



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**GRADO EN MEDICINA**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LA  
DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

**Autor:** Dña. Ziortza Eguileor Marin

**Director/es:** D. Carlos Manuel Martínez Campa

**Santander, Junio 2016**

Abreviaturas .....	1-2
Introducción	
1. Resumen .....	3
2. Abstract .....	3
3. Objetivos y metodología.....	4
Endotelio como órgano activo: funciones del endotelio .....	4-5
¿Qué es la disfunción endotelial?.....	5
1. Mecanismos que predisponen a la disfunción endotelial	
1.1. Estrés oxidativo .....	6
1.2. Inflamación crónica .....	6-7
1.3. Infección .....	7
1.4. Déficit de vitamina D .....	8
1.5. Tensión tangencial.....	8-9
1.6. Factores de riesgo cardiovascular	
1.6.1. Diabetes mellitus .....	9
1.6.2. Dislipemia .....	10
1.6.3. Hipertensión .....	11
1.6.4. Tabaco .....	11
1.6.5. Edad .....	11-12
¿Qué ocurre en la disfunción endotelial? .....	12
1. Modificación de la permeabilidad vascular .....	12-13
2. Inflamación .....	13
3. Desregulación del tono vascular .....	13
4. Estado protrombótico .....	13-14
5. Supervivencia/muerte celular .....	14
6. Pérdida de integridad del endotelio y lesión vascular .....	14
7. Endotelio y expresión génica .....	15
El papel del óxido nítrico y su importancia como marcador de salud vascular .....	15-16
1. Síntesis de NO .....	16-18
1.1. Regulación de la producción y liberación de NO .....	18-19
1.2. Inactivación del NO .....	19-20
1.3. El NO en la disfunción endotelial .....	20

i.	Disminución de la síntesis de NO	
a.	Alteraciones del metabolismo del sustrato de la NOS	20-22
▪	El transporte de L-Arginina	22-23
b.	Alteraciones en la expresión y/o estructura de la NOSe	23-24
c.	Alteraciones en las vías de señales que regulan la actividad de la NOSe	25-28
d.	Disponibilidad de cofactores requeridos por la NOSe	28
ii.	Aumento de la inactivación de NO	28-30
	Valoración de la función endotelial	30-31
1.	Evaluación invasiva de la función endotelial	31
2.	Evaluación no invasiva de la función endotelial	31-32
2.1.	Vasodilatación mediada por flujo de la arteria humeral	32
2.2.	Velocidad de onda de pulso	32-34
2.3.	Pletismografía digital	34-35
2.4.	Marcadores circulantes de función endotelial	35
2.4.1.	ADMA	35
2.4.2.	Disminución de la biodisponibilidad de NO	35
2.4.3.	Células endoteliales y micropatías circulantes	35-36
2.4.4.	Progenitores de células endoteliales	36-37
2.4.5.	Endocan: un innovador proteoglicano circulante	37-39
2.5.	Espectroscopia Raman como técnica innovadora para la detección de disfunción endotelial	39-41
	Terapias anti-disfunción endotelial	41-42
1.	Terapia endotelial primaria: Modificación de los factores de riesgo cardiovascular	42
1.1.	Ejercicio físico	42-43
1.2.	Reducción del peso corporal	43
1.3.	Cese del hábito tabáquico	43
1.4.	Control de la dieta	43-44
2.	Terapia endotelial secundaria: Control de la progresión de la enfermedad cardiovascular	44
2.1.	Estatinas	44-45
2.2.	Inhibidores del sistema renina-angiotensina	45-46
2.3.	Antagonistas del receptor $\beta$ -adrenérgico	46
2.4.	Antagonistas de la endotelina-1	46-47
2.5.	Estrógenos	47
2.6.	Antagonistas de los canales de calcio	47
2.7.	Fármacos antidiabéticos	47-49
2.8.	Eritropoyetina	49

Conclusión .....	49
Agradecimientos .....	50
Bibliografía .....	51-53

ADMA: dimetilarginina asimétrica	GRK: quinasa del receptor acoplado a proteína G
All: angiotensina II	GTPCH-I: enzima GTP ciclohidroxilasa
ARA-II: antagonistas del receptor de la angiotensina II	IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
BB: Betabloqueantes	IL-1: interleuquina-1
bFGF: factor de crecimiento derivado de los fibroblastos	Km: constante de afinidad
CAM: moléculas de adhesión	L-Arg: L-arginina
CAT: transportador de aminoácidos catiónicos	LDL: lipoproteínas de baja densidad
CD34: cúmulo de diferenciación 34	L-NAME: NG-Nitroarginina Metil Éster
CFR: reserva de flujo coronario	L-NMMA: NG-monometil-L-arginina
CML: células musculares lisas	LOX: lisil-oxidasa-endotelial
DDAH-2: dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2	MCP-1: factores quimiotácticos
DE: disfunción endotelial	MFA: microscopio de fuerza atómica
DHP: dihidropiridínicos	NO: óxido nítrico
EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio	NOS: óxido nítrico sintasa
EDRF: factor relajador derivado del endotelio	NOS <sub>e</sub> : óxido nítrico sintasa endotelial
EPC: progenitores de células endoteliales	NOS <sub>i</sub> : óxido nítrico sintasa inducible
EPO: eritropoyetina	NOS <sub>n</sub> : óxido nítrico sintasa neuronal
ET-1: endotelina-1	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> : anión superóxido
ET-A, ET-B: endotelina-A, endotelina-B	ONOO <sup>-</sup> : peroxinitrito
GPCR: receptores acoplados a proteínas G	PAF: factor activador plaquetario
	PCR: proteína C reactiva
	PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas
	PGA: productos de glicación avanzada

PGs: proteoglicanos

RM: resonancia magnética

ROS: especies reactivas de oxígeno

SNO-albúmina: S-nitrosoalbúmina

SNO-Hb: S-nitrosohemoglobina

SOD: superóxido dismutasa

SREBP: proteínas de unión a elementos de regulación por esteroides

TFPI: inhibidor del factor tisular

TNF-alfa: factor de necrosis tumoral alfa

tPA: activador tisular del plasminógeno

VMF: vasodilatación mediada por flujo

VOP: velocidad de onda de pulso

### **Resumen**

Durante muchos años se pensó que el endotelio era una simple capa de células que recubría la pared luminal de los vasos sanguíneos y conformaba la pared de los capilares. Sin embargo, numerosos estudios demostraron que el papel del endotelio era mucho más complejo. Debemos considerarlo como un órgano metabólicamente activo, jugando un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular mediante el control del balance entre vasodilatación y vasoconstricción. En el presente trabajo voy a hablar de la importancia del óxido nítrico en este mantenimiento correcto de la homeostasis, de los factores que alteran las funciones del endotelio provocando lo que se conoce como disfunción endotelial que predispone a la inflamación, vasoconstricción e incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar el desarrollo de arterioesclerosis, agregación plaquetaria y trombosis. Esta disfunción del endotelio puede valorarse mediante distintas técnicas. Con los avances en las técnicas de imagen, están tomando importancia aquellas técnicas que permiten estudios no invasivos, sobre todo en aquella población sana o de bajo riesgo. El último punto que voy a tratar va a ser el tratamiento de la disfunción endotelial. El primer paso y más importante es el control de los factores de riesgo cardiovascular mediante cambios en el estilo de vida (ejercicio físico, control del peso y de la dieta, dejar de fumar) que, en ocasiones, debe combinarse con tratamiento farmacológico para mejorar esos factores de riesgo o para mejorar la enfermedad cardiovascular ya establecida.

### **Abstract**

For many years after its discovery, endothelium was believed to be an inert layer of cells covering the vascular lumen with the only function of being a structural part of the capillary wall. However, extensive research has since revealed a far more complex role for endothelial cells. We must consider the endothelium as a metabolically active organ that plays a major role in the maintenance of the vascular homeostasis by controlling the balance between vasodilation and vasoconstriction. In this review I will talk about the importance of the nitric oxide in the vascular homeostasis, the factors that alter the functions of the endothelium causing a disorder known as “endothelial dysfunction” that provokes inflammation, vasoconstriction and an increase of vascular permeability, that can lead to development of atherosclerosis, platelet aggregation and thrombosis. This dysfunction of the endothelium can be assessed by different techniques. The advances in diagnostic imaging have provide new non-invasive techniques useful, specially, in both healthy and low risk population. The last point I am going to talk about in this memory is the treatment of endothelial dysfunction. The first step and the most important one is the control of the cardiovascular risk factors by making lifestyle changes (physical exercising, weight and diet control, quitting

smoking) that, sometimes, need to be combined with pharmacological treatments to manage the cardiovascular risk factors or the cardiovascular disease already established.

## **Objetivos y metodología**

El presente trabajo es una revisión exhaustiva de lo que se sabe hasta ahora y los avances que se han producido en el estudio de la disfunción endotelial. Para ello he empleado datos obtenidos de distintas publicaciones, bases de datos y trabajos realizados en los últimos años.

---

### **1. Endotelio como órgano activo: funciones del endotelio.**

El endotelio vascular es un órgano estructuralmente simple pero muy complejo desde el punto de vista funcional. Estructuralmente consiste en una monocapa de células epiteliales planas que recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y el corazón y conforma la pared de los capilares. El endotelio vascular consta de aproximadamente  $10^{10}$  células endoteliales, las cuales representan más de 1,5 kg del total del peso del cuerpo y ocupan una superficie de unos 600 m<sup>2</sup>. A nivel funcional, durante muchos años el endotelio fue considerado como una simple barrera mecánica que separa la sangre y los tejidos. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado el complejo papel que juega este órgano. Ahora sabemos que el endotelio, además de su papel como barrera altamente selectiva, también es un órgano fisiológicamente activo que desempeña varias funciones reguladoras; una de las más importantes es su papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis vascular mediante el correcto balance entre vasodilatación y vasoconstricción. Las células endoteliales detectan cambios en las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre la pared vascular, así como señales químicas transportadas por la sangre, y responde a ellas liberando sustancias vasoactivas, las cuales, a través de efectos autocrinos o paracrinos, son las que determinan la participación del endotelio en la homeostasis vascular (1,2,3).

Las células endoteliales desempeñan varias funciones:

1. Forman una superficie lisa que facilita el flujo laminar de la sangre y previene la adherencia de las células sanguíneas
2. Forman una barrera de permeabilidad para el intercambio de nutrientes entre el plasma y el intersticio celular, regulando al mismo tiempo el transporte de sustancias entre ambos.
3. Regulan la angiogénesis y el remodelado vascular.
4. Contribuyen a la formación y mantenimiento de la matriz extracelular.
5. Producen factores de crecimiento en respuesta al daño vascular, influyendo especialmente en la proliferación del músculo liso vascular.
6. Producen sustancias que regulan la agregación plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis.
7. Sintetizan y degradan diversas hormonas.

8. Participan en la respuesta inmune generando citoquinas que modulan la actividad de los linfocitos.
9. Participan en la formación del líquido cefalorraquídeo.
10. Liberan agentes que actúan de forma paracrina sobre las células musculares lisas (CML) adyacentes, regulando su contracción. El endotelio vascular produce y libera sustancias vasodilatadoras: el óxido nítrico (NO) (antiguamente conocido como factor relajador derivado del endotelio o EDRF), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y la prostaciclina, y vasoconstrictoras, entre las que destacan: el anión superóxido, las endotelinas y el tromboxano A2.

## 2. ¿Qué es la disfunción endotelial?

La disfunción endotelial (DE) representa la pérdida de la capacidad del endotelio para regular la homeostasis del lecho vascular. Actualmente, se considera como una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular y la arterioesclerosis. La exposición crónica a diversos factores de riesgo cardiovascular y estrés oxidativo pueden alterar los mecanismos de defensa del endotelio provocando este síndrome vascular, que puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el aumento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar el desarrollo de arterioesclerosis, agregación plaquetaria y trombosis. En la disfunción endotelial se produce una disminución o eliminación de los efectos vasoprotectores, así, hay una menor vasodilatación, lo cual se debe principalmente a la reducción en la producción del NO y del EDHF, y a un incremento del estrés oxidativo. En estas condiciones se inicia la respuesta inflamatoria, desencadenada fundamentalmente por un aumento en la expresión de moléculas de adhesión, del inhibidor del tPA (activador tisular del plasminógeno) y la producción de quimiocinas lo cual lleva en definitiva a un estado protrombótico. La disfunción endotelial está relacionada asimismo con elevados niveles de dimetilarginina asimétrica y péptidos vasoconstrictores como la angiotensina-II (AII) y la endotelina-1 (ET-1); por último, la hiperhomocisteinemia, la hiperglucemia y la hipercolesterolemia también contribuyen a la disfunción endotelial. Hay una evidencia alta de que la disfunción endotelial es uno de los principales cambios que se producen entre la exposición a los factores de riesgo cardiovascular y el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica, de tal manera que la DE se observa en los estadios iniciales de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares.

La detección precoz de la DE es muy importante para prevenir la arterioesclerosis y la enfermedad cardiovascular, ya que dicha disfunción puede ser un paso inicial reversible en el proceso que conduce a estos procesos. La DE constituye un episodio temprano de la arterioesclerosis que precede a la formación de la placa de ateroma, por tanto, la búsqueda de nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de la arterioesclerosis y sus síndromes asociados se considera actualmente como de alta prioridad debido al impacto en la morbimortalidad y en la salud pública de estas enfermedades (1,3).

En el siguiente apartado del presente trabajo se tratan en detalle algunos de los factores de riesgo más frecuentes relacionados con la predisposición a la disfunción endotelial:

## **2.1. Mecanismos que predisponen a la disfunción endotelial**

### **2.1.1. Estrés oxidativo**

Las células endoteliales sanas, al metabolizar el oxígeno, generan especies reactivas de oxígeno (ROS) potencialmente nocivas. En condiciones normales, la formación de estos radicales está equilibrada con su eliminación. Sin embargo, en la disfunción endotelial se produce un desequilibrio entre los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno generados en los procesos metabólicos de las células endoteliales dañadas, y la capacidad de los sistemas antioxidantes. Cada enfermedad considerada como factor de riesgo que afecta al endotelio (diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia) genera un aumento de en la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno e incrementan las ROS en la pared de los vasos.

El aumento de ROS promueve la activación de la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, induce la expresión de endotelina y disminuye la biodisponibilidad de NO ya que las ROS destruyen el NO formando peroxinitritos, los cuales son citotóxicos y afectan la función de proteínas del endotelio y por tanto la función del mismo; además, los peroxinitritos median la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo que tiene dos efectos no deseados: contribuyen a la formación de la placa de ateroma y degradan el cofactor BH<sub>4</sub> de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe) produciendo el desacoplamiento de la misma. El desacoplamiento de la enzima consiste en una alteración de la función de NOSe por déficit del sustrato para la formación de NO (L-arginina) o del cofactor BH<sub>4</sub> convirtiéndola en una fuente de estrés oxidativo, de tal manera que transfiere los electrones al O<sub>2</sub> produciendo anión superóxido. En el endotelio sano, la NOSe es responsable de una gran parte de la producción vascular de NO. Sin embargo, en estado de desacoplamiento, se convierte en un potencial generador de ROS.

La NADPH oxidasa es un enzima formado por varias subunidades y es la principal fuente de ROS en los vasos humanos; se encuentra sobreactivada, y por tanto tiene un papel esencial, en la hipertensión; en concreto, las subunidades citosólicas de la NADPH-oxidasa se fosforilan, incrementando su actividad, en respuesta a la acción de AII. Por otra parte, la alteración de los mecanismos de defensa antioxidantes también favorece el estrés oxidativo; la superóxido dismutasa (SOD), encargada de convertir el radical superóxido en peróxido de hidrógeno (que posteriormente es degradado a agua por la catalasa o la glutatión peroxidasa), muestra una menor actividad asociada a la disfunción endotelial. Los niveles elevados de la AII también tienen un efecto sobre la expresión de la SOD. El NO además, reacciona con el radical superóxido, lo que significa que ante una disminución en la eliminación del mismo, disminuye la biodisponibilidad del NO (1,3).

### **2.1.2. Inflamación crónica**

La inflamación se puede definir como la respuesta no específica del huésped a una gran variedad de lesiones tisulares, encaminada a eliminar el agente causante de la

misma, eliminar el tejido muerto y reemplazarlo por tejido normal; se caracteriza por el movimiento de células y fluido desde la sangre hacia los tejidos extravasculares en respuesta a factores quimiotácticos (citocinas) producidas localmente por el tejido dañado. La inflamación crónica es otro de los mecanismos que subyacen a la disfunción endotelial. En condiciones fisiológicas, el endotelio actúa oponiéndose a la misma principalmente a través de la liberación de NO. Sin embargo, cuando el endotelio se ve afectado se generan ROS agravando así la inflamación vascular lo cual resulta perjudicial para el sistema vascular.

Hay numerosos marcadores que se asocian con la DE y la aterosclerosis. Uno de los más importantes es la proteína C reactiva (PCR), una proteína relacionada con la fase aguda del proceso inflamatorio. Numerosos estudios han demostrado que la PCR interviene de forma directa en las fases iniciales de la aterosclerosis depositándose en la íntima, lo cual precede a la aparición de los monocitos. Además, la PCR también afecta de forma directa a la biodisponibilidad de NO, causando estrés oxidativo, disfunción endotelial e hiperplasia de la íntima.

La inflamación se asocia también con la sobreexpresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y la interleuquina-1 (IL-1), que promueven la adherencia y migración leucocitaria. Además, estas citocinas inflamatorias inducen la expresión por parte de las células endoteliales y de los leucocitos de moléculas de adhesión como VCAM, ICAM, E-selectina y P-selectina; citocinas como IL-6; factores de crecimiento como el derivado de las plaquetas (PDGF) y el fibroblástico (bFGF) y factores quimiotácticos como la proteína 1 quimiotáctica. Además, se produce la exposición de proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión (CAM) para receptores específicos ubicados en la membrana de leucocitos circulantes. Todos los factores anteriormente descritos resultan en un empeoramiento de la disfunción endotelial (1,3).

### **2.1.3 Infección**

La disfunción endotelial y la aterosclerosis también se ven afectadas por las infecciones y el daño mediado por la respuesta inmune. Durante la sepsis, la célula endotelial se transforma desde un fenotipo quiescente (anticoagulante, promotora de la vasodilatación, antiadhesiva) a un fenotipo activado (promotora de la coagulación y de la vasoconstricción, proadhesiva). Las células endoteliales cooperan con los monocitos en la activación de las cascadas de inflamación y coagulación que persiguen como último fin la eliminación del agente patógeno. Estudios epidemiológicos establecen que distintos agentes infecciosos pueden predisponer al desarrollo de aterosclerosis. Virus como el citomegalovirus y el herpes simple tipo 1, y bacterias como *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori*, se han asociado con enfermedad coronaria. Se ha visto que el título de IgG frente a citomegalovirus, los virus de la hepatitis A (VHA), y del herpes simple (VHS-1), *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori*, es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de disfunción endotelial y enfermedad coronaria. Por ello, es probable que durante la infección con estos agentes patógenos, haya vías inmunológicas compartidas por las cuales diversos organismos producen daño endotelial y aterosclerosis (1).

