

# Inflamación y disfunción del endotelio

Antonio López-Farré  
Petra Jiménez  
Mateos-Cáceres  
Antonio  
García-Méndez

Laboratorio  
de Investigación  
Cardiovascular  
e Hipertensión  
Fundación Jiménez  
Díaz-UTE

## Resumen

La disfunción endotelial es una patología que antecede a las patologías de origen vascular. La disfunción endotelial se ha definido como una reducción en la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio y del sistema del óxido nítrico (NO). Los mecanismos causantes de la disfunción endotelial no están totalmente definidos y en este artículo se hace una revisión de las más estudiadas. En este sentido, es conocido que cuando existe disfunción endotelial se favorece la activación de las plaquetas facilitándose la formación de trombos. Pero también las plaquetas podrían participar directamente en la génesis y progresión de la disfunción endotelial.

**Palabras clave:** Endotelio. Función vascular. Inflamación. Óxido nítrico. Plaquetas.

## Summary

Endothelial dysfunction is a pathology that appears early before any morphological vascular alteration could be detected. Endothelial dysfunction has been defined as a reduction in the endothelium and nitric oxide (NO)-dependent vasorelaxation response. The mechanisms involved in the genesis and development of endothelial dysfunction have not defined at all. In the present work, we have reviewed some of the main studied mechanisms associated with endothelial dysfunction. In this regard, it is well known that the existence of endothelial dysfunction provoked the activation of platelets although less is known if platelets by themselves could be also involved in the genesis and progression of endothelial dysfunction.

**Key words:** Endothelium. Inflammation. Nitric oxide. Platelets. Vascular function.

El endotelio tiene una localización anatómica estratégica en la pared vascular que le permite interactuar con las diferentes células que componen el entorno microvascular tanto físicamente como mediante diferentes mediadores hormonales y agentes vasoactivos<sup>1</sup>. El endotelio es conocido como fuente de numerosos mediadores y como el lugar de expresión de recepto-

res y moléculas de adhesión que juegan un papel importante en la enfermedad arterial. En esta revisión, resumimos los últimos conocimientos sobre la disfunción del endotelio, patología que parece preceder a las patologías de origen cardiovascular.

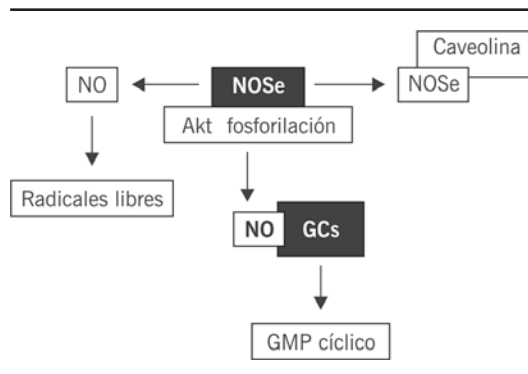
## Mecanismos inductores de disfunción endotelial

Cuando Furchgott y Zawadzki<sup>2</sup> descubrieron en 1980 la existencia de un factor derivado de endotelio que tenía capacidad vasorelajante, probablemente no imaginaban la importancia que iba a tener el estudio del óxido nítrico (NO) en la patofisiología vascular. El NO es sintetizado en el endotelio mediante la conversión metabólica de L-Arginina en L-Citrulina, reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe)<sup>3</sup>. El NO producido por la NOSe es responsable de la vasorelajación dependiente de endotelio vía unión del NO a guanilato ciclasa soluble (GCs), enzima localizada en la capa de músculo liso, capaz de generar GMP cíclico (GMPc)<sup>4</sup> (Figura 1). Es importante recordar que el NO no es sólo uno de los principales moduladores del tono vascular sino que también inhibe la activación de plaquetas y leucocitos. Por lo tanto, un aumento de los niveles intracelulares de GMPc inducidos por el NO en plaquetas está asociado con su reducida adhesión y agregación<sup>5,6</sup>.

La falta de relajación por la vía del sistema NO/GMPc ha sido definida como disfunción endotelial, la cual ha sido identificada en prácticamente todas las patologías de origen cardiovascular<sup>7</sup>. La disfunción del endotelio ocurre no sólo cuando hay evidencias clínicas de enfermedad vascular, sino que incluso antes de que el daño vascular pueda ser detectado como tal habiéndose descrito la existencia de disfunción del endotelio en pacientes con arterias coronarias angiográficamente normales<sup>8</sup>.

