endotelio, ya que la ET es un marcador conocido de disfunción endotelial.

No obstante, de momento no hay evidencia clínica de que el tratamiento en las fases precoces de la enfermedad, dirigido a disminuir la inflamación y la disfunción endotelial, mejore realmente el pronóstico de estos pacientes. Se requiere de grandes estudios prospectivos que arrojen luz a este respecto.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio confirman la implicación de la inflamación y la disfunción endotelial en la patogenia de la arteriosclerosis y su mejora con un fármaco antiinflamatorio en pacientes con enfermedad arterial periférica. Esto nos hace pensar en una línea de estudio de fármacos moduladores de la inflamación como un arma más que tener en cuenta en el tratamiento etiológico en fases iniciales de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;110 Suppl 3:27-32.
2. Smith WL, Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochem Biophys Acta*. 1991;1083:1-17.
3. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 1998;12:1063-73.
4. Hla T, Nielson K. Human cyclo-oxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:7384-8.
5. Raz A, Wyche A, Siegel N, Needleman P. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *J Biol Chem*. 1988;263:3022-8.
6. Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1999;155:1281-91.
7. Bombardier C, Laine L, Reicin A. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2000;343:1520-8.
8. Farooq M, Haq I, Qureshi AS. Cardiovascular risks of COX inhibition: current perspectives. *Expert Opin Pharmacother*. 2008;9:1311-9.
9. White WB, West CR, Borer JS, Gorelick PB, Lavange L, Pan SX, et al. Risk of cardiovascular events in patients receiving celecoxib: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Am J Cardiol*. 2007;99:91-8.

10. Martínez-González J, Badimon L. Mechanisms underlying the cardiovascular effects of COX-2 inhibition: benefits and risks. *Curr Pharm Des.* 2007;13:2215-27.
11. Krul ES, Napawan N, Butteiger DT, Hayes K, Krause L, Freidrich GE, et al. Atherosclerosis is reduced in cholesterol-fed Apo E (-/-) mice administered an ASBT inhibitor or a selective COX-2 inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:409-12.
12. Widlansky ME, Price DT, Gokce N, Eberhardt RT, Duffy SJ, Holbrook M, et al. Short and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Hypertension.* 2003;42:310-5.
13. Chenevard R, Hürlimann D, Bécher M, Enseleit F, Spieker L, Hermann M, et al. Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation.* 2003;107:405-9.
14. Medina FJ, De Haro J, March JR, Martínez E, López-Quintana A, Acín F. Relationship between noninvasively measured endothelial function and peripheral arterial disease. *Angiology.* 2008 Dec 2 [Epub ahead of print].
15. Eda S, Kaufmann J, Roos W, Pohl S. Development of a new microparticle-enhanced turbidimetric assay for C-reactive protein with superior features in analytical sensitivity and dynamic range. *J Clin Lab Anal.* 1998;12:137-44.
16. Ridker PM. Role of inflammatory biomarkers in prediction of coronary heart disease. *Lancet.* 2001;358:946-8.
17. Healy B. Endothelial cell dysfunction: an emerging endocrinopathy linked to the coronary disease. *J Am Coll Cardiol.* 1990;16:357-8.
18. Medina F, De Haro J, Martínez E, Flórez A, March JR, Acín F. Relación de la dilatación de la arteria braquial mediada por flujo y el índice tobillo-brazo en pacientes con enfermedad arterial periférica. *Angiología.* 2007;59:55-61.
19. De Haro J, Medina F, Martínez E, Flórez A, Varela C, Acín F. Relación del tamaño del aneurisma de aorta abdominal asintomático con los niveles plasmáticos de Proteína C Reactiva. *Angiología.* 2007;59:111-20.
20. Sülevman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep.* 2007;59:247-58.
21. Sherman DL, Keaney JF, Blegelsen ES, Duffy SJ, Coffman JC, Vita JA. Pharmacological concentrations of ascorbic acid are required for the beneficial effects of endothelial vasomotor function in hypertension. *Hypertension.* 2000;35:936-41.
22. Keaney JF, Vita JA. Atherosclerosis, oxidative stress and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995;38:129-54.
23. Verma S, Wang CH, Li SH. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation.* 2002;106:913-9.
24. Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK. Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. *Circulation.* 2000;102:994-9.
25. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol.* 1997;24 Suppl 49:15-9.
26. Linton MR, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:497-504.
27. Wang H, Ma WG, Tejada L, Zhang H, Morrow JD, Das SK, et al. Rescue of female infertility from the loss of cyclooxygenase-2 by compensatory up-regulation of cyclooxygenase-1 is a function of genetic make-up. *J Biol Chem.* 2004;279:10649-58.
28. Griffoni C, Spisni E, Strillacci A, Toni M, Bachschmid MM, Tomasi V. Selective inhibition of prostacyclin synthase activity by rofecoxib. *J Cell Mol Med.* 2007;11:327-38.
29. Kreuzer J, Denger S, Jahn L. LDL stimulates chemotaxis of human monocytes through a cyclooxygenase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1481-7.
30. Páramo JA, Rodríguez JA, Beloqui O, Orbe J. Monocyte cyclooxygenase-2 activity: a new therapeutic target for atherosclerosis? *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2005;5:303-11.
31. Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens.* 1998;16:1081-98.
32. Winkles JA, Alberts GF, Brogi E, Libby P. Endothelin-1 and endothelin receptor mRNA expression in normal and atherosclerotic human arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;191:1081-8.
33. Flórez A, De Haro J, Varela C, Acín F. En el origen de la enfermedad arterial periférica: papel de la endotelina en la disfunción endotelial. *Angiología.* 2008;60:395-401.
34. Lerman A, Holmes D, Bell M. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation.* 1995;92:2426-31.