#### 2.1.4. Déficit de vitamina D

Se ha postulado que la vitamina D participa de forma indirecta en la aterosclerosis y la inflamación sistémica, ya que sus receptores se encuentran en todas las células implicadas en la aterosclerosis, incluidas las células endoteliales. El déficit de la vitamina D parece relacionarse con un aumento en los valores de la presión arterial. Los principales factores fisiopatológicos implicados en los pacientes con hipertensión arterial y déficit de ésta vitamina parecen ser un incremento en la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, alteraciones en la regulación del calcio, aumento del estrés oxidativo y la disminución de la producción y liberación de prostaglandinas. Estudios realizados en células endoteliales de la vena umbilical han demostrado que la vitamina D estimula la producción de NO mediante la activación de la NOSe. Más recientemente, se han llevado a cabo experimentos *in vivo* e *in vitro* en los que se ha visto que análogos de la vitamina D (22-oxacalcitriol) son capaces de inhibir el aumento de la expresión de NADPH oxidasa y estimular el acoplamiento de la NOSe, lo cual reduce el estrés oxidativo en el endotelio. Además, la vitamina D protege las células endoteliales frente al estrés oxidativo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contrarrestando la generación de superóxido y la apoptosis. Por todo ello, el uso de suplementos para reducir el riesgo o la progresión de la hipertensión arterial puede ser una alternativa en los pacientes con bajos niveles de esta vitamina. El déficit de la misma se ha relacionado con el fallo de la terapéutica antihipertensiva y debe continuar evaluándose la efectividad del tratamiento hipotensor en pacientes con bajos niveles de este compuesto (1).

#### 2.1.5. Tensión tangencial

La tensión tangencial, más comúnmente conocida como “shear stress”, es la tensión oscilante que ejerce la columna de sangre en cada latido cardíaco sobre la superficie endotelial en dirección tangencial originando un desplazamiento de esta capa sobre el resto de la pared vascular lo que genera una deformación de la superficie de la pared que dependerá tanto de la magnitud de la tensión aplicada como del estado de salud del vaso. Así, las regiones vasculares de flujo laminar uniforme parecen estar relativamente protegidas del desarrollo de lesiones. La tensión tangencial ejercida sobre la pared del vaso es el estímulo físico más importante para la liberación de NO, determinando una vasodilatación cuya magnitud es directamente proporcional a la cantidad de NO liberado por el endotelio.

Aunque todo el árbol vascular se ve expuesto a los factores de riesgo que predisponen a la DE, por lo general, las lesiones ateroscleróticas suelen aparecer en arterias específicas (coronarias, aorta e ilíacas). La tensión tangencial ejercida por la sangre sobre la superficie del endotelio va a modular este proceso aterogénico pero de manera diferente en función de si se trata de una tensión tangencial baja (predispone a la aterosclerosis) o alta (efecto protector) (1).

Tensiones tangenciales bajas (< 6 dinas/cm<sup>2</sup>) aumentan la producción y liberación de ET-1 y suprimen el NO, la producción de prostaciclina y la retirada y el catabolismo lipídico, a la vez que inducen la inflamación y oxidación de la placa en las células endoteliales. Por lo tanto, estas tensiones se relacionan con la progresión y vulnerabilidad de la placa de ateroma. Generan placas con cubiertas delgadas y

frágiles, remodelado positivo y habitualmente responsables de los síndromes coronarios agudos.

Por el contrario, tensiones altas (6-70 dinas/cm<sup>2</sup>) protegen frente a la aterogénesis mediante la activación de la NOSe. Por ello, el aumento del flujo de sangre y la velocidad de corte son considerados los mecanismos principales del efecto beneficioso sobre el sistema cardiovascular durante el ejercicio. Sin embargo, si esa tensión de corte es muy alta (>70 dinas/cm<sup>2</sup>) puede resultar perjudicial porque aumenta la vulnerabilidad de la placa. Puede provocar daño endotelial, apoptosis de las células y hasta facilitar la remoción del endotelio con la consiguiente exposición de la íntima arterial, lo cual promueve el agregado plaquetario y la trombosis. Esto genera placas con mayor grado de fibroproliferación, remodelado negativo y síndrome clínico de angina inestable.

Los mecanismos de respuesta a la regulación por el flujo sanguíneo de la función endotelial parecen deberse, al menos en parte, a la presencia en el promotor de algunos genes de un elemento de respuesta al flujo (SSRE), además de la activación de múltiples factores de transcripción que responden al flujo, como Egr1, c-jun, c-fos y NF-κβ (4).

## **2.1.6. Factores de riesgo cardiovascular**

### **2.1.6.1. Diabetes mellitus**

La diabetes, tanto la tipo 1 como la tipo 2, es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. La inflamación subclínica parece ser la causa de disfunción endotelial en la resistencia a la insulina (la causa más frecuente de la diabetes, cerca de un 80% de los pacientes de tipo 2 la presentan). La DE que observamos en la diabetes se debe principalmente a dos mecanismos:

- 1- Estrés oxidativo que aumenta la expresión de la NADPH oxidasa y por tanto la formación de anión superóxido. La reducción de NADPH favorece el estrés oxidativo, incrementa la tasa de glicosilación y activa la proteína quinasa C.
- 2- Desacoplamiento de la NOSe que genera una disminución de la biodisponibilidad de NO; se produce un aumento de la producción de ET-1, predominando por lo tanto el efecto vasoconstrictor. La insulina estimula la formación de NO, mientras que una glucemia elevada inhibe la formación de esta molécula.
- 3- Aumento de la formación de productos de glicación avanzada (PGA). La glicación consiste en la modificación postraducciona permanente de los grupos amino de las proteínas por la acción de azúcares reductores. La hiperglucemia facilita la formación de estos productos de glicación no enzimática de proteínas y lípidos, los cuales se acumulan en la pared de los vasos alterando la estructura del endotelio y la membrana basal e impidiendo la acción del NO. Además, los PGA se unen a receptores de superficie específicos que se expresan en monocitos, macrófagos y CML, lo que desemboca en un aumento de la respuesta inflamatoria, la permeabilidad vascular y el estrés oxidativo (1,3).

### 2.1.6.2. Dislipemia

La hiperlipidemia, al igual que otros factores de riesgo cardiovascular, también altera el papel homeostático que desempeña el endotelio en la regulación de la función vascular. Los posibles mecanismos que generan DE inducida por hiperlipidemia son:

1. Aumento de NADPH oxidasa, aumento de la producción de anión superóxido y estrés oxidativo.
2. Aumento de los niveles en plasma de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor competitivo endógeno de NOSe enzima que convierte el aminoácido L-arginina (L-Arg) en L-citrulina y NO; la ADMA compite con la L-Arg por su unión a NOSe. Esto genera un desacoplamiento de la NOSe con aumento en la producción de anión superóxido y disminución de NO. Los valores de ADMA se encuentran aumentados en pacientes con hipercolesterolemia por acción tanto de la LDL como de la LDL oxidada, correlacionándose inversamente estos niveles altos con la vasodilatación dependiente del endotelio; su efecto puede ser superado mediante la adición de L-Arg.
3. El exceso de anión superóxido genera LDL oxidada, la cual promueve la formación de ET-1, la expresión de moléculas de adhesión y factores quimiotácticos, así como la migración y proliferación de CML. Esa LDL oxidada que se ha formado es fagocitada por los macrófagos dando lugar a la formación de células espumosas que se adhieren a la pared vascular iniciando así el proceso de la aterogénesis.

En pacientes hipercolesterolémicos, la reducción de los niveles de colesterol conlleva una mejoría de la disfunción endotelial, al igual que resulta del tratamiento con otros grupos de fármacos, como los antioxidantes o bloqueadores del sistema renina-angiotensina (1,3).

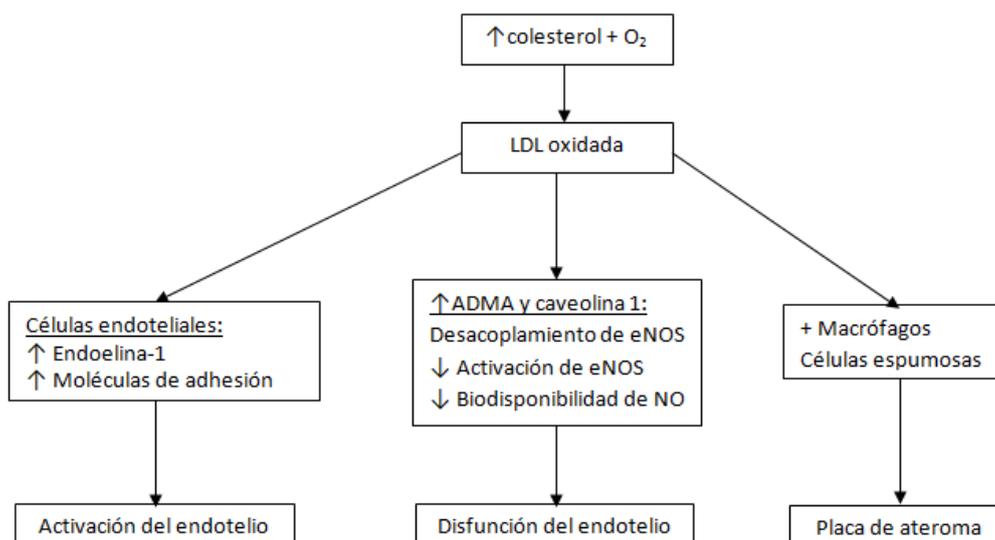


Fig. 1. Efecto del aumento de los niveles de colesterol y de O<sub>2</sub> en plasma sobre las células endoteliales.

### **2.1.6.3. Hipertensión**

La presión sanguínea elevada está relacionada con una reducción de la relajación dependiente del endotelio. En la hipertensión arterial el endotelio vascular está deteriorado y promueve cambios funcionales de la pared vascular. Se deprime la relajación dependiente del endotelio por una menor bioactividad del NO, y aumentan las ROS y los factores vasoconstrictores dependientes del endotelio (ET-1, AII, PGH<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub>). Las CML (CML) de la vasculatura en pacientes con hipertensión producen más anión superóxido en respuesta a la AII en comparación con pacientes normotensos, lo que conlleva una pérdida en la disponibilidad del NO y por tanto en su acción como vasodilatador.

La tensión de cizallamiento es uno de los mecanismos más importantes implicados en la vasodilatación mediada por NO, tanto en la micro- como en la macrovasculatura. Sin embargo, esta respuesta se encuentra reducida o ausente en los pacientes hipertensos.

Recientemente se ha visto que la inflamación está implicada en el desarrollo de hipertensión, y la inhibición de estos mecanismos inflamatorios puede evitar el desarrollo de hipertensión y disfunción endotelial asociada a enfermedad aterosclerótica (1,3).

### **2.1.6.4. Tabaco**

Entre las más de 4.000 sustancias que se encuentran en el humo del tabaco destacan por su capacidad lesiva, la nicotina, el monóxido de carbono, el cadmio y los carcinógenos. Así, la nicotina promueve el crecimiento de la placa aterosclerótica, y la exposición al humo del tabaco produce DE, inflamación favoreciendo la agregación creciente de monocitos, la proliferación de las CML y la trombosis; El tabaco produce, a nivel sanguíneo, la hiperagregabilidad plaquetaria, la disminución del inhibidor del factor tisular (TFPI), el aumento de los niveles de fibrinógeno y de la viscosidad sanguínea. El principal mecanismo que relaciona tabaco y afectación endotelial es el estrés oxidativo. El tabaco es una fuente rica en radicales libres que se liberan directamente en el interior de los vasos y, mediante la activación de las células inflamatorias, facilita el aumento endógeno de ROS. Todo esto hace que los fumadores presenten descensos en la biodisponibilidad del NO, aumento de los niveles de ox-LDL y una alteración de la vasodilatación. Además, también se ha visto que el tabaco disminuye los niveles de HDL colesterol, el cual tiene propiedades anti-ateroscleróticas y anti disfunción endotelial.

Recientemente se ha visto que los fumadores pasivos también sufren los efectos perjudiciales del tabaco sobre el endotelio vascular. Sin embargo, parece que estos efectos nocivos sobre las células endoteliales son dosis dependientes y que revierten tras el cese tabáquico (1,3).

### **2.1.6.5. Edad**

La incidencia y prevalencia de enfermedades cardiovasculares se incrementa con la edad, hasta el extremo de que se ha incluido entre los factores de riesgo para este tipo de patologías. Incluso durante un envejecimiento sano, en ausencia de enfermedades cardiovasculares, la capacidad vasodilatadora de las arterias humanas se reduce, ya

que se ponen en marcha procesos oxidativos e inflamatorios en la pared vascular que alteran sus funciones fisiológicas y aumentan su fragilidad frente a las agresiones externas. La edad es un importante determinante de riesgo cardiovascular tanto en hombres como en mujeres, y uno de los principales factores que predisponen a la disfunción endotelial. El mecanismo es una pérdida del equilibrio entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores, con un predominio de estos últimos.

Esto se explica por una disminución de la capacidad del endotelio para producir NO y una disminución de la expresión y actividad de la NOSe, junto con un aumento de factores constrictores (endotelina 1,  $\text{PGH}_2$  y  $\text{TXA}_2$ ), de los niveles plasmáticos de la ADMA y de la producción de ROS. Uno de los mecanismos que contribuyen a la disminución de los niveles de NO asociados a la edad es el aumento de la actividad de la Arginasa I, una enzima que cataliza la conversión de L-Arg en L-ornitina y urea, y por lo tanto compite con la NOSe por la L-Arg. Esto genera un desacoplamiento de la misma con la consiguiente reducción de NO lo que conduce a la disfunción endotelial.

Por lo tanto, hay una clara asociación entre la edad y el desbalance entre factores vasoconstrictores y vasodilatadores pero, además, la edad se suele asociar a diabetes, hipertensión e hipercolesterolemia lo que acentúa el riesgo de desarrollar DE, aterosclerosis y, finalmente, enfermedades cardiovasculares (1,3).

### **3. ¿Qué ocurre en la disfunción endotelial?**

En la disfunción endotelial se produce un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, entre otros, pudiendo facilitar el desarrollo de arterioesclerosis, agregación plaquetaria y trombosis (5).

A continuación desarrollaremos algunos de las alteraciones que condiciona la disfunción endotelial:

#### **3.1. Modificación de la permeabilidad vascular**

El endotelio de las arterias está formado por un conjunto de células unidas entre sí por uniones intercelulares, más concretamente uniones adherentes, capaces de controlar el tráfico de moléculas a su través. Estas uniones se componen de proteínas de adhesión transmembrana pertenecientes a la familia de las caderinas, con un dominio citoplasmático que conecta con el entramado de proteínas del citoesqueleto, el cual representa el soporte estructural del endotelio.

La pérdida paulatina de la capacidad del endotelio para controlar el tráfico de macromoléculas trae como consecuencia un mayor depósito de moléculas circulantes como el fibrinógeno y las LDL, lo que constituye uno de los factores que inicia el proceso de disfunción endotelial. El aumento de la permeabilidad vascular parece estar relacionado con una contracción celular mediada por el calcio y con una desorganización del citoesqueleto celular. Diversos estímulos protrombóticos, inflamatorios o lipídicos producen cambios significativos en la permeabilidad endotelial.

El flujo de LDL a través del endotelio se produce mediante transcitosis no mediada por receptor, a favor de gradiente de concentración. Dicho proceso es potenciado por la hipercolesterolemia (puesto que aumenta el gradiente de concentración) y la HTA (que incrementa la permeabilidad endotelial). El efecto de las lipoproteínas parece llevarse a cabo a través de la f-actina e inhibiendo la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina. En los últimos años se ha descrito la implicación de la lisil-oxidasa-endotelial (LOX) en la disfunción endotelial. Se trata de un enzima que en condiciones normales se expresa en gran cantidad en el endotelio vascular y regula la maduración de la matriz extracelular y la permeabilidad endotelial. Pero, la presencia de LDL en concentraciones aterogénicas disminuye los niveles de LOX favoreciendo así la transformación patológica de la matriz subendotelial.

Otro efecto de las LDL y LDL oxidadas sobre el endotelio es la degradación de proteoglicanos del heparán sulfato que compone la matriz extracelular del espacio subendotelial, mediante la inducción de la secreción de heparinasa, lo que favorece también el aumento de la permeabilidad vascular, y por tanto, la transformación patológica de la matriz subendotelial (5).

### **3.2. Inflamación**

La inflamación crónica lleva a la disfunción endotelial, pero también ocurre lo contrario: cuando se da un proceso de disfunción endotelial, este puede inducir la inflamación. La activación del endotelio conlleva la expresión de citocinas como la IL-1, los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), el fibroblasto básico (bFGF) y los factores quimiotácticos (MCP-1), y la exposición de proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión (CAM) para receptores específicos de leucocitos circulantes. Cuando el endotelio es activado por agentes proinflamatorios y aterogénicos expresa VCAM-1, ausente en el endotelio normal, y sobreexpresa ICAM-1. Esta sobreexpresión de CAM en las zonas con lesión aterosclerótica, junto con la inducción de sustancias quimioatrayentes como MCP-1 facilita la unión y la migración de los monocitos en las áreas de lesión, y es llevada a cabo por la presencia de LDL en concentraciones aterogénicas (> 160 mg/dl).

El valor de ICAM-1 en los pacientes sirve como predictor del desarrollo de eventos cardiovasculares a largo plazo y correlaciona con los valores de proteína C reactiva (5).

### **3.3. Desregulación del tono vascular**

El óxido nítrico producido por el endotelio es el principal responsable del mantenimiento de la homeostasis vascular mediante su efecto vasodilatador, antiagregante plaquetario, inhibidor de la proliferación de las CML, antioxidante e inhibidor de la expresión de CAM y de la adhesión de monocitos; por lo que defectos en su producción alteran esta homeostasis.

La disminución de la dilatación dependiente de NO es la manifestación más temprana de la disfunción endotelial. Las LDL son las responsables de disminuir la actividad de la NOSe, el incremento de la degradación de NO y el aumento de la inhibición competitiva del enzima por parte del inhibidor endógeno ADMA presente en cantidades aumentadas en pacientes hipercolesterolémicos (5).

