



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PARTICIPACIÓN DEL ENDOTELIO EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR**

**(TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN)**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ROSALBA ALAMÁN GARCÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: HOMERO HERNÁNDEZ MONTES

**VOCAL:** Profesor: MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA

**SECRETARIO:** Profesor: MARÍA DEL ROCÍO BAUTISTA PÉREZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

**2° SUPLENTE:** Profesor: MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA**

**“DR. IGNACIO CHÁVEZ”**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. MARÍA DEL ROCÍO BAUTISTA PÉREZ**

**FIRMA:** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**ROSALBA ALAMÁN GARCÍA**

**FIRMA:** \_\_\_\_\_

**AGRADECIMIENTOS:**

**Al Instituto Nacional de Cardiología  
por el apoyo brindado al proyecto  
12-766.**

## AGRADECIMIENTOS

*A DIOS:*

*Por todas sus bendiciones*

*Y cuidados*

*A MIS PADRES:*

*Por su amor incondicional y sacrificio.*

*Los quiero mucho*

*A SAMUEL:*

*Por su apoyo, ayuda brindada y por*

*Soportarme tanto*

*A JOSE LUIS:*

*Por toda su insistencia*

*A LA DRA. ROCIO:*

*Por su disposición, dirección y respaldo otorgado*

*A MIS HIJAS:*

*Por su llegada a mi vida.*

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
Abreviaturas.....	i-x
Resumen.....	xi-xii
1. Introducción.....	1
2. Endotelio.....	2
3. Vasodilatadores endoteliales.....	4
3.1. Oxido nítrico.....	5
3.1.1. Regulación transcripcional y/o post-transcripcional de la sintasa del oxido nítrico.....	5
3.1.2. Regulación post-traducciona l de la sintasa del oxido nítrico.....	8
3.1.3. Actividad de la sintasa del oxido nítrico.....	18
3.1.4 Importancia de la biodisponibilidad del oxido nítrico.....	22
3.2. Canales de potasio (K <sup>+</sup> ).....	29
3.3. Peróxido de Hidrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	37
3.4 Metabolitos del ácido araquidónico vasodilatadores.....	41
3.4.1. Prostaciclina (PGI <sub>2</sub> ).....	41
3.4.2. Acidos epoxieicosatrienólicos (EETs).....	45
4. Vasoconstrictores.....	52
4.1 Metabolitos del ácido araquidónico vasoconstrictores.....	52
4.1.1 Tromboxano (TXA <sub>2</sub> ).....	52
4.1.2. 20-Acido Hidroxieicosatetraenoico (20-HETE).....	56

4.2. Endotelina (ET).....	61
4.3. Angiotensina II.....	65
4.4. PKC.....	69
5. Tratamientos para revertir la disfunción endotelial.....	78
6. Conclusión.....	90
7. Bibliografía.....	91

## Abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
ACh	Acetilcolina
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ADH	Vasopresina
ADMA	Dimetil arginina asimétrica
ADP	Adenosina difosfato
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
Akt	Proteína cinasa B
ATP	Adenosina trifosfato
ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Bomba sodio/potasio
Ang I,II	Angiotensina I,II
AP-1,2	Proteína activadora 1,2
Arg	Arginina
AT <sub>1,2</sub>	Receptores angiotensina 1
BK	Bradicinina
BK <sub>Ca</sub>	Canales de potasio activados por calcio de gran conductancia
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
BH <sub>2</sub>	Dihidrobiopterina
BH <sub>3</sub> <sup>·</sup>	Radical trihidropterina



bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
Ca <sup>2+</sup>	Cátion Calcio <sup>2+</sup>
[Ca <sup>2+</sup> ]	Concentración de Calcio <sup>2+</sup> intracelular
CaM	Calmodulina
Cav-1	Caveolina-1
Cat	Catalasa
C	Porción carboxilo-terminal
CCD	Conducto colector cortical
CE	Células endoteliales
CX, CXs	Conexina, conexinas
-COOH	Grupo carboxilo
cGS	Guanilato ciclasa soluble
CLC	Canales de cloro
COX , COXs	Ciclooxigenasa, Ciclooxigenasas
COX-1 ,2	Ciclooxigenasa-1 ,2
Cy450, CYP	Citocromo P450
Cys	Cisteína
Cu	Cobre
Cu-Zn-SOD	Superóxido dismutasa con cobre o Zinc
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato

EC	Celula endotelial
ECE, ECEs	Enzima convertidora de endotelina, Enzimas convertidoras de endotelina
ECM	Matrix extracelular
ecSOD	Superoxido dismutasa extracelular
EDCFs	Factores de contracción derivados del endotélio
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF, EDRFs	Factor relajante derivado del endotelio, Factores de relajación derivados del endotelio
EET, EETs	Ácido epoxieicosatrienólico, Ácidos epoxieicosatrienólicos
5,6,8,9,11,12,14,15-EET	5,6,8,9,11,12,14,15-Ácido epoxieicosatrienólico
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EOX	Epooxigenasa
ELAM	Molécula de adhesión leucocito endotelial
$E_m$	Potencial de membrana
eNOS	Sintasa del oxido nítrico endotelial
EPO	Eritropoyetina
ET	Endotelina
ET-1,2,3	Endotelina 1,2,3
ET <sub>A, B</sub>	Receptor de endotelina A,B
FAD	Flavina adenina dinucleótido

FMN	Flavina mononucleótido
Fe <sup>++</sup>	Catión fierro 2+
GC	Guanilato ciclasa
Gly	Glicina
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
GPX	Glutación peroxidasa
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub>	Proteína G
GS $\alpha$	Subunidad $\alpha$ de proteína G-S
G-3-P	Glicerol-3-fosfato
GTP	Guanosina trifosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HETE, HETEs	Ácido Hidroxieicosatetraenoico, Acidos hidroxieicosatetraenoicos
12,15,20 -HETE	Ácido 12,15,20 -Hidroxieicosatetraenoico
HPETE	Ácidos de hidroxiperoxieicosatetraenoicos
5,11,12,15- HPETE	5,11,12,15- Ácidos de hidroxiperoxieicosatetraenoicos
HHT	Ácido 12-hidroxihéptadecatrienoico
HRE	Elemento de respuesta a hormona
Hsp20, 90	Proteína de choque térmico 20,90
5-HT	5-hidroxitriptamina ó serotonina

ICAM-1	Molécula de adhesión vascular-1
IK <sub>Ca</sub> ó K <sub>Ca</sub> 3.1 ó IK1	Canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia
IL-1, 1 $\beta$ , -6	Interleucina-1, -1 beta, 6
iNOS	Sintasa del oxido nítrico inducible
IP	Receptor de prostaciclina
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5 trifosfato
K <sup>+</sup>	Ión potasio
K <sub>ir</sub> ó Kir <sub>2.1</sub>	Canales de potasio de rectificación hacia el interior
K <sub>ATP</sub>	Canales de potasio sensibles a ATP
K <sub>Ca</sub>	Canales de potasio activados por Ca <sup>2+</sup>
K <sub>v</sub>	Canales de potasio activados por voltaje.
K <sub>2p</sub>	Canales de potasio de 2 poros
L-arg	L-arginina
L-cit	L-citrulina
LDL, oxidada	Lipoproteína de baja densidad, oxidada
LPS	Lipopolisacáridos
LOX	Lipooxigenasa
LTs	Leucotrienos
LY333531	Mesilato de ruboxistaurina
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero

MAPK	Proteína cinasa activada por mitogenos
Mn	Manganeso
Mg <sup>2+</sup>	Catión magnesio <sup>2+</sup>
Mn-SOD	Súperoxido dismutasa con Mn
MLC20	Cadenas ligeras de miosina
meGJ	Uniones gap mio-endoteliales
MZF	Mieloides dedo de zinc de proteínas 42
N	Porción amino-terminal
Na <sup>+</sup>	Catión sodio
NA	Noradrenalina
NADPH oxidasa, ox	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada
NADPH <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
NA	Noradrenalina
NE	Norepinefrina ó noradrenalina
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NF- <i>κ</i> B	Factor nuclear de transcripción
NF-1	Factor nuclear-1
-NH <sub>2</sub>	Grupo amino
n,i, eNOS	Sintasa del oxido nítrico neuronal inducible, endotelial