Correspondencia:  
Antonio López-Farré  
Laboratorio de Investigación  
Cardiovascular e Hipertensión  
Fundación Jiménez  
Díaz-UTE  
Avda. Reyes Católicos, 2  
28040 Madrid

Figura 1.



Nota: Regulación del sistema NO/GMP cíclico en la pared vascular. El NO es generado por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe), cuya actividad es estimulada por fosforilación dependiente de Akt mediante la interacción de la NOSe con una proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90). A su vez, la actividad de la NOSe es inhibida por su interacción con caveolina, una familia de proteínas de la membrana plasmática localizadas en la caveola. La biodisponibilidad del óxido nítrico puede ser reducida por su interacción con especies reactivas de oxígeno, en concreto anión superóxido. Además, múltiples mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa inhiben la expresión de la NOSe reduciendo la estabilidad de su mensajero, que está asociada con la interacción de una proteína citosólica de 60 kDa con la región 3' no traducida del mensajero.

Los mecanismos causantes de la disfunción del sistema NO/GMPc no están totalmente identificados. La presencia de disfunción endotelial, considerada como una reducción de la respuesta vasorrelajante dependiente del endotelio, puede ocurrir en varios niveles de complejidad.

### Modificaciones en la formación del NO

Existen inhibidores endógenos de la NOSe como Dimetil Arginina Asimétrica (ADMA) que es capaz de competir con la L-Arginina, previniendo la formación de NO. En este sentido, en pacientes con hipertensión sal-sensible, la administración de dietas con alto contenido en sal aumenta los niveles plasmáticos de ADMA, que está asociado con un aumento en la presión arterial y una reducción en la excreción urinaria de NO. Niveles circulantes elevados de ADMA han sido detectados en pacientes diabéticos<sup>9</sup>.

Otra vía de regulación de la actividad de la NOSe es mediante la interacción de la NOSe con una proteína de membrana conocida como caveolina. Las caveolinas son proteínas localizadas en invaginaciones de la membrana plasmática de las células endoteliales conocidas como caveolas<sup>10</sup>. La unión de la caveolina a NOSe inhibe la actividad de ésta última.

Otra manera conocida de modular la actividad de la NOSe es mediante la fosforilación de esta enzima por la proteína serina-treonina Akt (proteína quinasa B). NOSe se une directamente a una proteína de stress de 90 kDa, denominada Hsp90, en respuesta a la estimulación de células endoteliales por el factor de crecimiento vascular derivado de endotelio, histamina y por la fuerza de rozamiento de la sangre contra la pared vascular<sup>11</sup>.

### Protección de la degradación de NO

El mecanismo más estudiado implicado en la disfunción endotelial es la biodegradación de NO por radicales libres (ROS) y fundamentalmente por el anión superóxido (Figura 1). Niveles elevados de ROS reducen la biodisponibilidad del NO. De hecho la combinación del ión superóxido con el NO forma otro radical libre el peroxinitrito, que provoca un mayor daño oxidativo sobre el endotelio<sup>12</sup>.

### Sobre el nivel de expresión de NOSe

Aunque una primera definición de esta isoforma de la NOS la define como constitutiva por su presencia de forma constitutiva en las células endoteliales, hoy en día se conoce la existencia de complejos mecanismos que regulan los niveles de expresión de la NOSe.

En este sentido, nosotros y otros autores hemos demostrado que citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) reducen la expresión de NOSe en células endoteliales en cultivo (13,14) mediante el acortamiento de la vida media del ARNm de NOSe. Así pues, la inflamación parece ser un importante inductor de disfunción endotelial.

La regulación de la estabilidad del ARNm es un mecanismo importante en el control de los niveles celulares de ARNm. En algunos ARNm existen secuencias localizadas en la región 3' no traducida (3'UTR) implicadas en la su estabilidad. En esta región, secuencias específicas pueden ser reconocidas por determinadas proteínas que regulan la estabilidad del mensajero y por lo tanto, su vida media. El mensajero de la NOSe posee un extremo 3'UTR. Recientemente, hemos descrito la existencia de proteínas endoteliales citosólicas que son capaces de interactuar con la región 3'UTR del ARNm de la NOSe.