### **3.4. Estado protrombótico**

En condiciones normales (endotelio sano) el endotelio no sólo no induce la coagulación ni activa las plaquetas, sino que mantiene estos procesos inhibidos, y esto lo lleva a cabo mediante la producción por parte de las células endoteliales de PGI<sub>2</sub> y NO. El NO inhibe la adhesión, la activación, la secreción y la agregación plaquetaria a través de un mecanismo dependiente del GMPc. Además, también inhibe el cambio conformacional dependiente del calcio necesario para que el heterodímero de la glucoproteína IIb-IIIa (receptor plaquetario para el fibrinógeno y el factor de von Willebrand que facilita la activación plaquetaria) se una al fibrinógeno. El mecanismo de la PGI<sub>2</sub> es análogo pero en este caso la vía de segundo mensajero es la del AMPc.

En situaciones de disfunción endotelial, en cambio, se secretan sustancias protrombóticas como el factor activador plaquetario (PAF), moléculas de adhesión plaquetarias como el factor de Von Willebrand, fibronectina y trombospondina, y factores de coagulación como el factor V. El endotelio dañado también produce TXA<sub>2</sub>, un eicosanoide con actividad agregante plaquetaria y que actúa como un potente vasoconstrictor a través de la activación de la vía de la fosfolipasa C (5).

### **3.5. Supervivencia/muerte celular**

En condiciones normales, las células endoteliales tienen un índice de recambio muy bajo, que aumenta considerablemente en las zonas más vulnerables, donde también se observa un mayor número de células en proceso de apoptosis. Se cree que la apoptosis de las células endoteliales puede estar relacionada con el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. De hecho, factores proaterogénicos como las LDLox, las citocinas proinflamatorias, la AII y las especies reactivas de oxígeno, inducen apoptosis de las CE (5).

### **3.6. Pérdida de integridad del endotelio y lesión vascular**

La relevancia del endotelio en la homeostasis de la pared vascular se pone de manifiesto cuando se producen procesos que ocasionan la agresión y el deterioro de la pared vascular generando desendotelización, como ocurre en los procesos invasivos de revascularización. Todo daño causado sobre el endotelio trae consecuencias a largo plazo, debido a que la vida media de las células endoteliales es de unos 30 años.

Generalmente, los mecanismos moleculares implicados en la recuperación de un endotelio funcional lesionado se activan de forma inmediata, pero la exposición de la pared desprovista de endotelio puede persistir durante varias semanas lo que activa la adhesión plaquetaria y la liberación de factores quimiotácticos y mitogénicos, que ponen en marcha la reparación y el remodelado de la pared vascular. En dicha reparación participan tanto las CML, que proliferan y secretan matriz extracelular, como las células endoteliales que, a partir de los bordes del endotelio intacto colonizan las áreas contiguas carentes del mismo. Las CE empiezan a replicarse en las primeras 24 horas y continúan haciéndolo hasta pasadas 6-10 semanas del proceso que originó la pérdida del endotelio. En modelos experimentales se ha observado que las áreas que se reendotelizan antes presentan un menor grado de engrosamiento intimal y proliferación de las CML (5).

### **3.7. Endotelio y expresión génica**

La DE ocasiona una alteración en el patrón de expresión génica en las células endoteliales, que conlleva la inducción de genes que en condiciones fisiológicas estarían reprimidos, y la inhibición de otros expresados en condiciones normales. En los últimos años se ha visto que el NF- $\kappa$ B actúa como denominador común en la expresión coordinada de los genes inducidos por procesos inflamatorios. En condiciones normales este factor se encuentra en forma de heterodímero inactivo en el citoplasma unido a proteínas inhibitoras, pero ante la presencia de determinados factores, se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes diana como son citocinas, MCP-1, factor tisular, moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y c-myc. Por lo tanto, la activación de NF- $\kappa$ B parece ser un punto clave en la activación de múltiples efectos ligados al proceso aterosclerótico en el endotelio y en el resto de células implicadas.

La DE también puede implicar a otros factores de transcripción; las LDL son capaces de regular proteínas de unión a elementos de regulación por esteroides (SREBP), lo que afecta a la producción de enzimas implicadas en la síntesis de colesterol, y otros genes implicados en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas como los receptores de LDL, HDL, y la lipoproteína lipasa.

El óxido nítrico es un gas simple, liberado por la conversión del aminoácido L-Arg en L-citrulina por acción del enzima óxido nítrico sintetasa, la cual tiene una amplia distribución del organismo. Actualmente se le concede al óxido nítrico una gran importancia en el estudio de la fisiología normal y de algunas enfermedades cardiovasculares. Esta importancia reside en su papel como intermediario entre el daño endotelial y la arterioesclerosis, a través del descenso en su biodisponibilidad a nivel vascular, lo que predispone a la adhesión leucocitaria y plaquetaria, a la vasoconstricción y a la proliferación de las CML. Por esta razón, voy a dedicar el siguiente apartado a detallar lo que se conoce acerca de la regulación de su producción y eliminación, y sobre todo, a lo que sucede en relación a esta molécula en la DE (5).

## **4. El papel del óxido nítrico y su importancia como marcador de salud vascular**

En un principio voy a explicar lo que ocurre con el óxido nítrico y el endotelio en situaciones fisiológicas, y a continuación describiré lo que se conoce hasta ahora de su papel en la disfunción endotelial.

En 1980 Furchgott y Zawadzki estudiaron el papel del endotelio en la respuesta vasodilatadora del músculo liso vascular. Vieron que esta respuesta estaba mediada por la acción de la acetilcolina sobre receptores muscarínicos de las células endoteliales, lo cual liberaba un factor que al actuar en las CML del vaso inducía su relajación. A este factor lo llamaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Debido a la capacidad de las células endoteliales de producir prostaglandinas, incluidas las prostacilinas (PGI<sub>2</sub>), las cuales eran potentes vasodilatadores vasculares, estos

autores consideraron la posibilidad de que la PGI<sub>2</sub> u otras prostaglandinas fueran realmente el EDRF (6).

A finales de los años 80 se demostró que el EDRF producido y liberado por las arterias y venas realmente era el óxido nítrico. Llegaron a esta conclusión al ver que la acción del NO sobre el músculo liso vascular semejaba la llevada a cabo por el EDRF. Además, el NO presenta las mismas propiedades biológicas y químicas que se habían descrito para el EDRF:

- Ambos son biológicamente sustancias muy lábiles y su inactivación aumenta por acción del anión superóxido y es disminuida por la superóxido dismutasa.
- Activan el enzima guanilato ciclasa que aumenta los niveles del segundo mensajero GMPc a nivel de arterias y venas, produciendo la relajación de la célula muscular lisa por disminuir el calcio citosólico necesario para la interacción de las proteínas contráctiles (7).

La acción vasodilatadora llevada a cabo por el NO es estimulada por la acción de diversos estímulos vasodilatadores, como el flujo sanguíneo, estímulos metabólicos como la hipoxia y agonistas de receptores de membrana acoplados a proteínas G, como la acetilcolina o la bradisinina sobre el endotelio. Es importante destacar que muchos de estos agonistas cuando actúan directamente sobre receptores de CML, plaquetas o proteínas sanguíneas producen vasoconstricción, agregación plaquetaria y/o coagulación. De manera que la respuesta simultánea de un endotelio sano amortigua las consecuencias que estos efectos pueden tener sobre el vaso (2).

#### **4.1. Síntesis de NO**

El NO es producido a partir del aminoácido básico L-Arg por la acción de la NOS, la cual posee tres isoformas: NOS I o neuronal (NOS<sub>n</sub>), NOS II o inducible (NOS<sub>i</sub>), NOS III o endotelial (NOS<sub>e</sub>). Esta última es la principal responsable de la síntesis de NO en las células endoteliales.

Tanto la NOS<sub>n</sub> como la NOS<sub>e</sub> se localizan en el citoplasma de células del tejido nervioso y de células del endotelio respectivamente, y se producen continuamente. Ambas son conocidas como enzimas constitutivas y requieren iones calcio para la liberación de NO, la cual se realiza en cantidades pequeñas y por cortos períodos de tiempo. Por otro lado, la NOS<sub>i</sub> se sintetiza en algunas células inmunes, principalmente en los macrófagos y los neutrófilos. Esta enzima sintetiza, en respuesta a un estímulo, cantidades mayores de NO por períodos de tiempo prolongados durante los procesos patológicos.

El monómero de NOS está formada por un dominio oxigenasa N-terminal, asociado al grupo Hemo, y un dominio reductasa C-terminal asociado a flavinas, unidos por una región regulatoria que contiene un sitio de unión a la calmodulina.

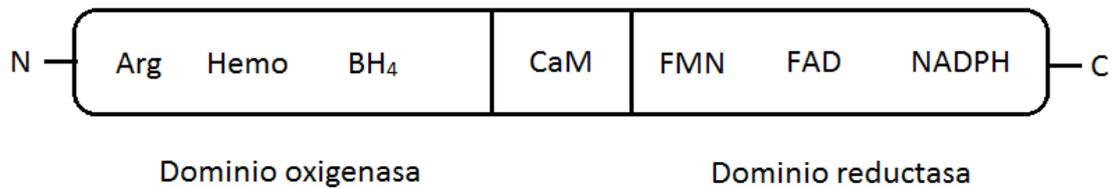


Fig. 2. Esquema de la estructura de NOSe.

N: extremo amino terminal; C: extremo carboxil terminal;  
 Arg: L-Arg; Hemo: grupo hemo; BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina;  
 CaM: calmodulina; FMN: flavina adenina mononucleótido;  
 FAD: flavina adenina dinucleótido.

Para que la NOS lleve a cabo su acción tiene que producirse un paso previo de dimerización consistente en la interacción de los dominios oxigenasa a través del cofactor BH<sub>4</sub>. Tanto la L-Arg como el BH<sub>4</sub> promueven la formación del dímero y lo estabilizan, por lo que la presencia de bajas concentraciones de alguno de ellos desacopla el enzima y genera radicales superóxido. Una vez la NOS se ha dimerizado, sintetiza el NO. Para ello la NOS tiene que unirse a la calmodulina, lo cual requiere aumentos del Ca<sup>+2</sup> intracelular, en el caso de la NOSe y NOSn; la NOSi por su parte, tiene una alta afinidad con calmodulina por lo que en presencia de concentraciones muy bajas de Ca<sup>+2</sup> es capaz de unirse a ella. Por lo tanto, la actividad de la NOSi es independiente de Ca<sup>+2</sup> y puede mantenerse tónicamente activa durante varios días.

Para llevar a cabo la síntesis de NO, la NOS oxida la L-Arg formando así NO y L-citrulina. Para ejercer esta acción, utiliza como co-sustratos el O<sub>2</sub> y el NADPH y varios cofactores redox como BH<sub>4</sub>, FAD, FMN y el grupo Hemo. Una vez sintetizado el NO, éste difunde al músculo liso vascular donde tiene una vida media de actuación de unos 6 segundos, activando la guanilato ciclasa soluble con el consiguiente aumento de la concentración citosólica del GMPc, compuesto mediador de muchas de las acciones fisiológicas del NO, entre ellas su efecto vasodilatador, y que se sintetiza a partir de GTP. Los efectos del GMPc se producen a través de varios mecanismos encaminados a disminuir los niveles de calcio intracelular en la CML (2).

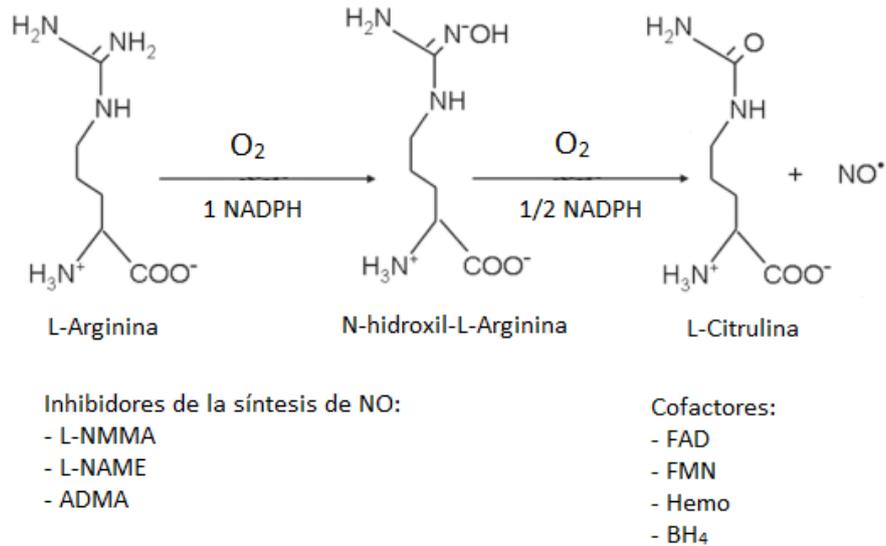


Fig. 3. Síntesis de NO. La síntesis de NO en la célula endotelial se produce a través de conversión de la L-Arg en L-citrulina, proceso que es mediado por la enzima óxido nítrico sintetasa. Pero en la síntesis de NO también están implicadas otras moléculas que pueden actuar inhibiendo a favoreciendo la síntesis del mismo.

#### 4.1.1. Regulación de la producción y liberación de NO

El NO se produce en respuesta a diversos estímulos: mecánicos (como el flujo pulsátil y la tensión de rozamiento sobre la célula endotelial que, junto con un estricto control de los niveles extracelulares de calcio, son los principales patrones reguladores de la síntesis y liberación de NO en el endotelio), metabólicos (el principal es la hipoxia) y mediados por receptores (como los mediados por Ach, bradicinina...) (8).

Uno de los mecanismos fisiológicos más importantes es la fuerza de roce que ejerce el flujo sanguíneo laminar al circular por los vasos, o tensión tangencial. El aumento de esta fuerza de roce tiene dos efectos: una mayor actividad de la NOSe y un efecto sobre la transcripción del gen que codifica para la misma; el ARNm, además, presenta una mayor estabilidad; estos 3 hechos resultan en una respuesta mantenida de la NOSe que mantiene una mayor producción de NO durante más tiempo. Por otro lado, el aumento del calcio intracelular genera una respuesta rápida y transitoria de NOSe (Fig. 4).

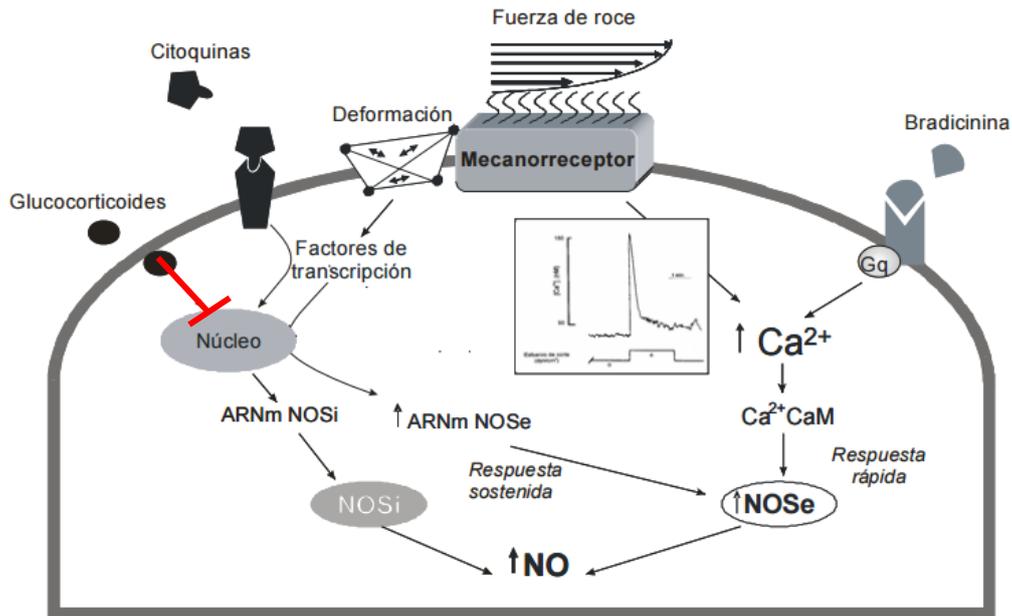


Fig. 4. Regulación de la actividad de NOSe y NOSi. En la figura tenemos representada una célula endotelial, en la que vemos que diversos estudios como la tensión tangencial, las citoquinas y la bradicinina inducen un aumento en la producción de NO. Unos a través del incremento en la transcripción del gen que codifica para la enzima, lo que supone un aumento y más prolongado efecto de la NOSe sobre la síntesis de NO; y otros a través del aumento del calcio intracelular dando lugar a una respuesta rápida y transitoria de NOSe.

En cuanto a NOSi, su expresión es regulada a nivel nuclear por citoquinas (la aumentan) y los glucocorticoides (la inhiben) (2).

#### 4.1.2. Inactivación del NO

El NO es rápidamente inactivado por las ROS y proteínas de la sangre como la hemoglobina y la albúmina. Su unión a la hemoglobina forma nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), y cuando se une al  $\text{O}_2^-$  (anión superóxido) forma peroxinitrito convirtiendo al NO en un poderoso antioxidante, por lo que su síntesis en el endotelio es esencial para el mantenimiento de la salud vascular. Sin embargo, en circunstancias patológicas puede convertirse en una molécula prooxidante. Procesos inflamatorios de la pared vascular cursan con altas concentraciones tanto de ROS como de NO, originados tanto en las células endoteliales como en los macrófagos reclutados, en los cuales se sintetiza NOSi en respuesta a estímulos generados por distintas citoquinas. La reacción de las ROS con el NO producen el radical peroxinitrito, altamente reactivo, el cual modifica la estructura y función de distintas proteínas contribuyendo así a la disfunción vascular que aparece en distintas patologías, entre ellas la hipertensión y la aterosclerosis.

Los estudios iniciales de la función del NO como una molécula de señalización en músculo liso demostraron la importancia del GMPc como segundo mensajero. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que el NO tiene un papel importante en la transducción de señales y otros aspectos de la función celular (regulación de la transcripción, reparación de ADN y apoptosis) en gran medida a través de la S-nitrosilación de proteínas, proceso por lo tanto independiente del GMPc. En los

mamíferos, la S-nitrosilación (unión a grupos sulfuro o tioles de residuos de cisteína) celular está acoplada a la síntesis endógena de NO, como parte del metabolismo de L-Arg a L-citrulina a través de una reacción catalizada por la NOS. Esta S-nitrosilación de péptidos y proteínas produce grupos S-nitrosotioles bioactivos. En la sangre, S-nitrosoalbúmina (SNO-albúmina) y S-nitrosohemoglobina (SNO-Hb) constituyen los principales transportadores del NO bioactivo circulante. Cualquier defecto en la síntesis y/o catabolismo de estos productos que implique un aumento en su concentración va a afectar a la presión arterial, por aumento del secuestro de NO (9).

#### **4.1.3. El NO en la disfunción endotelial**

La alteración de la función endotelial, que se manifiesta por una alteración en el control del tono vasomotor, se produce tanto en grandes arterias y venas como en la microvasculatura, y tiene lugar en distintas enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial, la aterosclerosis o la insuficiencia cardíaca.