NO	Oxido nítrico
NOS	Sintasa del oxido nítrico
NOS I, II, III	Sintasa del oxido nítrico I, II , III
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOX	NADPH oxidasa
NSCC	Canales cationicos no selectivos
nPKCs	Proteína cinasa C del grupo novel
O <sub>2</sub>	Oxigeno molecular
O <sub>2</sub> .-	Radical superóxido
-OH	Hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
ONOOH	Acido peroxinitroso
P	Fosfato
PA	Ácido fosfatidico
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDEs	Fosfodiesterasas
PDE-5	Fosfodiesterasa-5
PG, PGs	Prostaglandina, Prostaglandinas
PGD <sub>2</sub> , E <sub>2</sub> , F <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub> , E <sub>2</sub> , F <sub>2</sub> ,G <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>

PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PGIS	Sintetasa de prostaciclina
POX	Peroxidasa
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil Inositol 4,5-bisfosfato
PKA,PKC, PKC β	Proteína cinasa A, Proteína cinasa C, proteína cinasa beta
c, n , a PKCs	Proteína cinasa C convencional, novel, atípica
PKG	Proteína cinasa G
PLA <sub>1,2</sub>	Fosfolipasa A <sub>1,2</sub>
PLC, β	Fosfolipasa C, beta
PLD	Fosfolipasa D
P450	Citocromo P450
PRD I,II	Dominio regulatorio positivo I,II
PT	Túbulo proximal
R	Receptores
RAS	Sistema renina-angiotensina
RE	Retículo endoplasmico liso
ROS	Especies reactivas de oxigeno
RNA, mRNA	Ácido ribonucleico, Ácido ribonucleico mensajero
mRNP	Transcrito primario
RYR	Receptor de rianodina
Ser, Ser <sup>1177</sup>	Serina, serina 1177

S116, 1179	Serina 116, 1179
SK <sub>Ca</sub> ó K <sub>Ca</sub> 2.3 ó SK3	Canales de potasio activados por calcio de conductancia pequeña
SKK	Sistema cinina-caliceína
sGC	Guanilato ciclasa soluble
SOC	Canal de Ca <sup>2+</sup> operado por almacén
SOD ,SODs	Superoxido dismutasa ,Superóxido dismutasas
SP	Sustancia P
Sp1	Proteína de especificidad 1
SR	Retículo sarcoplasmico
SSRE	Elementos de respuesta de esfuerzo cortante
TALH	Rama ascendente del asa de Hengle
TGF	Factor de crecimiento transformante
TGF-β	Factor de crecimiento transformante -beta
Thr, Thr <sup>495</sup>	Treonina, Treonina <sup>495</sup>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral -alfa
TGF- α1	Factor de crecimiento transformante –alfa 1
TP	Receptor de tromboxano
TRP	Canal de potencial de receptor transitorio
TRPV4	Receptor de potencial transiente, subfamilia V, miembro 4
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano
TXS	Tromboxano Sintasa



Tyr	Tirosina
Uniones gap	Uniones en hendidura, comunicantes o nexus
3'-UTR	Secuencia 3' no traducida del gen
$V_m$	Potencial de membrana
VCAM-1	Molécula de adhesión intracelular -1
VGCC	Canales de Calcio dependientes de voltaje
VEGF	Factor endotelial de crecimiento vascular
VSMC ,VSM	Célula del músculo liso vascular, Músculo liso vascular
XO	Xantina oxidasa
Zn	Zinc
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\uparrow$	Aumenta
$\downarrow$	Disminuye

## RESUMEN

El endotelio es un tejido funcionalmente complejo, productor de múltiples moléculas que actúan en forma endocrina, paracrina y autocrina que afectan la vasoregulación, proliferación de células del músculo liso vascular, agregación plaquetaria y adhesión de monocitos. La vasoregulación ocurre como resultado de un equilibrio entre la liberación de factores relajadores y constrictores.