La incubación de células endoteliales con citoquinas aumenta la unión de estas proteínas citosólicas, en concreto de una proteína citosólica de 60 kDa, a una región de 38 nucleótidos en la región 3'UTR del mensajero de la NOSe asociada con su desestabilización<sup>15</sup>.

Esta proteína citosólica de 60 kDa ha sido denominada: Proteína Inductora de Disfunción Endotelial (EDIP). Recientemente se ha identificado la existencia de una proteína similar en el endotelio humano<sup>16</sup>.

La inducción de la actividad de unión de la proteína EDIP al ARNm de la NOSe en condiciones inflamatorias pone de relieve la importancia que la inflamación tiene en el proceso de disfunción endotelial. En este sentido, un trabajo reciente de Brevetti, *et al.* (2003) ha demostrado que la disfunción endotelial en la enfermedad periférica arterial se asocia con un aumento en diferentes marcadores plasmáticos relativos a la inflamación<sup>17</sup>.

### ¿Cómo podemos proteger la expresión de NOSe?

Posiblemente la mayoría de los fármacos que se utilizan en la medicina cardiovascular han demostrado proteger en mayor o menor medida la funcionalidad del endotelio. No obstante, existen pocos datos en la literatura sobre el mecanismo de acción intracelular por el que los diferentes fármacos protegen la funcionalidad del endotelio. No obstante los diferentes estudios realizados parecen sugerir que este efecto sobre la protección del endotelio es un efecto pleiotropico, es decir, es independiente del efecto para el que se ha descrito el fármaco. La mayoría de los estudios realizados con fármacos se han fundamentado en el posible efecto antioxidante de los mismos. Así, inhibidores del calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I, inhibidores de los receptores AT-1 de la angiotensina II o incluso hipolipemiantes como las estatinas han demostrado aumentar la biodisponibilidad del NO reduciendo la actividad degradativa de los radicales libres. Respecto al efecto de fármacos que se utilizan en la medicina cardiovascular sobre la proteína inductora de disfunción endotelial, solamente existen resultados acerca de la capacidad de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, las estatinas, en cuanto a su capacidad de reducir la capacidad de esta proteína de unirse al ARNm de NOSe. El mecanismo por el que las estatinas actúan sobre la proteína EDIP es no obstante en el momento actual desconocido.

### Efecto sobre la guanilato ciclasa soluble

La guanilato ciclasa soluble (GCs) localizada en el músculo liso vascular es el receptor intracelular de la mayoría de las acciones del NO. El NO se une a la guanilato ciclasa soluble activándola y generando GMP cíclico. El aumento del GMPc va a estimular

una serie de señales intracelulares en el músculo liso vascular cuyo resultado final va a ser la relajación de esta célula. La guanilato ciclasa soluble es una enzima formada por dos subunidades, la  $\alpha$  y la  $\beta$ , y las dos tienen que unir NO para que se genere GMPc. Si existe una expresión deficiente de cualquiera de las dos subunidades la capacidad de la enzima para generar GMP cíclico en respuesta al NO estaría reducida. Podría existir, por lo tanto, la posibilidad de que el endotelio genere una suficiente cantidad de NO pero que un déficit de guanilato ciclasa soluble produjera una mala respuesta vasodilatadora, lo que nosotros observaríamos como disfunción endotelial. Realmente la disfunción sería a nivel del músculo liso vascular.

En modelos animales de hipertensión como son las ratas hipertensas que desarrollan accidentes cerebrovasculares y en un modelo de hipertensión inducido por la administración por plomo se ha observado una disminución en la capacidad del NO de inducir la formación de GMP cíclico por una reducción en la expresión de la subunidad  $\beta$  de la guanilato ciclasa soluble<sup>18,19</sup>. Es decir, podríamos decir que no solo existiría el término disfunción endotelial sino que también existiría la disfunción del músculo liso vascular.

### Las plaquetas también liberan NO

Un aspecto menos conocido es el hecho de que las plaquetas por si mismas son también capaces de generar NO. Se ha identificado la existencia de una NOS constitutiva tanto en las plaquetas humanas como en las células megacariocíticas<sup>20</sup>. Fredman, *et al.*<sup>21</sup> demostraron mediante un microelectrodo sensible para el NO, acoplado a un agregómetro para plaquetas, que la principal función de este NO generado por las plaquetas, es la de inhibir el reclutamiento de plaquetas durante el crecimiento de un trombo.