La DE acarrea una depresión de la relajación dependiente del endotelio, y este trastorno está asociado a una menor biodisponibilidad del NO. La ausencia de la respuesta relajante mediada por el NO, se manifiesta también en un aumento de la contracción del músculo liso vascular en respuesta a diversos vasoconstrictores como endotelina a través de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, serotonina (estimulando su receptor 5-HT<sub>2A</sub>) y noradrenalina interactuando con el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico.

Por lo tanto, como ya hemos mencionado, la alteración en la relajación dependiente del endotelio está influida por una menor biodisponibilidad del NO debido a su menor producción por la NOSe, como consecuencia de:

- I) Disminución de la síntesis de NO debido a alteraciones en:
  - a. El metabolismo de su sustrato.
  - b. La expresión y/o estructura del enzima.
  - c. Las vías de señales que regulan su actividad.
  - d. La disponibilidad de cofactores requeridos por el enzima.
- II) Aumento de la inactivación de NO

#### **I) Disminución de la síntesis de NO**

##### *Alteraciones del metabolismo del sustrato de la NOS*

Como hemos dicho con anterioridad, el sustrato de la NOSe es la L-Arg, un aminoácido básico sintetizado como producto dentro del ciclo de la urea. Los riñones son la mayor fuente de producción de arginina, obteniéndola a partir de la citrulina de la circulación sanguínea. La arginina puede ser posteriormente metabolizada por la enzima arginasa para formar urea. Se ha visto que la síntesis endógena de arginina varía en función del estado nutricional y de la etapa del desarrollo del individuo, siendo el gran contribuidor al flujo de arginina el volumen proteico de todo el cuerpo. El catabolismo de la arginina se realiza a través de la vía de la NOS y de la arginasa. En condiciones normales, la cantidad de arginina presente en plasma que puede ser utilizada como precursor para la síntesis de NO ronda el 60% del total de arginina presente en el organismo, sin embargo, solamente el 1.2% de este volumen se utiliza para tal fin.

La concentración de L-Arg en sangre es de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , pudiendo alcanzar concentraciones varias veces mayores en las células endoteliales (0.1-0.8 mM). A pesar de las altas concentraciones intracelulares de L-Arg, su nivel extracelular parece ser el factor limitante de la producción de NO. A esta conclusión se ha llegado por la evidencia clínica y experimental que indica que la administración oral o intravenosa de la L-Arg mejora la síntesis de NO y la vasodilatación dependiente del endotelio en diversas patologías como hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, a pesar de la disponibilidad en exceso de L-Arg intracelular. Esta situación contradictoria es lo que se conoce como “paradoja de arginina” (2).

El término “paradoja de arginina” fue acuñado tras observar que la constante de afinidad ( $K_m$ ) de la NOSe para la L-Arg era de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  y que las concentraciones intracelulares de arginina (100-800  $\mu\text{M}$ ) eran suficientes para saturar esta enzima. Sin embargo, se ha demostrado que aumentando la concentración extracelular de L-Arg de 0.1 a 10 mM se incrementa la producción de NO, a pesar de la cantidad suficiente de arginina disponible en el interior de las células endoteliales (10). Este efecto conocido como paradoja de arginina puede tener varias explicaciones:

- 1) La L-Arg es secuestrada en *pools* o compartimentos poco accesibles para la NOSe, lo que se traduce en una preferencia por la L-Arg extracelular.
- 2) Alteraciones en los niveles plasmáticos del inhibidor endógeno de la NOSe, la ADMA, un metabolito de la L-Arg que se encuentra frecuentemente elevado en pacientes con hipertensión, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina, fallo renal y diabetes tipo II. En las células endoteliales, la ADMA se forma a partir de la hidrólisis de proteínas metiladas en residuos de L-Arg. La ADMA es degradado por el enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa, cuya isoforma 2 (DDAH-2) es la de mayor expresión en el endotelio. El aumento del estrés oxidativo que se encuentra asociado a múltiples factores de riesgo cardiovascular, deprime la actividad de DDAH-2 generando un aumento significativo de los niveles intracelulares de la ADMA que compite con la L-Arg en su transporte por el sistema transportador denominado  $\gamma^+$ , perteneciente a la familia de transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT), de lo cual hablaremos más adelante. Se ha visto que pequeñas alteraciones en las concentraciones de ADMA provocan disminuciones significativas de la producción de NO, alteraciones en el tono vascular y en la resistencia vascular sistémica; por lo tanto, se ha empezado a considerar a la ADMA como un factor de riesgo cardiovascular, convirtiéndolo en un nuevo blanco para la terapéutica farmacológica. Altas concentraciones de ADMA en un paciente indican que la administración suplementaria de L-Arg seguramente mejorará la capacidad del endotelio para contrarrestar los efectos vasculares dañinos de vasoconstrictores y ROS (2).
- 3) La L-Arg estimula la vasodilatación por un mecanismo que no implica a la NOSe. La infusión intravenosa de L-Arg estimula la liberación de insulina a partir de las células beta del páncreas. Este aumento de los niveles plasmáticos de insulina era el factor responsable de la vasodilatación periférica, de la disminución de la agregación plaquetaria y del descenso en la viscosidad de la sangre. Dicha vasodilatación producida por la L-Arg era abolida por el octreótido, un análogo de la somatostatina que inhibe la liberación de insulina. La administración

conjunta de L-Arg y octreótido hace que el efecto vasodilatador disminuya un 77% y que el efecto antiplaquetario un 55%. Si además de L-Arg y el octreótido se aporta insulina, la respuesta vascular es casi idéntica que la observada al administrar únicamente L-Arg. Con todo esto concluyeron que los efectos vasopresores observados durante la infusión de octreótido eran consecuencia de la supresión de insulina. (11,12)

- 4) Inducción de la activación del enzima arginasa, lo que disminuye la disponibilidad de la L-Arg para ser sustrato de la NOSe y, en consecuencia, para la formación de NO. Este enzima contiene dos isoformas: la I constitutivamente presente y que aumenta su expresión con el estrés oxidativo y el estiramiento, y la II inducible cuya síntesis aumenta por acción de la trombina, lipopolisacáridos y citoquinas. Por lo tanto, cambios hemodinámicos asociados con la hipertensión ó procesos inflamatorios crónicos precoces podrían aumentar los niveles de arginasa que transforma L-Arg en urea y L-ornitina, y a su vez, ésta última en L-prolina y poliaminas esenciales para el crecimiento de la CML y la síntesis de colágeno. Así al aumentar la actividad de la arginasa puede promoverse el remodelamiento vascular y la formación de neoíntima. La arginasa inhibe la producción de NO a través de varios mecanismos: competición con NOSe por el sustrato; desacople de la NOSe con producción de  $O_2^-$  como consecuencia de una menor disponibilidad de L-Arg; sensibilización de la NOSe a su inhibidor endógeno ADMA; inhibición de la actividad de la NOSi a través de la urea. Es importante destacar que cuando la NOSe actúa sobre L-Arg para sintetizar NO, se genera un intermediario conocido como  $N^G$ -hidroxil-L-Arg capaz de inhibir a la arginasa, limitando así la actividad de este enzima en la célula endotelial (2).

### El transporte de L-Arginina

En las células endoteliales, la absorción del sustrato L-Arg para la síntesis de NO es mediado por distintos sistemas de transporte llamados  $y^+$ ,  $y^+L$ ,  $b^{0,+}$  y  $B^{0,+}$ . De todos ellos, el principal involucrado en este proceso es el sistema  $y^+$ , siendo responsable de aproximadamente el 85% del transporte en situaciones fisiológicas. El sistema de transporte  $y^+$  presenta alta afinidad por aminoácidos catiónicos, es dependiente del potencial de membrana, interacciona con aminoácidos neutros a muy baja afinidad y es estimulado por la presencia de un sustrato en el lado opuesto (*trans*) de la membrana. Este sistema incluye la familia de proteínas codificada por los genes SLC7A que se conoce como transportador de aminoácidos catiónicos (CATs) y que está formada por distintas subclases: CAT-1, CAT-2A, CAT-2B, CAT-3 y CAT-4. CAT-1 está ampliamente expresado, mientras que CAT-2A y CAT-3 se encuentran de manera constitutiva en hígado y en cerebro, respectivamente. CAT-2B se expresa en condiciones de inflamación en una variedad de células, entre ellas las células T y los macrófagos. La actividad de transporte en el caso de CAT-4 no ha sido todavía descrita.

CAT-1, CAT-2B y CAT-3 presentan una afinidad media para su sustrato ( $K_m$  aproximadamente 50-250  $\mu$ M), mientras que CAT-2A tiene una afinidad baja para los aminoácidos catiónicos ( $K_m$  aproximadamente 2-5 mM). Además, CAT-1, CAT-2A y CAT-2B están glicosilados, lo que sugiere que estos transportadores se encuentran en la membrana plasmática. El transporte de L-Arg se lleva a cabo por un mecanismo de

difusión facilitada, lo cual es absolutamente necesario para la síntesis de NO, ya que se vio que en células endoteliales incubadas con L-Arg modificada capaz de entrar en las células por difusión pasiva, NOSe no era capaz de sintetizar NO.

Uno de los principales factores en la regulación de los transportadores de L-Arg es la disponibilidad de sustrato, de tal manera que en las células expuestas a cantidades limitadas de sustrato se produce, como mecanismo de defensa, una depresión adaptativa de la actividad de transporte. De manera contraria, el ritmo de transporte aumenta a medida que lo hace la cantidad de sustrato, lo que permite tener un influjo rápido de aminoácidos. El mecanismo celular responsable de esto todavía no se conoce con exactitud pero se piensa que puede estar involucrada la proteína quinasa C (PKC), con efectos inhibitorios sobre el transportador CAT.

Otros reguladores de CAT son los mediadores inflamatorios, los cuales se ha visto que incrementan la velocidad máxima de transporte ( $V_{max}$ ) de la L-Arg sin afectar la afinidad del transportador por la misma. Determinadas citoquinas como interleuquina- $1\beta$  y TNF- $\alpha$  inducen la expresión de CAT-1 y CAT-2 en las CML de los vasos. Es probable que la inflamación actúe como estímulo regulando el transporte de L-Arg con la finalidad de producir NO que asegure el flujo sanguíneo a los sitios donde existe daño vascular (13).

Por lo tanto, como hemos visto, la regulación del transporte de L-Arg es esencial, ya que permite que se lleven a cabo muchas e importantes funciones metabólicas, entre ellas la síntesis de NO. Pero, sabiendo que la disfunción endotelial asociada con diferentes enfermedades cardiovasculares, se produce como consecuencia de un defecto en la producción de NO, es razonable pensar que el transportador CAT-1 juega un papel en este proceso. De hecho, se ha visto que la disfunción endotelial puede resultar de alteraciones en los sistemas de transporte de la L-Arg. (14).

Schlaich et al llevaron a cabo un estudio en el que probaron que alteraciones en el transporte celular de L-Arg se asociaba con hipertensión arterial esencial y estaba presente también en pacientes normotensos con una alta predisposición genética a la hipertensión esencial. En ambos grupos se vio que existía un defecto en el transporte de la L-Arg y en la vasodilatación dependiente del endotelio y que la administración de L-Arg era capaz de mejorar esta respuesta disminuida a la acetilcolina. (15) Posteriormente, otros estudios han demostrado que la administración crónica de suplementos de L-Arg es capaz de causar la regresión de lesiones preexistentes a nivel de la íntima y por tanto de restablecer la función endotelial al facilitar la biodisponibilidad de NO (14). Esta disminución en la cantidad de NO disponible debido a alteraciones en el transporte de L-Arg puede deberse a que se afecta la interacción entre L-Arg y NOSe y el intercambio entre los inhibidores intracelulares de la síntesis de NO y la L-Arg extracelular (15).

#### *Alteraciones en la expresión y/o estructura de la NOSe*

Otro factor que puede afectar la producción endotelial de NO es el grado de expresión de la NOSe que es regulada por diversos estímulos tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Aumenta por efecto de la fuerza de roce del flujo, las bajas concentraciones de LDL-oxidada y análogos de GMP<sub>c</sub>. Por el contrario, las altas

concentraciones de LDL-oxidada, citoquinas como el TNF- $\alpha$ , o lipopolisacáridos disminuyen su expresión.

Una propiedad común de muchos de los estímulos que incrementan la expresión de NOSe, entre ellos la fuerza de roce del flujo, es la capacidad de aumentar la producción de ROS en las células endoteliales. Por lo tanto, ROS también es capaz de inducir la expresión de NOSe. Por ejemplo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa la transcripción del gen precursor de NOSe e incrementa la estabilidad del ARNm una vez formado. En células endoteliales aórticas bovinas (BAECs) expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante un tiempo de duración corto, se vio que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producía un aumento prolongado de NOSe mRNA y de la expresión de proteínas funcionales (16). Por contra, drogas que disminuyen los niveles circulantes de colesterol (estatinas o inhibidores de HMG-CoA reductasa) presentan un efecto vascular beneficioso debido al menos en parte a su capacidad para aumentar la expresión génica de la NOSe. Esta acción sobre la mejoría de la función endotelial depende de los niveles plasmáticos de ADMA, el inhibidor endógeno de NOSe. En aquellos pacientes con altos niveles de ADMA, que bloquea la NOSe sobre-expresada, no corrigen la función endotelial. Sin embargo, esta situación puede revertirse cuando la administración de estatinas se combina con un suplemento nutricional de L-Arg. Por el contrario, en sujetos con bajos niveles de ADMA, la administración de estatinas solas, L-Arg sola, o la combinación de ambas mejoran de forma significativa la vasodilatación dependiente del endotelio (17).

Como ya sabemos, los principales factores de riesgo cardiovascular (hipercolesterolemia, diabetes, hipertensión y tabaco) se asocian con alteraciones en la relajación dependiente del endotelio. Aunque los mecanismos que conducen a esta alteración son multifactoriales, la principal causa de la falta de relajación vascular es un desarreglo en la vía NOSe/NO, que incluye una disminución de la actividad y expresión de NOSe, un descenso en la sensibilidad a NO y aumentos en la degradación de NO por interacciones con el anión superóxido. La actividad enzimática es inhibida por varios mecanismos asociados con la aterosclerosis y la hipercolesterolemia, como la LDL-ox, que inhibe la señal de transducción desde el receptor activado hasta la NOSe, los niveles altos de colesterol sérico y la LDL que aumentan el número de caveolinas presentes, incrementando así la formación de complejos caveolina-NOSe y por lo tanto atenuando la producción de NO por parte de la célula endotelial. Otros inhibidores de NO son los inhibidores endógenos ADMA y L-NMA. En estas situaciones de hipercolesterolemia y aterosclerosis, NOSe se vuelve disfuncional y produce superóxido en vez de NO, lo que contribuye al desarrollo de disfunción endotelial. Esta producción de superóxido está regulada principalmente por la disponibilidad de BH<sub>4</sub>. En presencia de concentraciones subóptimas de BH<sub>4</sub>, se produce el desacoplamiento de NOSe con la consiguiente producción de superóxido. Se ha visto que la administración de BH<sub>4</sub> exógena aumenta la producción de NO y disminuye la de superóxido, por lo que la administración temprana de BH<sub>4</sub> mejoraría la disfunción endotelial asociada a hipercolesterolemia, aterosclerosis, hipertensión y tabaquismo (18).

### *Alteraciones en las vías de señales que regulan la actividad de la NOSe*

Un mecanismo a tener en cuenta como posible inductor de DE es la alteración de los factores celulares que modulan la actividad de NOSe. Esta enzima está sujeta a varios tipos de modificaciones estructurales post-traduccionales que la activan o la inhiben en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos. La activación de NOSe depende del aumento transitorio de  $Ca^{+2}$  en la célula endotelial, como respuesta a agonistas de receptores acoplados a proteínas G, y de la unión de este a la calmodulina, siendo el mecanismo más rápido de activación de la enzima, pero también de su estado de fosforilación en residuos serina, treonina y tirosina, de su acilación y nitrosilación, de su interacción con otras proteínas y de su localización subcelular.

- 1) *Receptores acoplados a proteínas G (GPCR)*. La superfamilia de los GPCR actúa activando proteínas G que transducen la señal extracelular a moléculas efectoras intracelulares. Esta señalización normalmente es llevada a cabo por la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G, a la cual está acoplado el GPCR. Hay cuatro subclases principales de proteínas G, y la unión del GPCR a ellas permite que se generen distintas respuestas:  $G_{\alpha_s}$  (estimuladora) que, a través de determinados mediadores, da lugar a un aumento de la relajación de las CML y en consecuencia a un aumento de la vasodilatación; la  $G_{\alpha_i/o}$  (inhibidora) que disminuye la relajación muscular y la vasodilatación; la  $G_{\alpha_q}$  que, a través de IP3 y DAG, facilita la vasoconstricción; y la  $G_{\alpha_{12/13}}$  que también da lugar a la contracción del músculo liso. Esta señalización a través de los GPCR está regulada de una manera precisa. Cuando los GPCR están sometidos a estimulaciones prolongadas o repetidas, el receptor experimenta una desensibilización que disminuye su capacidad para activar de forma apropiada las proteínas G y de iniciar la cascada de señalización intracelular. Este desacoplamiento está regulado en parte por una serie de serina/treonina quinasas del receptor acoplado a la proteína G (GRKs) que fosforilan al GPCR, incrementando la afinidad del mismo por un tipo de proteínas llamado arrestinas lo que previene la activación del receptor a la proteína G reduciendo así la transducción de señales en más o menos un 80% (19).

La familia de quinasas GRK está compuesta por siete miembros (GRK1-GRK7) de los cuales, desde el punto de vista de su papel en la progresión de las enfermedades cardiovasculares y su participación en la inducción de la disfunción endotelial, el más importante es GRK2.

Los GPCR tienen un papel importante en el control de la presión arterial, por lo que se pensó que las GRKs pueden estar implicadas en la hipertensión. Como se ha citado antes, las GRKs producen una desensibilización de los GPCR. Un ejemplo es el receptor  $\beta$ -adrenérgico, que es inhibido al ser fosforilado por GRK2 disminuyendo la dilatación y aumentando potencialmente la presión sanguínea. En sujetos con hipertensión hay un aumento tanto de la expresión como de la actividad de GRK2 a nivel de las CML. El aumento de la presión sanguínea por efecto de GRK2 se acompaña también de un aumento de la rigidez de la pared vascular y de una hipertrofia cardíaca, los cuales podrían actuar como mecanismos indirectos en la hipertensión. Además, en las células endoteliales GRK2 es capaz de interactuar con Akt inhibiéndola. Akt está

implicado en la activación de NOSe por fosforilación, por lo que la inhibición de Akt supone una menor actividad de la NOSe y por tanto una disminución de la producción de NO. Todo esto conduce al desarrollo de DE (2).