Los factores vasodilatadores derivados del endotelio incluyen a la prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), el óxido nítrico (NO) y los EDHF (factor hiperpolarizante derivado del endotelio). En el grupo de los EDHF se incluye a los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), que responden a estímulos como la acetilcolina, la bradikinina y el *shear stress*. Los EETs son metabolitos del ácido araquidónico que vía el citocromo P-450, son producidos por el endotelio, y contribuyen a la regulación del tono vascular. Los vasodilatadores mencionados actúan provocando la apertura de canales de  $\text{K}^+$ . También se ha sugerido que el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), una especie reactiva de oxígeno, funciona como EDHF. La superóxido dismutasa convierte al anión superóxido en peróxido de hidrógeno.

Además, el endotelio produce a su vez a los EDCF (factor contráctil derivado del endotelio) representados por distintas sustancias como: metabolitos vasoconstrictores derivados del ácido araquidónico (20-HETEs), endotelina (ET-1), y angiotensina II.

Actualmente se define la disfunción endotelial como la imposibilidad del vaso sanguíneo de aumentar su diámetro en respuesta a un estímulo conocido, ocasionado por una insuficiente generación de agentes vasodilatadores en el endotelio. Actualmente, la disfunción endotelial está asociada con diversas manifestaciones de la patología cardiovascular. Interviene en la génesis de la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca y la enfermedad coronaria, lo que convierte al endotelio en un objetivo estratégico para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

## 1. INTRODUCCIÓN

La integridad funcional del **endotelio** es crucial para el mantenimiento del flujo sanguíneo y de la capacidad antitrombótica, porque el endotelio libera factores humorales que controlan la relajación y la contracción, la trombogénesis y la fibrinólisis, así como la activación de plaquetas y la inhibición de las mismas. Por lo tanto, el endotelio contribuye a controlar la presión sanguínea, el flujo sanguíneo y la potencia de los vasos. En este contexto, la **disfunción endotelial** podría ser definida como aquella situación, local o generalizada, caracterizada por un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias vasoactivas de origen endotelial que conlleva la existencia de un vaso con tendencia a la agregación plaquetaria, la trombosis, la inflamación y/o la vasoconstricción.

La evidencia experimental y clínica sugiere que la disfunción endotelial es el mayor determinante para el desarrollo y la progresión de enfermedades cardiovasculares y renovasculares (la aterosclerosis, la hipertensión, la insuficiencia cardíaca, la diabetes, la obesidad). Por lo tanto, un aspecto importante de la terapia en pacientes con estas enfermedades, sería incrementar o preservar la función endotelial.

Considerando lo antes descrito el objetivo de esta revisión es dar a conocer los mecanismos celulares a través de los cuales el endotelio participa en la regulación del tono vascular, y así conocer cómo prevenir o corregir la disfunción endotelial

en la enfermedad cardiovascular con fármacos o tratamientos dirigidos hacia el endotelio.

## 2. Endotelio

El endotelio vascular, es estructuralmente simple y funcionalmente complejo, es una capa unicelular que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y conforma la pared de los capilares (Figura 1) (Esper y col., 2006).

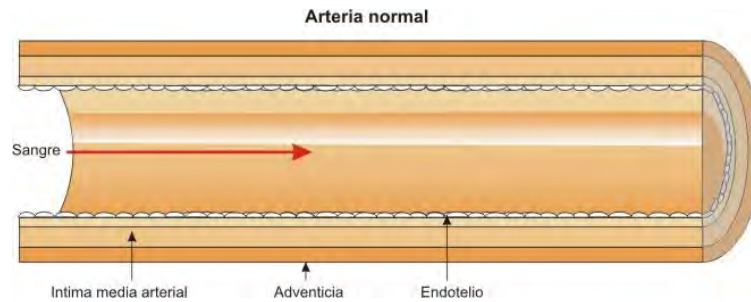


Figura 1: Estructura de un vaso sanguíneo. El endotelio recubre la parte interna de los vasos sanguíneos, interactúa directamente con los componentes de la sangre, la íntima media arterial está compuesta de células de músculo liso y fibras elásticas y la adventicia de fibras de colágeno. (Tomado de Arce-Torres y col., 2008)

Las células endoteliales vasculares, actualmente son reconocidas como fuente productora de sustancias de acción autocrina y paracrina, de trascendente participación en la vasorregulación, la coagulación y la fibrinólisis (Tabla 1) (Hadi y Suwaidi, 2007).