Existen diferentes mecanismos que promueven la síntesis del NO por las plaquetas entre los que se incluye el  $\alpha$ -tocoferol debido a su efecto inhibitorio sobre la proteína kinasa C, las estatinas al aumentar la expresión de NO sintasa en las plaquetas (de la misma manera que sucede en el endotelio en cultivo y en la pared vascular), L-arginina al incrementar la síntesis de NO y las reservas intracelulares de tioles al aumentar la síntesis de S-nitrosotioles y limitar la inactivación oxidativa del NO. También se ha investigado la importancia clínica del NO generado por las plaquetas en algunas patologías cardiovasculares como son los síndromes coronarios agudos. En este sentido, las plaquetas de pacientes con síndrome coronario agudo generan una cantidad significati-

vamente menor de NO que la de pacientes que sufren angina de pecho estable<sup>21</sup>. No obstante, todavía no se han determinado los factores causantes de la menor liberación de NO por las plaquetas.

Es importante señalar que la plaqueta puede intervenir de forma directa en el proceso inflamatorio y, por lo tanto, podría no solo ser activada por la existencia de disfunción endotelial sino también participar en la génesis y progresión de esta patología. De echo, la plaqueta además de liberar factores que activan su agregación, liberan diferentes mediadores proinflamatorios como citiquinas, quimioquinas y el ligando CD40 que estudios recientes le han atribuido no solo un importante papel como estimulador de la agregación plaquetaria sino también como agente proinflamatorio.

Además, se ha demostrado que la incubación con plaquetas activadas de células endoteliales potencia en estas últimas la expresión de MCP-1 e ICAM-1, dos marcadores inflamatorios relacionados con la adhesión de los leucocitos al endotelio. No obstante, estudios futuros son necesarios para analizar el papel que realmente juegan las plaquetas en el proceso de la disfuncionalidad del endotelio.

En resumen la disfunción endotelial es una patología compleja íntimamente ligada al proceso inflamatorio. Es importante el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la disfunción del endotelio para el desarrollo de fármacos específicos contra esta patología.

## Bibliografía

- Lüscher TF, Vanhoutte PM. *The endothelium: modulator of cardiovascular function*. Boca Raton: CRC Press 1990;1-215.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;299:373-6.
- Moncada S, Higgs A. L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
- Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983;306:174-6.
- Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ. Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1987;90:687-92.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endothelial modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:587-90.
- Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:631-8.
- Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986;315:1046-51.
- Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2032-7.
- Michel JB, Feron O, Sacks D, et al. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 1997;272:15583-6.
- Fontana J, Fulton D, Chen Y, et al. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Cir Res* 2002;90:866-73.
- McMurray J, McLay J, Chopra M, et al. Evidence for enhanced free radical activity in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990;65:1261-2.
- Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JR, et al. Tumor necrosis factor down-regulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993;73:205-9.
- Alonso J, Sánchez de Miguel L, Montón M, et al. Endothelial cytosolic proteins bind to 3'-untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: Regulation by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 1997;17:5719-26.
- López-Farré A, Casado S. Heart failure, redox alterations and endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001;38:1400-5.
- Lai P, Mohamed F, Monge JC, et al. Downregulation of eNOS mRNA expression by TNF- $\alpha$ : identification and functional characterization of RNA-protein interactions in the 3'-UTR. *Cardiovas Res* 2003;59:160-8.
- Brevetti G, Silvestro A, Di Giacomo S, et al. Endothelial dysfunction in peripheral arterial disease is related to increase in plasma markers of inflammation and severity of peripheral circulatory impairment but not to classic risk factors and atherosclerotic burden. *J Vas Surg* 2003;38:374-9.
- López-Farré A, Rodríguez-Feo JA, García Collis E, Gomez J, López-Blaya A, Fortes J, et al. Reduction of the soluble cyclic GMP vasorelaxing system in the vascular wall of stroke prone spontaneously hypertensive rats. Effect of the  $\alpha_1$ -receptor blocker doxazosin. *Journal of Hypertension* 2002;20:463-70.
- Courtois E, Marques M, Barrientos A, Casado S, López-Farré A. Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Journal American Society of Nephrology* 2003;14:1464-70.
- Metha JL, Chen LY, Kone BC, et al. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase isoforms in platelets. *J Lab Clin Med* 1995;125:370-7.
- Freedman JE, Ting B, Hankin B, et al. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* 1998;98:1481-6.