Los pacientes con diabetes tipo 2 también son propensos a desarrollar DE lo que explica el riesgo aumentado de sufrir eventos cardiovasculares adversos. En condiciones normales, la insulina, a través de su receptor tirosina quinasa, activa el mecanismo de producción de NOSe vía Akt, pero en diabéticos Akt es inhibida por GRK2, disminuyendo por tanto la actividad de NOSe. La insulina estimula la formación de un complejo de señalización de  $\beta$ -arrestina 2 que media la translocación de Akt al receptor de la insulina. Aumentos de GRK2 y descensos de  $\beta$ -arrestina 2 inhiben la estimulación de Akt/NOSe inducida por la insulina. Esto se produce porque GRK2 y  $\beta$ -arrestina 2 compiten por unirse al receptor de la insulina en presencia de la hormona. En vasos sanos,  $\beta$ -arrestina 2 se une a Akt en presencia de insulina, pero en diabéticos, la insulina produce la translocación de GRK2 a la membrana donde se une a Akt evitando así su unión a  $\beta$ -arrestina 2 inhibiendo la NOSe, lo que se traduce en menor relajación vascular (Fig. 5).

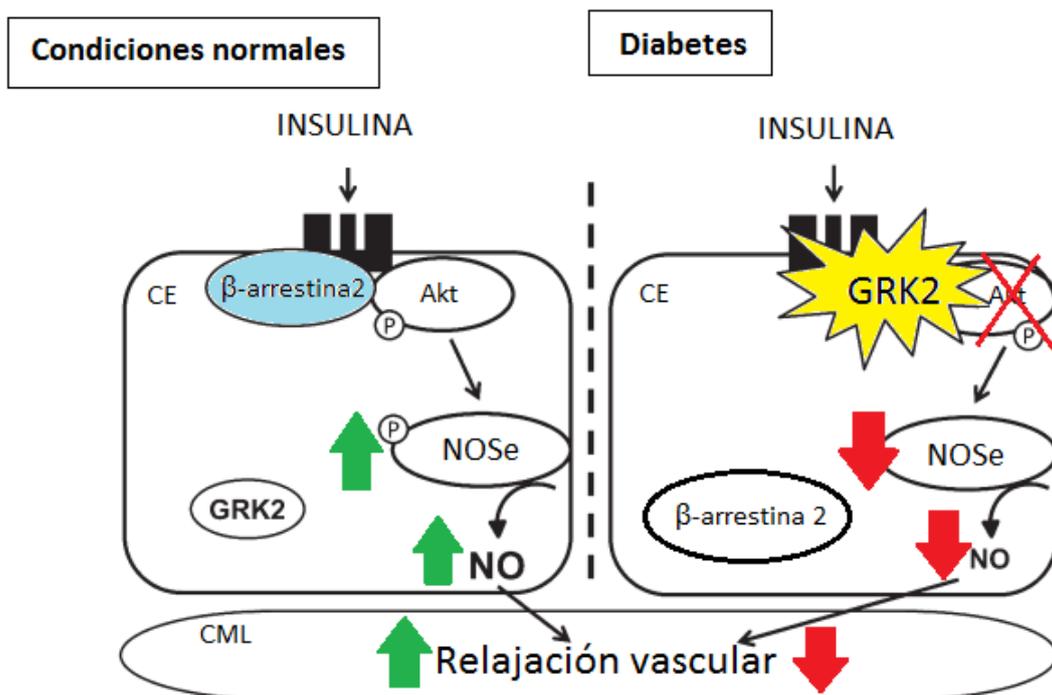


Fig. 5. Efectos de la insulina sobre la vasodilatación en la diabetes.

Recientemente se ha descubierto que GRK2 también es capaz de modular la respuesta a la insulina. Esta hormona pancreática induce un aumento de los niveles de GRK2, lo que en consecuencia inhibía la señal de la insulina y la extracción de glucosa. Esto sugirió la posibilidad de que GRK2 indujera una resistencia a la insulina. Así, se ha visto que tratamientos con inhibidores de GRK2 aumentan el efecto de la insulina, mientras que una sobreexpresión de GRK2 induce la resistencia a la misma, por lo que se ha empezado a considerar GRK2 como una buena diana terapéutica a considerar en la diabetes y su disfunción vascular asociada, y para la resistencia a la insulina.

- 2) *Fosforilación.* La fosforilación de NOSe en residuos de Ser, Thr y Tyr, constituye un mecanismo fundamental en el control de su actividad en respuesta a numerosos estímulos humorales, mecánicos y farmacológicos. Se han descrito varios sitios de fosforilación, localizados en los distintos dominios de la enzima que pueden provocar tanto la estimulación como la inhibición de la actividad enzimática de NOSe. La fosforilación de Ser1177 en el dominio reductasa y Ser633 en la zona de unión al cofactor FMN, favorecen su unión a calmodulina y, además, la fosforilación de Ser1177 también promueve la activación de la enzima por provocar su dimerización. Por otro lado, la fosforilación de Thr495 interfiere en la unión con la calmodulina por lo que tiene un efecto inhibitorio. La mayor parte de los agentes que estimulan a la NOSe (fuerza de roce, bradicinina, VEGF, ATP, estatinas e inhibidores de la fosfodiesterasa III) provocan la fosforilación de los residuos Ser1177 y Ser633, mientras que la fosforilación en Thr495 disminuye en respuesta a agonistas como bradicinina y VEGF, y se presenta asociada a tabaquismo y a fármacos inmunosupresores como la rapamicina (2).
- 3) *Acilación.* La NOSe no contiene dominios hidrofóbicos transmembrana, por lo que su unión a la membrana plasmática requiere de un paso previo de acilación, lo que modula su actividad. La NOSe está doblemente acilada por los ácidos grasos saturados mirístico y palmítico. La miristilación es irreversible y permite que la enzima se ancle en las caveolas de la membrana plasmática donde interactúa de manera directa y reversible con la caveolina 1. Esta interacción inhibe la actividad de NOSe en parte por la ocupación del sitio de unión de la calmodulina lo que atenúa la actividad basal de la enzima, alcanzándose la máxima actividad sólo cuando la concentración intracelular de calcio alcanza niveles suficientemente altos para promover la unión a la calmodulina (20). Por otro lado, la palmitolación es reversible y estabiliza la asociación de la NOSe con la membrana de una manera regulable lo que permite un control dinámico de la actividad de NOSe. La estimulación prolongada de agonistas como bradicinina induce de-palmitolación de NOSe y su translocación al citosol lo que podría ser un mecanismo de retroalimentación negativa que desactiva a la NOSe.
- 4) *Nitrosilación.* La nitrosilación de NOSe constituye otro nivel de control de la actividad de NOSe que evita la formación de NO en grandes cantidades. Para que se lleve a cabo el proceso de nitrosilación (unión de NO a residuos de cisteína), es necesario que el enzima esté anclada en la membrana. Es un proceso reversible que inhibe la actividad de NOSe porque promueve la disociación de la estructura dimérica en monómeros inactivos.
- 5) *Interacción con proteínas.* La NOSe interacciona con varias proteínas capaces de modular su actividad. La unión con calmodulina, dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, es necesaria para la síntesis de NO. Como ya hemos mencionado previamente, en la célula endotelial no estimulada, la NOSe está asociada en las caveolas a la caveolina-1, interacción que inhibe tónicamente a la enzima. La estimulación de la célula endotelial por distintos agonistas y la consecuente unión de la enzima al complejo  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina, promueve la disociación del complejo NOSe-caveolina-1. Por lo tanto, los cambios transitorios intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  que ocurren tras la activación de la CE se acompañan de cambios

cíclicos en la interacción de NOSe con caveolina-1 y calmodulina. Se ha visto que cuando aumentan los niveles de LDL-oxidada se produce la translocación del complejo NOSe-caveolina-1 al interior de la célula permaneciendo NOSe de esta manera tónicamente inactiva. Otra proteína capaz de regular la actividad de NOSe es la chaperona hsp90. La unión de hsp90 a NOSe incrementa la síntesis de NO tanto a bajas como a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$ , porque aumenta la afinidad de la enzima por calmodulina. Para que se produzca la unión hsp90-NOSe es necesario que hsp90 esté fosforilada en residuos Tyr, y esto está inducido por distintos activadores de NOSe como son la fuerza de roce, bradicinina, histamina y VEGF. Además, hsp90 también aumenta la actividad de NOSe al facilitar su fosforilación. Para evitar la producción excesiva de NO, éste es capaz de impedir la interacción NOSe-hsp90 por nitrosilación de esta última proteína. Estudios recientes indican que NOSe también puede asociarse con proteínas del citoesqueleto, y más concretamente con actina. Esto permite un acople mecano-químico que es necesario para la activación de NOSe en respuesta a la fuerza de roce del flujo sanguíneo, y también permite un medio de translocación de NOSe desde las caveolas a compartimentos intracelulares (2).

#### *Disponibilidad de cofactores requeridos por la NOSe*

En ausencia de L-Arg o  $\text{BH}_4$ , la NOSe transfiere electrones al  $\text{O}_2$  molecular produciendo  $\text{O}_2^-$  en lugar de NO. Este proceso se conoce como desacople de NOSe. Este desacople de la NOSe ocurre en diversas condiciones patológicas y es la consecuencia de la oxidación de  $\text{BH}_4$  por efecto del peroxinitrito. Esta oxidación de  $\text{BH}_4$  puede representar una alteración importante en la hipertensión. El ácido ascórbico (vitamina C) recupera  $\text{BH}_4$  desde la forma oxidada, por lo tanto provee un mecanismo protector de la síntesis de NO. La síntesis de  $\text{BH}_4$  se produce a partir del enzima GTP ciclohidroxilasa (GTPCH-I). Se han encontrado niveles reducidos de GTPCH-I en hipercolesterolemia, insulinoresistencia, prehipertensión y hábito tabáquico; la administración aguda de  $\text{BH}_4$  mejora la DE. Las estatinas aumentan la transcripción génica de GTPCH-I y por último, las fuerzas de roce, a través del aumento de la actividad de GTPCH-I por fosforilación de la misma, también es capaz de aumentar los niveles de  $\text{BH}_4$ .

Los resultados emergentes de los estudios llevados a cabo en situaciones de riesgo y enfermedad cardiovascular avalan un papel primordial de la disponibilidad de  $\text{BH}_4$  en la patogenia de la DE y llevan a considerar la administración de  $\text{BH}_4$  como una posible herramienta farmacológica (2).

## **II) Aumento de la inactivación de NO**

NO y  $\text{O}_2^-$  sufren una reacción radical-radical a una velocidad tres veces mayor que la velocidad de reacción de las superóxido dismutasas (SODs), enzimas encargadas de transformar el  $\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En presencia tanto de NO como de SODs, la reacción preferencial del  $\text{O}_2^-$  es con el NO para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Dada esta rápida velocidad de reacción, siempre hay  $\text{O}_2^-$  inactivando NO tanto en las células como en el

espacio extracelular. En condiciones fisiológicas las defensas antioxidantes minimizan esta interacción y mantienen un adecuado balance entre ambas moléculas. Sin embargo, cualquier situación que aumente la concentración de  $O_2^-$ , provocará una disminución de la biodisponibilidad de NO. La degradación aumentada por las ROS se asocia con patologías como hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, tabaquismo e insuficiencia cardíaca.

Las ROS son importantes moléculas de señalización intracelular en los vasos. Sin embargo, cuando existe un desbalance entre su formación y los mecanismos antioxidantes de defensa, estas moléculas promueven alteraciones que pueden conducir a la hipertensión. La formación de ROS en los vasos resulta principalmente de la activación de enzima NADPH-oxidasa (también es formado por las mitocondrias y por la xantina-oxidasa), por lo tanto es posible que el estiramiento causado por la hipertensión incremente la formación de  $O_2^-$ . El factor común es la AGII, que aumenta su producción local en respuesta al estiramiento vascular, y es capaz de activar la NADPH-oxidasa endotelial.

La producción de  $O_2^-$  dependiente de NADPH-oxidasa puede a su vez provocar la oxidación del  $BH_4$  y el desacople de la NOSe a través de la formación de peroxinitrito, como se describió previamente, y además, activar la enzima xantina-oxidasa, aumentar la expresión de NADPH-oxidasa y deprimir la actividad de las SODs, incrementando aún más los niveles de  $O_2^-$ , la síntesis de peroxinitrito y el daño tisular. Este proceso puede potenciarse por los efectos del  $H_2O_2$  formado a partir de  $O_2^-$ . La exposición a  $H_2O_2$  inicialmente produce un aumento en la producción de NO pero con el tiempo, la exposición sostenida o repetida a  $H_2O_2$  disminuye los niveles de NO. Esta disminución puede prevenirse con inhibidores de la NADPH-oxidasa, sequestradores de ROS y la administración de  $BH_4$ , lo cual sugiere que la disfunción endotelial resulta de la oxidación de  $BH_4$  por peroxinitrito cuando el  $H_2O_2$  activa simultáneamente a NOSe y NADPH-oxidasa. El aumento de los niveles celulares de  $O_2^-$  no solo disminuye la síntesis y acelera la degradación del NO, sino que además deprime la actividad de la enzima GMPc, segundo mensajero del NO (Fig. 6). Por último, otros radicales derivados de lípidos como son el alcoxi y el hidropoxi del ácido linoleico generados por LDL-oxidada también inactivan el NO (2).

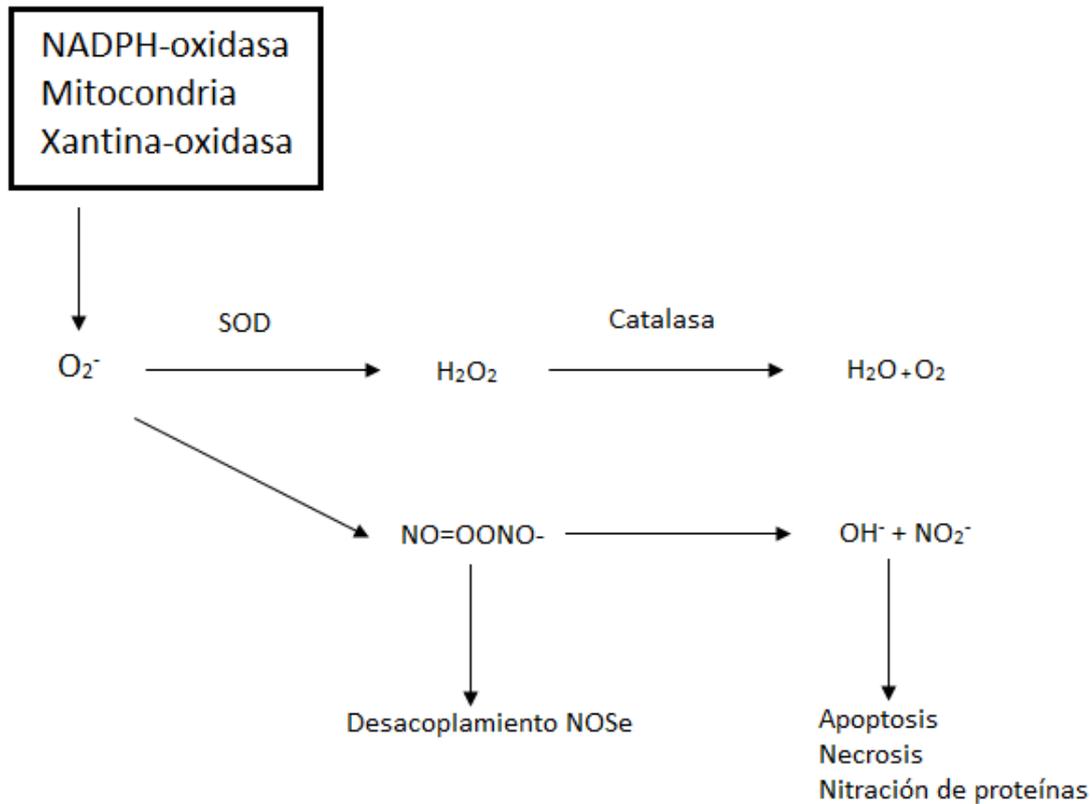


Fig. 6. Estrés oxidativo y nitro-oxidativo. El anión superóxido ( $O_2^-$ ) liberado por la NADPH-oxidasa, las mitocondrias y la xantina-oxidasa, por efecto de la superóxido dismutasa (SOD) genera peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que posteriormente es convertido en agua y oxígeno por acción de la catalasa. Sin embargo,  $O_2^-$  tiene mayor afinidad por el NO que por SOD, por lo que se combina de forma preferencial con el NO produciendo peroxinitrito, el cual produce diferentes consecuencias patológicas.

## 5. Valoración de la función endotelial

En la lucha contra las enfermedades cardiovasculares, las estrategias preventivas están pasando a ser el principal centro de interés. Una de estas estrategias propone identificar a los individuos con riesgo elevado de sufrir enfermedad cardiovascular. La valoración de la DE puede contribuir a una mejor estratificación del riesgo y la puesta en práctica de estrategias preventivas (21). La función vasodilatadora del endotelio es un reflejo de la salud del mismo. La función endotelial juega un papel crucial en la salud vascular y la DE aparece de forma temprana en la arterioesclerosis, por lo que la medición de la función endotelial es un medio importante para poder estratificar el riesgo cardiovascular, lo que resulta muy útil en la práctica clínica. La evidencia de que la DE coronaria es el primer paso hacia la arterioesclerosis ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias para llevar a cabo la valoración clínica de esta patología (22).

El estudio de la función endotelial no sólo nos permite identificar a aquellas personas susceptibles de desarrollar enfermedades cardiovasculares, sino también determinar a

aquellos que se beneficiarán de intervenciones farmacológicas y en el estilo de vida, ya que el objetivo final de la medicina es tanto medir el riesgo como ofrecer un tratamiento óptimo individualizado (23).

Dentro de los métodos de evaluación de la función endotelial, podemos clasificarlos en invasivos y no invasivos. A pesar de que los métodos invasivos mediante cateterización son considerados como la medida de referencia para la evaluación de la función coronaria endotelial, estas observaciones utilizando técnicas invasivas estimularon la búsqueda de métodos no invasivos que pudieran sustituir a la angiografía en el estudio de la DE (24).

### **5.1. Evaluación invasiva de la función endotelial**

La función endotelial coronaria ha sido ampliamente estudiada en los últimos años mediante la observación indirecta del comportamiento del endotelio ante diversos estímulos fisiológicos y farmacológicos. Uno de los más utilizados ha sido la administración de acetilcolina. La acetilcolina endógena penetra en el endotelio por vía extraluminal produciendo la apertura de los canales de calcio presentes en la membrana de las células endoteliales. Como ya sabemos, el calcio, una vez se introduce en la célula endotelial, se une a la calmodulina estimulando así a la NOSe que sintetiza NO, que actúa finalmente sobre la musculatura lisa produciendo una vasodilatación. Cuando la acetilcolina se administra de forma exógena por vía intraluminal, su mecanismo de acción depende del efecto neto de esta sustancia sobre la musculatura lisa. Cuando el endotelio está intacto, su acción final es la de producir vasodilatación por medio de la liberación de NO; sin embargo, cuando el endotelio se lesiona, la acetilcolina actúa directamente sobre los receptores muscarínicos del músculo liso y produce vasoconstricción; así, los vasos ateroscleróticos con un deterioro de la función endotelial responden con vasoconstricción como consecuencia de un efecto directo de la acetilcolina en el músculo liso vascular (efecto muscarínico) en ausencia de liberación de NO. Este mecanismo se conoce con el nombre de “vasoconstricción paradójica” y puede considerarse un signo de DE, particularmente en relación con la modulación del tono vascular (24).

Los primeros estudios se llevaron a cabo de forma invasiva en la circulación coronaria. Este método consistía en la infusión intracoronaria de acetilcolina (u otras sustancias vasodilatadoras), y la posterior medición cuantitativa del diámetro del vaso utilizando la angiografía coronaria. Sin embargo, la utilidad de este método se ve limitada por su naturaleza invasiva, y por lo tanto en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas para evaluar la DE de forma no invasiva (1,21).

### **5.2. Evaluación no invasiva de la función endotelial**

Dado que la DE es un proceso sistémico que afecta simultáneamente a diferentes territorios vasculares, se acepta que los métodos no invasivos de evaluación de la función endotelial en los vasos periféricos, aunque sea de forma indirecta, son representativos de la función vascular coronaria. La mayor parte de las técnicas actualmente disponibles utilizan la vasomotilidad dependiente del endotelio como parámetro de valoración clínica para el estudio de la función endotelial. Las pruebas se basan en una estimulación farmacológica o fisiológica de la liberación endotelial de NO y otros compuestos vasoactivos, y a menudo en la comparación de las respuestas

vasculares a sustancias dilatadoras independientes del endotelio como la nitroglicerina. La determinación de la biodisponibilidad local de NO no sólo refleja su influencia en el tono vascular, sino también otras funciones importantes de esta molécula, como son la tromborregulación, la adhesión celular y la proliferación (21).

### **5.2.1. Vasodilatación mediada por flujo de la arteria humeral**

En 1992 Celermajer et al utilizaron por primera vez un método no invasivo para la evaluación de la DE en arterias periféricas basado en el uso de ultrasonidos. Esta técnica consistía en observar, por medio de ultrasonidos de alta resolución, los cambios de diámetro que se producen en la arteria braquial como respuesta a un estímulo que, en condiciones fisiológicas, produce un aumento de la liberación de NO (24). En esta prueba se induce isquemia colocando un manguito de presión en el antebrazo durante 5 minutos lo que provoca la oclusión temporal de la arteria humeral. Al deshinchar el manguito, el aumento del flujo da lugar a una fuerza tangencial que activa la NOSe con la consiguiente liberación de NO y vasodilatación; esto se produce cuando el flujo sanguíneo del antebrazo aumenta durante la hiperemia reactiva que sigue al breve período de isquemia transitoria en los territorios distales. Por medio del ultrasonido se mide el porcentaje de cambio del diámetro de la arteria entre la situación basal y el aumento máximo del diámetro (21). Posteriormente se administra nitroglicerina y se vuelve a medir el diámetro arterial. En arterias sanas, el incremento de flujo tras la oclusión produce una dilatación de los vasos por acción del NO liberado por el endotelio (“vasodilatación endotelio-dependiente”). Sin embargo, en presencia de DE, este mecanismo falla. La respuesta vascular de vasodilatación a la nitroglicerina es “endotelio-independiente”, ya que ésta tiene una acción directa sobre el músculo liso y, por tanto, su acción no se ve afectada por la presencia de DE.

Mediante este método, Celermajer et al demostraron que la DE está presente en sujetos jóvenes con alto riesgo de padecer aterosclerosis, incluso antes de que exista otra evidencia clínica de ella (24). Esta técnica también es útil en prevención secundaria, ya que aporta información pronóstica a largo plazo tanto en pacientes con enfermedad vascular periférica como en los que presentan un síndrome coronario agudo, así como información pronóstica a corto plazo en los pacientes a los que se practican intervenciones de cirugía vascular (21).

### **5.2.2. Velocidad de onda de pulso (VOP)**

La función endotelial desempeña un papel importante en la rigidez arterial. La rigidez arterial se considera como un marcador biológico cada vez más importante en la valoración del riesgo cardiovascular y en la detección de enfermedad vascular incipiente. De hecho ha demostrado ser un factor predictor independiente de mortalidad cardiovascular en población general, anciana, hipertensa, diabética y en pacientes afectados de insuficiencia renal crónica (25). Todos los factores que reducen la distensibilidad del vaso sanguíneo, entre ellos los factores de riesgo ateroscleróticos que causan un remodelado vascular que conduce a la rigidez arterial, dan lugar a una velocidad de onda de pulso (VOP) más alta; mientras que las arterias elásticas, con mayor distensibilidad y sin lesiones fibrosas o ateromatosas, reducen esa velocidad. La

VOP depende del módulo de elasticidad arterial, el espesor y diámetro parietal y la densidad de la sangre (26).

La VOP aórtica suele medirse entre la arteria carótida y la femoral mediante la detección sincrónica de la llegada de la onda a ambas localizaciones y determinando la distancia entre ellas (21). La distancia es un parámetro fijo, pero el tiempo de tránsito (tiempo entre el inicio de las ondas de pulso en cada localización) tiene cierta variabilidad, debido a distintos factores como el ritmo o la conducción cardíaca. Es por ello que en la mayoría de los métodos se calcula la media de varias determinaciones de tiempo (25).

La forma de la onda de presión en cualquier arteria, parámetro que también está relacionado con la VOP, es el resultado de la suma de la transmisión anterógrada del impulso de presión cardíaco y un reflejo retrógrado generado por el sistema vascular periférico en la interfase entre las arterias grandes y los vasos de resistencia (arterias y arteriolas). La onda de presión se desplaza a una velocidad tan alta que se refleja en dirección a las arterias centrales durante el mismo ciclo de eyección, solapándose con parte de la onda anterógrada. Como consecuencia de esto, la presión que se registra en cualquier punto del sistema arterial resulta de la suma de la onda anterógrada y la onda reflejada, y depende de tres factores: la amplitud y la duración de la eyección ventricular, la amplitud de la onda reflejada y la VOP.

La tonometría de aplanamiento es un método que permite obtener los datos de presión respecto al tiempo en diferentes arterias, como las radiales, las femorales o las carótidas, y aplicando una función de transferencia integral validada, podemos obtener la forma de onda aórtica central. Concretamente, se puede inferir las presiones centrales y calcular el índice de potenciación (21) (porcentaje de la presión de pulso central atribuible al aumento secundario de la presión sistólica producido por la superposición de las presiones de onda anterógrada y reflejada) (27) como indicador de la rigidez arterial. Utilizando el electrocardiograma como referencia temporal, se puede comparar las lecturas de arterias de diferentes localizaciones con la VOP medida (21).

La tonometría de aplanamiento de la arteria radial, a diferencia de la tonometría de la arteria carótida o femoral, es más fácil de utilizar en el ámbito clínico y causa menos molestias al paciente. La tonometría radial se realiza colocando un tonómetro manual (sensor de presión con calibrador de tensión) sobre la arteria radial y aplicando una leve presión para aplanar parcialmente la arteria. La presión de la arteria radial se transmite entonces del vaso al sensor y se registra digitalmente (21).

En un estudio llevado a cabo sobre pacientes normotensos e hipertensos se investigó la función endotelial a través de las variaciones de la velocidad de la onda de pulso carótido-radial pre y postinducción de isquemia braquial. Como ya hemos mencionado anteriormente, en la vasodilatación mediada por flujo (VMF) se utilizan técnicas que inducen isquemia y una posterior hiperemia reactiva, tras la liberación del flujo, que produce la liberación de NO conduciendo, en condiciones normales, a la vasodilatación. Este aumento del diámetro arterial tras la VMF dependiente del endotelio se acompaña de un descenso de la VOP, que puede medirse mediante el uso

de ultrasonidos o con tonometría computarizada. En el estudio se comprobó que los individuos normotensos o aquellos con arterias no dañadas responden a la isquemia inducida con descenso de la VOP, mientras que los pacientes hipertensos no responden con tal descenso o su respuesta es paradójica, con aumento de la VOP. También se observó que no siempre una mayor rigidez aórtica se acompaña de DE demostrable por la vasodilatación mediada por flujo y viceversa. Esto se explica por la diferente composición estructural de la pared arterial de los distintos territorios estudiados. Los resultados de ambas formas de medir la VOP, ya sea para determinar la rigidez aórtica central o la vasodilatación mediada por flujo, son estimaciones de riesgo independientes y complementarias. Por lo tanto, la VOP carótido-radial pre-inducción y post-inducción de isquemia constituye un nuevo método de evaluación de la VMF y por ende, una herramienta sencilla para evaluar la función endotelial (26).

Otro método empleado recientemente para evaluar la rigidez arterial ha sido la resonancia magnética (RM). A diferencia de la VOP, que es una medida media de la rigidez arterial general, la RM permite detectar cambios más sutiles en la rigidez regional. Además, se pueden obtener datos de velocidad de manera simultánea en dos localizaciones aórticas y medir con precisión la distancia entre ellas.

### **5.2.3. Pletismografía digital**

En 1937, Alrick Hertzman desarrolló una pletismografía fotoeléctrica que aprovechaba el hecho de que la absorción de la luz por un tejido transiluminado variaba en función de su contenido en sangre. No está claro a qué corresponde realmente el pulso fotopletismográfico en diferentes localizaciones corporales, pero el componente continuo se atribuye a la absorción de la luz por el tejido y el volumen de sangre fijo, y el componente pulsátil se atribuye a los cambios del volumen sanguíneo durante el ciclo cardíaco. La fotopletismografía, una vez calibrada con una determinación de la presión arterial, puede utilizarse en el dedo de la mano para obtener la monitorización continua de la presión arterial dactilar.

Recientemente se ha introducido una nueva técnica que emplea un manguito de pletismografía neumática para el dedo de la mano proporcionando un nuevo método para evaluar el volumen del flujo sanguíneo de latido a latido mediante el registro de los cambios del volumen pulsátil arterial en el dedo (EndoPAT). Para valorar la función endotelial, se compara el flujo sanguíneo post-isquémico con el flujo sanguíneo basal. La técnica consiste en monitorizar un dedo de cada mano y colocar un manguito de presión en la parte superior de uno de los brazos que produce una isquemia transitoria. El otro brazo se utiliza como control. Primero se mide el flujo basal y posteriormente se hincha el manguito por encima de la presión sistólica durante 5 minutos para inducir hiperemia reactiva postisquémica. El índice calculado entre el flujo del brazo con hiperemia reactiva y el brazo de control es una medida de la función endotelial (21). Al igual que otras técnicas utilizadas para valorar la disfunción endotelial, el EndoPAT se ha correlacionado con múltiples factores de riesgo cardiovasculares. Se ha demostrado una relación inversa entre el índice de hiperemia reactiva (RHI) y el sexo masculino, el índice de masa corporal, el perímetro de cintura, el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, la diabetes mellitus, el

tabaquismo, la hipertensión y antecedentes familiares de enfermedad coronaria. El RHI en pacientes sin enfermedad obstructiva de las arterias coronarias pero con una reserva de flujo coronario reducida (CFR) es el índice entre el incremento máximo del flujo sanguíneo coronario y su valor en reposo, que depende de la función de los vasos de baja resistencia. Un valor de CFR menor de 2 sugiere una disfunción microvascular, que es menor que en aquellos pacientes con valores normales de CFR, lo que sugiere que este método no invasivo podría ser utilizado para evaluar los estadios iniciales de la aterosclerosis coronaria (28).

#### **5.2.4. Marcadores circulantes de función endotelial**

Un gran número de marcadores se han identificado y usado como indicadores de disfunción endotelial (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1, IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , factor de von Willebrand, activador del plasminógeno, microalbuminuria, test de apoptosis), sin embargo muchos de ellos son inespecíficos, por lo que solo algunos pueden ser utilizados en la práctica clínica representando una prueba complementaria en el estudio de la función endotelial.

##### **5.2.4.1. ADMA**

Recientemente, ha emergido un nuevo y prometedor marcador de disfunción endotelial. La ADMA, como se ha descrito anteriormente, es un mediador sintetizado de forma endógena por arte de la arginina metiltransferasa a partir de residuos de arginina metilados que inhibe a la NOSe, produciendo una disminución en la producción de NO. La ADMA es degradada por la DDAH. Se ha visto que la DDAH disminuye, permitiendo así mantener niveles elevados de ADMA, en pacientes con dislipemia, hipertensión y enfermedad aterosclerótica, lo que sugiere la utilización de ADMA como un indicador útil del estado endotelial y como un marcador potencial de riesgo cardiovascular en la práctica clínica (1,3).

##### **5.2.4.2. Disminución de la biodisponibilidad de NO**

La reducción de la producción o biodisponibilidad del NO derivado del endotelio representa un parámetro medible sugestivo del desarrollo de disfunción endotelial. Los estudios de laboratorio utilizan a menudo una medición indirecta del NO basada en la determinación de los productos derivados del metabolismo del NO, como el óxido de nitrógeno o los productos estables de degradación del NO como son nitritos y nitratos, para confirmar la disfunción endotelial. Sin embargo, son difíciles de medir y muchas veces no representan la producción endotelial de NO.

##### **5.2.4.3. Células endoteliales y micropartículas circulantes**

Las células endoteliales circulantes son células maduras que se han desprendido del endotelio. Representan un biomarcador novedoso del daño endotelial. En sujetos sanos, el endotelio está en constante renovación con una tasa de replicación inferior al 1% y los niveles de células endoteliales circulantes son muy bajos. Los mecanismos potenciales que subyacen el desprendimiento de las células endoteliales pueden ser el daño mecánico, la acción de proteasas y/o citoquinas, una adhesión defectuosa de las células endoteliales a la matriz extracelular, apoptosis celular, y los efectos perjudiciales de los factores de riesgo cardiovasculares. Niveles aumentados de células

endoteliales circulantes se correlacionan con DE, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades.

Otros marcadores celulares circulantes de daño endotelial incluyen las micropartículas endoteliales que son pequeñas vesículas de membrana que se liberan a la circulación por células activadas o apoptóticas. Se ha visto que pacientes hipertensos y con enfermedad coronaria presentan niveles altos de estas micropartículas.

#### **5.2.4.4. Progenitores de células endoteliales**

Los progenitores de células endoteliales (EPC) son células inmaduras que tienen la capacidad de proliferar, migrar y diferenciarse en células de estirpe endotelial, pero que todavía no han adquirido las características de las células endoteliales maduras. Constituyen solamente el 1-5% del total de células de la médula ósea y menos del 0.0001-0.01% de las células mononucleares de la circulación periférica. Las EPC derivados de la médula ósea juegan un papel integral en la regulación y protección del endotelio así como en la formación de nuevos vasos. Estas EPC fueron identificadas por primera vez por Asahara et al en 1997 determinándose que compartían con las células madre hematopoyéticas un precursor común, los hemangioblastos, y muchos antígenos de superficie. A la hora de identificar las EPC, no hay un único marcador de superficie disponible para su detección, por lo que la teoría más aceptada es la co-expresión de los marcadores de superficie CD133, CD34 y VEGFR2 (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular). Aunque estos marcadores no son específicos de las EPC, su combinación permite caracterizar un progenitor celular específico en un estado de maduración concreto (29).

CD34 (cúmulo de diferenciación 34) fue el primer marcador utilizado para definir las EPC. Su expresión determina el estado de madurez de la célula, y a medida que esta se va diferenciando va perdiendo intensidad. La principal función de CD34 es la adhesión intercelular actuando como ligando de la E-selectina, y con una capacidad para regular la fuerza de unión de las células endoteliales a las células adyacentes. Pero previo a su descubrimiento como marcador de las EPC, CD34 ya se usaba, desde 1980, para identificar células madre y progenitores hematopoyéticos derivados de la médula ósea.

La prominina 1, o CD133 es una proteína transmembrana presente en un 20-60% de las células que expresan CD34, tanto en la médula ósea como en la sangre, pero que no aparece en células endoteliales maduras. CD133 tiene la capacidad de regular la composición lipídica de la membrana celular.

VEGFR2, por otro lado, es un receptor tirosin-quinasa para VEGF que, inicialmente, fue identificado en células involucrada en la vasculogénesis y en células con potencial para diferenciarse en células endoteliales maduras. La presencia de este marcador es crítica para que la célula endotelial lleve a cabo sus funciones, incluyendo la maduración y la migración celular.

El valor de las EPC como biomarcador de severidad de la enfermedad, pronóstico y respuesta al tratamiento ha sido el centro de atención de numerosas investigaciones. Se ha visto que en pacientes con alto riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, incluidos aquellos con comorbilidades como diabetes mellitus, hipertensión sistémica y

enfermedad crónica renal, el recuento de EPC en la circulación periférica es bajo a la vez que la función de las EPC presentes está alterada. Sin embargo, en situaciones de hipoxia aguda y daño vascular, como ocurre en el infarto agudo de miocardio o en la angina inestable, se produce un aumento de EPC, lo que sugiere una movilización de las mismas durante estos episodios de isquemia aguda. Esto se produce por una estimulación local del VEGF, que se eleva en respuesta al daño vascular agudo, produciendo un reclutamiento de EPC hacia el sitio de la lesión. Este intento de las EPC de mantener la viabilidad de las células endoteliales presentes y de reemplazar las muertas, desencadena un proceso de neovascularización. Sin embargo, si la hipoxia y el daño vascular progresan, la producción de VEGF en el sitio de la lesión cae y la médula ósea no es capaz de mantener una producción adecuada de EPC. Por lo tanto, niveles altos de EPC circulantes podrían indicar estadios tempranos de enfermedad cardiovascular y arterial periférica, mientras que niveles bajos de EPC indican estadios más severos y avanzados de la enfermedad, y se asocian con un peor pronóstico.

Estos cambios en el número y la función de las EPC que se producen en la enfermedad cardiovascular permiten su uso como biomarcadores. En estudios clínicos, los descensos que se producen en el número de EPC circulantes y en la capacidad funcional de estas EPC, han servido para predecir futuros eventos cardiovasculares (30).

#### **5.2.4.5. Endocan: un innovador proteoglicano circulante**

En 1996, Lassalle et al hablaron por primera vez de una nueva molécula específica de la célula endotelial (ESM, siglas en inglés) codificada por un gen presente en el brazo largo del cromosoma 5 que estaba implicado en la biología de las células vasculares, la inflamación y la fisiología pulmonar. Esta molécula inicialmente recibió el nombre de ESM-1. Sin embargo, estudios posteriores confirmaron que esta molécula pertenecía a la familia de los proteoglicanos (PGs) por lo que finalmente pasó a llamarse endocan.

Los PGs son proteínas formadas por cadenas de glucosaminoglicanos unidas covalentemente al núcleo proteico. Se han encontrado muchos tipos de PGs en la matriz extracelular de tejidos conectivos cuya función principal es conferir soporte estructural. El endocan es un PG secretado por el endotelio vascular, tanto en situaciones fisiológicas como en presencia de enfermedad, que está implicado en un gran número de interacciones moleculares y que es esencial para regular los procesos biológicos de adhesión celular, migración, proliferación y neovascularización. El hecho de ser una molécula circulante soluble, diferencia al endocan del resto de PGs que, como ya hemos dicho, son componentes de la matriz extracelular encargados de mantener el soporte estructural de las células. Estudios recientes sugieren que el endocan puede jugar un papel importante en la inflamación, la cicatrización y en la tumorigénesis. El endocan puede ser detectado en la circulación y es un indicador de angiogénesis y de activación de la célula endotelial (31).

Un grupo de células especializadas conocidas como "*tip cells*" importantes para el crecimiento y desarrollo de los vasos sanguíneos, actúan como sensor y median el crecimiento vascular. El endocan se expresa de forma preferente en este tipo de células, lo que sugiere que juega un papel en la patogénesis de las alteraciones vasculares, la inflamación y en la DE.

La adhesión endotelial y la migración en los tejidos está mediado por moléculas de adhesión expresadas en células endoteliales activadas y sus ligandos presentes en los leucocitos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que juega un papel crucial en la angiogénesis gracias a su capacidad para inducir permeabilidad vascular, y para mantener la supervivencia y la división de las células endoteliales. El endocan afecta a las células endoteliales al facilitar la acción de VEGF-A sobre su receptor, VEGFR-2, lo que desencadena la permeabilidad endotelial. Este proteoglicano actúa también sobre componentes que proveen los sustratos esenciales para el reclutamiento, la adhesión y la migración de leucocitos a través del endotelio vascular activado, como es el caso de las quimiocinas liberadas por neutrófilos y monocitos: interleuquina-8 y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1). Endocan, además, se une a la integrina LFA-1 presente en los leucocitos, que previene posteriormente la unión específica de ICAM-1 a LFA-1. La inhibición de esta unión puede estimular el reclutamiento de las células mononucleares circulantes al sitio de la inflamación y la migración y adhesión celular dependiente de LFA-1. Por lo tanto, el endocan es capaz de mejorar la producción por parte de las células endoteliales de citoquinas proinflamatorias, de aumentar la permeabilidad microvascular y de regular la migración leucocitaria.

Los niveles séricos del endocan actúan como marcadores de distintos procesos patológicos como es el cáncer, la inflamación sistémica y las enfermedades cardiovasculares, y según recientes estudios, también actúa como marcador de disfunción endotelial. El endocan es secretado por las células endoteliales vasculares, especialmente por el endotelio inflamado y se ha sugerido su papel en la estimulación de la proliferación y migración de las CML vasculares, lo que puede contribuir a la formación de neointima durante el proceso de aterosclerosis. La inmunohistoquímica ha demostrado que el endocan se expresa altamente en estas lesiones (32). Cuando se produce un daño vascular, como ocurre en la presencia de placas ateroscleróticas, el endotelio se activa aumentando mucho la expresión de endocan; mientras que en condiciones de inactividad de las células endoteliales, se detectan niveles bajos de este PG (31). En un estudio llevado a cabo en pacientes con hipertensión arterial esencial no tratada, se vio que los niveles séricos de endocan eran significativamente más altos en los pacientes hipertensos que en el grupo control. También se ha descrito que antihipertensivos como amlodipino y valsartan son capaces de disminuir los niveles del mismo, lo que sugeriría una inactivación del endotelio con reducción de la presión sanguínea y un descenso de la adherencia de leucocitos circulantes al endotelio, que conducía a un menor riesgo de desarrollar aterosclerosis. Otro estudio llevado a cabo en pacientes diabéticos con síndrome coronario agudo demostró que en estos pacientes los niveles de endocan también se encuentran aumentados, lo que podría ser indicativo de daños vasculares más severos. También se han encontrado niveles elevados de este PG en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) y que se relacionan de manera inversamente proporcional al filtrado glomerular.

Otras patologías que se han relacionado con niveles aumentados de endocan son el síndrome de apnea-hipopnea durante el sueño (OSA), la enfermedad de Behçet, la psoriasis vulgar, el síndrome de distrés respiratorio agudo, la trombosis venosa profunda y la sepsis, en la que los cambios que ocurren en la microvasculatura que afectan a las células endoteliales, sean probablemente los causantes de la disfunción

multiorgánica. En todos estos casos, los niveles de endocan se correlacionan con el riesgo cardiovascular y la actividad de la enfermedad.

En resumen, el endocan constituye un novedoso marcador inflamatorio en pacientes con aterosclerosis que también puede ser un buen predictor de eventos cardiovasculares. La medición de los niveles de endocan aporta cierta luz en los efectos del tratamiento sobre el endotelio, y mediciones seriadas en un mismo paciente reflejan el alcance de los beneficios derivados de la administración del tratamiento. Sin embargo, todavía son necesarias más investigaciones (32).

#### **5.2.5. Espectroscopia Raman como técnica innovadora para la detección de DE**

La espectroscopia de absorción infrarroja y la espectroscopia Raman son dos métodos clásicos que investigan la vibración molecular con el fin de aportar información de su estructura química. La espectroscopia de absorción infrarroja y la espectroscopia Raman se basan en diferentes fenómenos físicos. El primero se basa en la absorción de la luz, y el segundo en la dispersión de la luz. La imagen obtenida por la espectroscopia Raman puede ser asociada con un microscopio óptico que transfiere tanto la luz incidente como la luz dispersa de Raman. Esta técnica recibe el nombre de “microscopio Raman”. El microscopio Raman tiene varias ventajas: aporta información de múltiples muestras de forma simultánea, es altamente específico y selectivo, no destructivo y no necesita preparaciones o etiquetados especiales de la muestra. Además, su poder de resolución es muy alto. Todo esto hace que el microscopio Raman sea una técnica perfecta para analizar *in situ* los componentes y los procesos bioquímicos que ocurren en células y tejidos. En el estudio de las enfermedades vasculares se ha centrado de manera importante en el estudio de la disfunción endotelial.

La diabetes de larga duración conduce a cambios estructurales y funcionales en la microvasculatura y la macrovasculatura, particularmente en el endotelio. La combinación de Raman y el microscopio de fuerza atómica (MFA), ha permitido la caracterización de las estructuras subcelulares de los tejidos y la correlación directa de su estructura química (Raman) y sus propiedades físicas (MFA). Se han observado grandes diferencias en las imágenes obtenidas por Raman y MFA de muestras de aorta obtenidas de pacientes con diabetes y otras sin diabetes, en relación a la presencia de agrupaciones de bolsas lipídicas, cuyo número aumenta de forma drástica en aquellas muestras procedentes de individuos enfermos. El aumento del contenido lipídico a nivel celular es el responsable de la formación de estas agrupaciones de lípidos en las células endoteliales, y está estimulado por el desarrollo de diabetes. Esto puede ser confirmado gracias a dos características importantes de la microscopia Raman: una alta resolución espacial y la posibilidad de caracterizar químicamente la muestra estudiada.

La hipertensión, cuyo desarrollo está relacionado con alteraciones en la producción de NO y una menor disponibilidad del mismo, tiene un efecto importante a nivel de la túnica íntima (endotelio junto con la lámina elástica interna) y la túnica media (CML y fibras elásticas). Se ha comprobado que las imágenes obtenidas por microscopia Raman aportan resultados similares que el método estándar de referencia, la inmunohistoquímica. Ambos permiten la visualización de los componentes vasculares, como el endotelio y las fibras elásticas en secciones de la aorta. La microscopia Raman puede ser utilizado también para determinar las diferencias bioquímicas principales entre un endotelio sano y un endotelio deficiente en NO.

La proporción de lípidos y proteínas en el endotelio parece un marcador perfecto de patologías relacionadas con el metabolismo que afectan al endotelio, como son la aterosclerosis, la diabetes y la hipertensión. Este marcador puede ser determinado fácilmente mediante métodos de espectroscopia vibracional. De hecho, tanto Raman como la absorción infrarroja se han utilizado de manera satisfactoria en el estudio del estado endotelial en presencia de aterosclerosis. Por lo tanto, el empleo de la espectroscopia vibracional nos permite detectar, tanto *ex vivo* como *in vivo*, alteraciones de la función endotelial. Esta técnica nos permite identificar y seguir los cambios bioquímicos que aparecen en los tejidos, los cuales se producen de forma paralela al desarrollo de las enfermedades. Gracias a la alta resolución de las imágenes obtenidos por microscopia Raman, es posible el análisis de niveles subcelulares, así como estudios de tratamiento farmacológico.

Hay distintas técnicas de espectroscopia Raman cuya aplicación parece muy prometedora. La resolución espacial de las mediciones puede ser aumentada con la ayuda de TERS (Tip-enhanced Raman Spectroscopy), un tipo de espectroscopia Raman mejorada, que permite el estudio directo del DNA celular. La combinación de TERS con MFA aporta una nueva forma de visualizar y caracterizar las organelas subcelulares y los cambios bioquímicos que ocurren en las células.

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad de las mediciones también se utiliza la espectroscopia de resonancia magnética nuclear, que nos permite medir la intensidad con la que ocurre la fosforilación y la S-nitrosilación de NOS. Esta información puede ser utilizada para estudiar los cambios que ocurren en la geometría del grupo hemo, y por consiguiente, el potencial redox del hierro hemo.

Para aplicaciones más específicas, otro método de elección es la espectroscopia de actividad óptica Raman (ROA). Esta técnica permite el estudio de las estructuras moleculares de fármacos quirales y de biomoléculas en solución. Además, las exitosas mediciones de ROA del plasma sanguíneo y del DNA, demuestran que esta técnica es capaz de detectar cambios estereoquímicos y conformacionales sutiles en las estructuras secundaria y terciaria de las biomoléculas. Estas anomalías son consecuencia de procesos patológicos que ocurren durante el desarrollo de distintas

enfermedades, lo que sugiere un potencial uso de esta técnica en aplicaciones clínicas (33).

## **6. Terapias anti-disfunción endotelial**

El tratamiento de la DE tiene como finalidad preservar o restablecer la función endotelial, por lo que es importante intervenir en los mecanismos patogénicos que conducen a la DE en los estadios más tempranos posibles y disminuir la progresión de la aterosclerosis. Aunque los factores de riesgo subyacentes o la severidad de la enfermedad puedan ser diferentes, comparten muchos mecanismos patogénicos que aceleran la aterosclerosis. Estos factores se asocian comúnmente con la activación de vías inflamatorias y con la disminución de la actividad del NO. Además, la activación y el aumento de la producción de factores vasoconstrictores derivados del endotelio como la endotelina-1 y la angiotensina-II, alterarían la función del endotelio conduciendo a un estado protrombótico. Por consiguiente, las terapias destinadas a mejorar la función endotelial tienen efectos beneficiosos en numerosos niveles celulares con el fin de impedir la progresión de la aterosclerosis.

La terapia endotelial se puede clasificar como terapia primaria, destinada a pacientes sin enfermedad cardiovascular; y terapia secundaria, que mejora la homeostasis en la disfunción endotelial mediante el tratamiento y la mejora de los factores de riesgo cardiovasculares subyacentes o de la enfermedad cardiovascular ya establecida.



Fig. 7. Aproximaciones terapéuticas de la disfunción endotelial. PAOD: enfermedad arterial oclusiva periférica.

## 6.1. Terapia endotelial primaria: Modificación de los factores de riesgo cardiovascular

La terapia endotelial primaria está encaminada a preservar y mejorar la función endotelial en sujetos sin factores de riesgo CV. La principal meta de esta aproximación terapéutica es la prevención de los factores de riesgo CV mediante la realización de modificaciones óptimas en el estilo de vida, como el control de la dieta, el ejercicio físico, el control del peso y el cese del hábito tabáquico.

### 6.1.1. Ejercicio físico

Estudios recientes han aportado evidencias claras de que la actividad física mejora la función endotelial, no solamente en sujetos sanos, sino también en aquellos con alto riesgo cardiovascular. (Aumentos del flujo sanguíneo durante el ejercicio incrementan la tensión tangencial en la pared vascular, generando un aumento en la liberación de NO (34). Se ha demostrado que el ejercicio físico también mejora la función endotelial en personas mayores, pacientes obesos, mujeres postmenopáusicas y pacientes con dislipemia, así como en pacientes afectados de enfermedad coronario y fallo cardíaco. En pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva severa, se ha demostrado que en el

grupo sometido a 4 semanas de ejercicio físico diario se producía una mejora significativa de la función endotelial con respecto al grupo control.

### **6.1.2. Reducción del peso corporal**

Se ha visto que la función endotelial es capaz de recuperarse cuando los pacientes obesos con enfermedad coronaria pierden peso. Estudios intervencionistas a corto y largo plazo han demostrado que sujetos obesos que perdieron un 10% o más de su peso corporal presentaban una mejora significativa de la función endotelial medida a través de la vasodilatación mediada por flujo (VMF) de la arteria braquial. También se ha visto que en sujetos obesos tratados médicamente o mediante un bypass gástrico, la pérdida de peso mejoraba la función endotelial y se correlacionaba con niveles más bajos de glucosa en ayuno. Estos datos demuestran que la pérdida de peso en sujetos con marcada obesidad mejoraba tanto la función endotelial como el control de la glucemia, lo cual contribuye al beneficio cardiovascular. Se cree que esta mejora de la función endotelial se debe a mejoras en los factores de riesgo CV implicados, sin embargo, descensos en las citoquinas circulantes, especialmente citoquinas inflamatorias liberadas por la grasa visceral, parecen también tener un papel en esta mejora (34).

### **6.1.3. Cese del hábito tabáquico**

La disfunción vascular inducida por el tabaco se desencadena por una disminución de la biodisponibilidad de NO y por el incremento de la expresión de moléculas de adhesión. Sin embargo, se vio que esta disminución de la dilatación dependiente del endotelio era reversible si se cesaba el consumo de tabaco. Asimismo, en fumadores pasivos también se ha visto una afectación del endotelio que se revierte una vez cesa la exposición.

### **6.1.4. Control de la dieta**

La dieta juega un papel importante en la modulación de la aterosclerosis y se asocia con cambios en la función endotelial, que parece estar muy relacionado con los procesos inflamatorios. En un estudio en el que se compararon dos grupos sometidos a patrones dietéticos distintos (grupo A: altas ingestas de frutas, vegetales, pescado, carne y cereales; grupo B: altas ingestas de carnes rojas y procesadas, dulces, postres, patatas fritas y cereales refinados) se vio que en el grupo A, los niveles de proteína C reactiva, ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina (marcadores séricos de inflamación y disfunción endotelial) eran significativamente más bajos que en el grupo B. También se ha visto que la dieta mediterránea, que consta de pescado, vegetales, frutas y aceite de oliva, es capaz de reducir los eventos cardiovasculares, mediante la mejora de la función endotelial y la disminución de los marcadores de inflamación.

Otro factor desfavorecedor de la función endotelial es la ingesta de sal. El sodio eleva la presión arterial, y en aquellos casos de hipertensión dependiente de la sal, la disfunción endotelial es notable (34).

## **6.2. Terapia endotelial secundaria: Control de la progresión de la enfermedad cardiovascular**

El objetivo de este tipo de terapia es la de preservar la función de un endotelio ya dañado para retrasar la progresión de la aterosclerosis. La terapia secundaria puede aplicarse tanto a condiciones modificables (hipertensión, obesidad, diabetes, dislipemia) como a los aspectos no modificables de la persona (edad, menopausia, enfermedad arterial coronaria o periférica, insuficiencia cardíaca, estadios finales de la enfermedad renal). El tratamiento farmacológico ha demostrado tener efectos en las condiciones subyacentes a la enfermedad así como en la recuperación de la función endotelial. Algunos de estos fármacos mejoran la función endotelial, y en determinadas circunstancias reducen el riesgo de la enfermedad cardiovascular.

Durante décadas, la intervención farmacológica en enfermedades ateroscleróticas ha avanzado de forma dramática. Aunque muchos ensayos clínicos han sugerido que algunos tipos de intervenciones farmacológicas son efectivas en la prevención de la progresión de la aterosclerosis, es difícil el manejo clínico de esta enfermedad ya que no hay un método claro para prevenir o mejorar todo el lecho vascular. Por tanto, una aproximación individualizada con evaluaciones extensas de la salud vascular mediante el uso de test que valoren la función endotelial, parece ser una medida beneficiosa para asegurar un tratamiento individualizado acorde a las características específicas de la aterosclerosis en un paciente dado. Los principales fármacos utilizados son:

### **6.2.1. Estatinas**

Las estatinas (inhibidores de HMG CoA reductasa) son fármacos hipocolesterolémicos que, como se ha demostrado en numerosos estudios clínicos, impiden el inicio de la cardiopatía isquémica y el infarto cerebral. El uso de estatinas en la prevención de la enfermedad aterosclerótica tiene efectos beneficiosos sobre la función endotelial. Se sabe que la administración de estatinas durante 6 meses es capaz de mejorar la vasodilatación dependiente del endotelio en arterias coronarias o arterias del antebrazo en pacientes con hipercolesterolemia. El mecanismo por el que las estatinas mejoran la función endotelial parece ser independiente de su efecto en la disminución de los lípidos, por lo que se considera un efecto pleiotrópico. Sin embargo, el empleo de colestiraminas o de flebotomías que eliminan el exceso de LDL de la sangre, también mejoran la función endotelial, por consiguiente la mejora de la función del endotelio también tiene que deberse a los efectos del fármaco en la reducción del colesterol. Las estatinas son capaces de aumentar la expresión de NOSe y reducir la endotelina-1. El aumento en la liberación de NO producido por las estatinas se produce por la activación de la vía PI3-K/Akt, descensos en caveolina-1, estimulación

de la interacción entre NOSe y Hsp90, estabilización del mRNA de NOSe, y descensos en la adhesión molecular. Además, las estatinas aumentan el número de células endoteliales progenitoras (EPC) en pacientes con enfermedad coronaria o insuficiencia cardíaca. Sin embargo, esta acción sobre las EPC no se observa cuando la enzima NOS no funciona, lo que sugiere que esto solamente ocurre como consecuencia del efecto elevador de la producción de NO de las estatinas (34).

Se ha demostrado que el tratamiento con una estatina, la simvastatina, producía una reducción significativa de los marcadores de disfunción endotelial, inflamación, estrés oxidativo y de la apoptosis de las células endoteliales. Por lo tanto, el efecto beneficioso de las estatinas en la función endotelial a nivel coronario y periférico, reside en sus propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes. Se ha visto que el inicio temprano del tratamiento con estatinas es capaz de mejorar la función endotelial, no solo en pacientes con síndrome coronario agudo, sino también en pacientes con enfermedad arterial coronaria estable.

### **6.2.2. Inhibidores del sistema renina-angiotensina**

Los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECAs) y los antagonistas del receptor de la angiotensina II (ARA-II) son fármacos bien establecidos para la prevención de eventos cardiovasculares. Numerosos estudios han descrito una mejora importante de la función endotelial tras la administración de IECAs, mediante la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina y la reducción en la producción de angiotensina II. Inicialmente, se creía que el mecanismo por el cual los IECAs protegían el endotelio era el siguiente: los IECAs únicamente actúan a nivel de la bradiquinina inhibiendo su degradación, aumentando su producción y estimulando los receptores de bradiquinina tipo 2 presentes en las células endoteliales para que liberen NO. Sin embargo, en determinadas enfermedades CV, la producción de ROS por la angiotensina II está aumentada. Por lo tanto se cree que cuando los IECAs disminuyen los niveles de angiotensina II, la producción de ROS disminuye y aumenta la actividad de NO (34).

Por su parte, los ARA-II mejoran la función endotelial a través de la inhibición de los receptores de la angiotensina II. Al inhibir estos receptores aumentan la concentración sanguínea y local de la angiotensina II, lo que induce la estimulación de sus receptores de tipo 2. Como resultado de esta interacción, se produce una vasodilatación y un efecto antiapoptótico (34). Tanto los IECAs como los ARA-II son fármacos capaces de disminuir la presión sanguínea así como de ejercer efectos protectores sobre el sistema vascular, demostrando utilidad en la reducción de muerte por eventos cardiovasculares, en el infarto de miocardio, entre otros, y están recomendados en todos los pacientes con enfermedad aterosclerótica.

Todavía no está claro, si los IECAs y ARA-II son completamente efectivos en el control del sistema renina-angiotensina. En este sentido, se ha visto que los inhibidores de

renina, fármacos implicados en la inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona, son capaces de neutralizar cualquier incremento compensatorio de la actividad de la renina en el plasma y de reducir los niveles de la angiotensina I y la angiotensina II. Así, por ejemplo, el Aliskiren es un potente y específico inhibidor de renina utilizado en el tratamiento de la hipertensión, capaz de aumentar la disponibilidad de NO en plasma y de mejorar la función endotelial, así como de suprimir la formación de la placa de ateroma. El Aliskiren mejora el incremento de la concentración de NO en sangre inducido por la acetilcolina, así como el descenso en la liberación de NO tras el tratamiento con el inhibidor específico de la NOSe L-NMMA (L-N Monometil Arginina); además, de forma simultánea, reduce el área afecta de placas de ateroma en la aorta. Estos efectos se ha visto que se ven potenciados si combinamos aliskiren con valsartan, lo que sugiere una acción angiotensina II-independiente de aliskiren.

### **6.2.3. Antagonistas del receptor $\beta$ -adrenérgico**

Los betabloqueantes (BB) generalmente se utilizan en pacientes con síndrome coronario agudo o insuficiencia cardíaca, por sus demostrados efectos positivos en la esperanza de vida, en el riesgo de muerte súbita de origen cardíaco y en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo. Hay tres generaciones de BB. A diferencia de las dos primeras, la tercera generación sí ha demostrado tener efectos beneficiosos sobre la función endotelial. Sin embargo, en general, el efecto protector de los BB sobre el endotelio no es muy fuerte. Los principales fármacos de este grupo son nebivolol y carvedilol. Nebivolol produce vasodilatación mediada por NO, principalmente a través del aumento intracelular de calcio por activación de la fosfolipasa C y del incremento en la liberación de NO por acción sobre los receptores de estrógenos presentes en las células endoteliales (1,23). La infusión intra-arterial de nebivolol en el antebrazo de sujetos sanos se ha asociado con incrementos del flujo sanguíneo a nivel del mismo, lo cual puede ser evitado por la inhibición de la síntesis de NO. Carvedilol, por su parte, es un BB no selectivo que tiene también actividad sobre el receptor adrenérgico  $\alpha_1$ , y que es capaz de incrementar los efectos antioxidantes y de mejorar la disfunción endotelial. Ambos fármacos actúan sobre los receptores  $\beta_3$ , produciendo una activación de NOSe.

### **6.2.4. Antagonistas de la endotelina-1**

La endotelina-1 es un péptido con propiedades mitogénicas y vasoconstrictoras. Este péptido contribuye a la regulación del tono vascular a través de dos receptores principales: endotelina-A (ET-A) y endotelina-B (ET-B). El receptor ET-A se localiza en el músculo liso vascular y media la vasoconstricción. Por otro lado, los receptores ET-B se localizan en las células endoteliales, donde contribuyen a la vasodilatación mediada por NO, y en las CML donde generan vasoconstricción. La acción predominante de la endotelina-1 es la vasoconstricción a través de la activación de los receptores ET-A. La

endotelina-1, tanto la sistémica como la coronaria, aumenta en pacientes con disfunción endotelial coronaria y en las etapas tempranas de la aterosclerosis. Además, los antagonistas del receptor ET-A, tanto de vida media corta como de vida media larga, generan una vasodilatación coronaria y una mejora de la función endotelial (1).

#### **6.2.5. Estrógenos**

Hay estudios que sugieren que los estrógenos son capaces de mejorar la función endotelial a través de propiedades antioxidantes que aumentan la expresión de NO y promueven la degradación del anión superóxido. Los estrógenos mejoran la función endotelial coronaria y periférica, y este efecto es independiente de sus efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico, y son capaces de modular el tono vascular a través de un mecanismo dependiente del NO (1).

#### **6.2.6. Antagonistas de los canales de calcio**

Este grupo de fármacos se divide en dihidropiridínicos (DHP) y no-dihidropiridínicos (no-DHP). Aunque el mecanismo de acción varía entre las distintas clases, todos ellos mejoran el balance entre las demandas y el aporte de oxígeno al miocardio mediante la inducción de la vasodilatación arterial coronaria, la vasodilatación sistémica, el inotropismo negativo y, en el caso de los no-DHP, el efecto cronotrópico negativo. Además, se ha visto que los antagonistas de calcio también tienen efectos pleiotrópicos. Algunos fármacos del grupo de los DHP son capaces de modificar la función endotelial mediante el aumento de la actividad de NOS que resulta en un incremento en la producción de NO. Los efectos vasodilatadores de los antagonistas del calcio, se ha visto que disminuyen tras la eliminación de las células endoteliales o tras la administración de inhibidores de la NOS, inhibidores de la guanilato ciclasa o antagonistas del receptor de la bradiquinina (23).

#### **6.2.7. Fármacos antidiabéticos**

La enfermedad macrovascular es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, y los datos aportados sugieren una relación constante entre el control de la glucemia y la frecuencia de complicaciones de la diabetes. Un estudio reciente sobre la monitorización continua de los niveles de glucosa, ha demostrado que las fluctuaciones en los niveles sanguíneos de glucosa juegan un papel importante en la disfunción endotelial en pacientes diabéticos tipo 2.

Insulinoterapia. El tratamiento con insulina ha demostrado ser lo más efectivo en el manejo de los niveles de glucosa en sangre. Un tratamiento temprano con insulina en pacientes con diabetes tipo 1 es capaz de mejorar la función endotelial, sin embargo, en el caso de la diabetes tipo 2 todavía es discutible.

Metformina. En un meta-análisis llevado a cabo se vio que la metformina, en comparación con otros antidiabéticos orales, se asociaba con descensos del riesgo de muerte por eventos CV. Por este motivo, la metformina constituye la primera línea de tratamiento en el manejo de la diabetes tipo 2. Este fármaco mejora la respuesta a la insulina y la homeostasis de la glucosa, y en distintos estudios realizados, ha demostrado ser capaz de mejorar la función endotelial.

Sulfonilureas. Mediante la estimulación de la secreción de insulina, las sulfonilureas se cree que favorecen el desarrollo de hipoglucemia y de ganancia de peso, aceleran la apoptosis y el agotamiento de las células beta del páncreas y altera la función endotelial, de este modo aumenta el riesgo de sufrir complicaciones isquémicas. Muchos estudios han demostrado los efectos negativos de un tipo de sulfonilurea, la glibenclamida, sobre la función endotelial. Sin embargo, algunos trabajos mostraron mejoras en la función endotelial con otro tipo de sulfonilureas de segunda generación, como la gliclazida, la cual posee propiedades antioxidantes que pueden ser las responsables de la prevención de la disfunción endotelial. No hay muchas evidencias clínicas para apoyar estas teorías, pero lo que sí parece aceptable es que hay diferencias entre los distintos tipos de sulfonilureas en relación con los efectos sobre la función endotelial.

Tiazolidinedionas. Los pacientes con hipertensión, diabetes, obesidad y dislipemia no solo van a presentar daño endotelial, sino también resistencia a la insulina. El daño endotelial puede ser explicado por una disminución de la vasodilatación producida por la insulina. La insulina, en condiciones normales, induce la liberación de NO a través de la activación de NOS. Las tiazolidinedionas activan la enzima NOS e y aumentan la disponibilidad de NO gracias a sus propiedades antioxidantes. Esto sugiere que las tiazolidinedionas tienen efectos beneficiosos directos sobre la vasculatura además de efectos indirectos a través de la mejora del metabolismo. Además, estos fármacos incrementan la sensibilidad a la insulina, por lo que puede constituir un buen tratamiento para la mejora de la vasodilatación mediada por el endotelio en pacientes diabéticos (1).

Inhibidores de la alfa glucosidasa. Aumentos repetidos de la glucemia post-prandial pueden jugar un papel en el desarrollo de aterosclerosis a través de la supresión de la función endotelial. Estos fármacos retrasan la digestión de los carbohidratos complejos en la parte alta del intestino delgado y, posteriormente, retrasan la absorción de la glucosa y reducen la hiperglucemia post-prandial mediante la inhibición de las alfa glucosidasas en el borde en cepillo del intestino delgado. Se cree que la mejora de la función endotelial se debe a la disminución de la hiperglucemia post-prandial lo que limita la glucotoxicidad a nivel de los vasos.

Incretinas GLP-1 y DPP4-I. GLP-1 actúa a nivel del endotelio y de los miocitos cardíacos y vasculares que expresan un receptor para este GLP-1. DPP4-I se encarga de mantener los niveles plasmáticos de GLP-1, y, además, aumenta la producción de NO con aumentos en la fosforilación de NOSe. Muchos estudios han demostrado que la función endotelial mejora por acción tanto de GLP-1 como de DPP4-I.

#### **6.2.8. Eritropoyetina**

La eritropoyetina (EPO) activa la vía PI3-K/Akt y promueve la liberación de NO. Hay estudios que indican que la concentración sanguínea de EPO se relaciona de manera directamente proporcional con el número de progenitores de células endoteliales (EPC) en pacientes con enfermedad coronaria, y, la administración de EPO incrementa este número de EPC. Estos descubrimientos sugieren que la EPO endógena juega un papel importante en la producción de EPC (23).

#### **7. Conclusión**

Un endotelio vascular íntegro con un correcto balance entre actividad vasodilatadora y vasoconstrictora es indispensable para mantener la salud vascular, y en esto es muy importante el papel del NO. La disfunción endotelial es un fenómeno común en numerosas enfermedades cardiovasculares como la enfermedad arterial coronaria, el infarto y la insuficiencia cardíaca, y está desencadenada por una disminución en la biodisponibilidad del NO. Por lo tanto el mantenimiento de unos niveles óptimos de NO son indispensables para evitar la evolución hacia la disfunción endotelial.

## ***AGRADECIMIENTOS***

---

Me gustaría agradecer a mi tutor, Carlos Manuel Martínez Campa, la ayuda prestada para realizar el presente trabajo. El haberme sabido guiar en los primeros pasos aportándome información, ayudándome a aclarar las ideas y apoyándome en mis decisiones. También me gustaría agradecerle la atención que me ha prestado y el saber que estaba ahí para cualquier duda que me pudiera surgir.

1. Kyoung-Ha Park, Woo Jung Park. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci* 30: 1213-1225, 2015.
2. Vittone, L. y C. Mundiña-Weilenmann. Endotelio vascular e hipertensión. De la Serna, F. y H. Cingolani "Tratado de Cardiología de la Federación Argentina de Cardiología" [En Línea]. 2008
3. Mashudu Mudau, Amanda Genis, Amanda Lochner, Hans Strijdom. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular Journal of Africa*. Vol 23, No 4, 2012
4. Esper, Vilariño. Inmunidad, inflamación y aterosclerosis. Federación Argentina de Cardiología. 2009
5. Lina Badimón, José Martínez-González. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol Supl*. 6 (A): 21-30, 2006.
6. Furchgott RF, Zawadzki JV. Role of Endothelium in Responses of Vascular Smooth Muscle. *Circulation Research*. 1983; 53: 557-573.
7. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84(24): 9265-9
8. Beatriz Sánchez Hernández. Mecanismo de acción del óxido nítrico en el organismo y su acción como agente terapéutico. *Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica*. Vol. 11, No 2: 72-76, 2003.
9. Guzmán Velásquez, Luis Jesús. S-Nitrosilación de proteínas: implicancias en la biología molecular del cáncer. Universidad Nacional de Trujillo. 2014
10. Chin-Dusting JP, Willems L, Kaye DM. L-Arginine transporters in cardiovascular disease: A novel therapeutic target. *Pharmacol Ther* 116: 428-436, 2007
11. Kurz S, Harrison DG. Insulin and the arginine paradox. *J Clin Invest* 99: 369-370, 1997.
12. Giugliano, D., R. Marfella, G. Verrazzo, R. Acampora, L. Coppola, D. Cozzolino, and F. D'Onofrio. 1997. The vascular effects of L-arginine in humans. The role of endogenous insulin. *J. Clin. Invest*. 99:433-438.
13. Chin-Dusting JP, Willems L, Kaye DM. L-Arg transporters in cardiovascular disease: A novel therapeutic target. *Pharmacol Ther* 116: 428-436, 2007
14. J.P.F. Chin-Dusting, L. Willems, D.M. Kaye. L-Arginine transporters in cardiovascular disease: A novel therapeutic target. *Pharmacology and Therapeutics* 116: 428-436, 2007

15. Markus P. Schlaich, MD; Melinda M. Parnell, PhD; Belinda A. Ahlers, PhD; Samara Finch, BSc; Tanneale Marshall, BSc; Wei-Zheng Zhang, PhD; David M. Kaye, MD, PhD. Impaired L-Arginine Transport and Endothelial Function in Hypertensive and Genetically Predisposed Normotensive Subjects. *Circulation* 110 (24): 3680-3686, 2004.
16. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 86: 347-354, 2000.
17. Böger GI, Rudolph TK, Maas R, Schwedhelm E, Dumbadze E, Bierend A, Benndorf RA, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin: Effect of combination with oral L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 49:2274-2282, 2007.
18. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(6): 998-1005, 2004
19. David M. Harris, Heather I. Cohn, Stéphanie Pesant, Andrea D. Eckhart. GPCR signalling in hypertension: role of GRKs. *Clinical Science.* 2008; 115: 79-89.
20. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif DM, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:235–76
21. Antonio L. Arrebola-Moreno, Martín Laclaustra y Juan Carlos Kaski. Evaluación no invasiva de la función endotelial en la práctica clínica. *Revista española de Cardiología.* 65(1): 80-90, 2012
22. Thorsten M. Leucker, Steven P. Jones. Endothelial dysfunction as a nexus for endothelial cell-cardiomyocyte miscommunication. *Frontiers in Physiology.* 328, Vol 5, 2014.
23. Yasushi Matsuzawa, Raviteja R. Guddeti, Taek-Geun Kwon, Lilach O. Lerman, Amir Lerman. Treating Coronary Disease and the Impact of Endothelial Dysfunction. *Progress in Cardiovascular Diseases.* 57: 431-442, 2015.
24. Antonia Simón, Almudena Castro, Juan Carlos Kaski. Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Rev Cubana Med* 40(3): 212-222, 2001.
25. Calabia Martínez, Jordi. Medida de la Velocidad de Onda de Pulso mediante Ecografía Doppler: Concordancia con el Método Complior. Trabajo de Investigación del departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona. 2010.
26. Cintia N. Galli\*, Juan Manuel Camus, Edmundo I. Cabrera Fischer, Marcelo R. Risk. La velocidad de la onda de pulso en la evaluación vascular de pacientes con insuficiencia renal. *Rev Fed Arg Cardiol* 33: 212-217, 2004.

27. Gary F. Mitchell, Yves Lacourcière, J. Malcolm O. Arnold, Mark E. Dunlap, Paul R. Conlin, Joseph L. Izzo, Jr. Changes in Aortic Stiffness and Augmentation Index After Acute Converting Enzyme or Vasopeptidase Inhibition. *Hypertension*. 2005
28. Teresa Strisciuglio, Stefania De Luca, Ernesto Capuano, Rossella Luciano, Tullio Niglio, Bruno Trimarco, Gennaro Galasso. Endothelial Dysfunction: Its Clinical Value and Methods of Assessment. *Curr Atheroscler Rep*. 16: 417, 2014.
29. Shaundee Sen, Stephen P. McDonald, P. Toby H. Coates and Claudine S. Bonder. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clinical Science*. 120, 263–283, 2011.
30. Johannes C Grisar, Francois Haddad, Fatemeh A Gomari, and Joseph C Wu. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and chronic inflammation: from biomarker to therapeutic agent. *Biomark Med*. 5(6): 731-744, 2011.
31. Kali, K.S.R. Shetty. Endocan: a novel circulating proteoglycan. *Indian J. Pharmacol*. 46: 579-583, 2014
32. Sevket Balta, Dimitri P. Mikhailidis, Sait Demirkol, Cengiz Ozturk, Tugay Celik, Atila Iyisoy. Endocan: A novel inflammatory indicator in cardiovascular disease? *Atherosclerosis*. 243: 339-343, 2015
33. Malgorzata Baranska, Agnieszka Kaczor, Kamilla Malek, Aleksandra Jaworska, Katarzyna Majzner, Emilia Staniszevska-Slezak, Marta Z. Pacia, Grzegorz Zajac, Jakub Dybas, Ewelina Wiercigroch. Raman microscopy as a novel tool to detect endothelial dysfunction. *Pharmacological Reports*. 67: 736-743, 2015.
34. Yasunobu Hirata, MD, Daisuke Nagata, MD, Etsu Suzuki, MD, Hirokai Nishimatsu, MD, Jun-ichi Suzuki, MD, Royozo Nagai, MD. Diagnosis and Treatment of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int. Heart J*. 51: 1-6, 2010