---

Tabla 1: Sustancias químicas liberadas por las células endoteliales y su acción fisiológica (Hadi y Suwaidi, 2007; Siekmeier y col., 2008).

---

**Vasoconstricción**

Angiotensina II (Ang II)  
Endotelina 1 (ET-1)  
Tromboxano (TXA<sub>2</sub>)  
Prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)

**Vasodilatación**

Oxido Nítrico (NO)  
Bradicinina (BK)  
Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)

**Promotores del crecimiento**

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)  
Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)  
ET-1  
Ang II

**Inhibidores del crecimiento**

NO  
Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)  
Factor de crecimiento transformante (TGF)

**Proinflamatorios**

Moléculas de adhesión  
\*ELAM, VCAM, ICAM

**Antiinflamatorios**

**Protromboticos**

**PAI-1** (Inhibidor del activador del plasminógeno)

**Antitromboticos**

PGI<sub>2</sub>  
Activador del plasminógeno tisular (TPA)

---

\*ELAM Molécula de adhesión leucocito endotelial, VCAM Molécula de adhesión intracelular, ICAM Molécula de adhesión vascular.

---

El mantenimiento del tono vascular depende del equilibrio entre la acción de las sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que actúan sobre las células de músculo liso de la pared vascular. El endotelio juega un papel importante, produciendo ambos tipos de sustancias. La alteración en este equilibrio representa un acontecimiento inicial en el desarrollo de la disfunción endotelial (Hadi y Suwaidi, 2007; Vanhoutte y col., 2009).

### 3. Vasodilatadores endoteliales.

En 1980 Furchgott y Zawadzki descubrieron el papel fundamental del endotelio como regulador de la vasodilatación. Ellos demostraron que los anillos de arterias pre-contraídos se podían relajar en respuesta a la acetilcolina, solo si las células endoteliales estaban intactas. Cuando eliminaron el endotelio la vasorelajación producida por la acetilcolina fue anulada, lo cual sugería que la respuesta estaba mediada por alguna sustancia derivada del endotelio que se denominó **factor relajante derivado del endotelio (EDRF)** (Furchgott y Zawadzki, 1980; Serban y col., 2010).

Robert Furchgott propuso en 1986 que este factor (**EDRF**) era el **óxido nítrico (NO)**. Louis Ignarro llegó a la misma conclusión. Un año más tarde, Salvador Moncada y sus colegas demostraron en cultivo de células endoteliales que la bradicidina (BK) estimula la liberación de NO (Ignarro y col, 1987; Palmer y col, 1987; Serban y col., 2010).



### **3.1. Oxido nítrico**

El NO es producido en la célula endotelial por tres diferentes isoformas de la sintasa del oxido nítrico (NOS): sintasa del oxido nítrico neuronal (nNOS), sintasa del oxido nítrico inducible (iNOS) y sintasa del oxido nítrico endotelial (eNOS). Estas enzimas se expresan en prácticamente todos los tipos de células vasculares, pero la isoforma endotelial es la principal responsable de la producción de NO en las células endoteliales (Mitchell y col., 2008).

De las tres isoenzimas conocidas, a dos se les denomina “constitutivas” (nNOS y eNOS) y ambas responden a los agonistas bradicinina y acetilcolina que incrementan la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular. Estas isoenzimas producen NO por cortos periodos de tiempo (Mitchell y col., 2008).

La isoforma inducible se expresa en los macrófagos y las células endoteliales en respuesta a procesos inflamatorios y sintetiza más oxido nítrico que las sintasas constitutivas, produciéndolo de una manera constante y por largos periodos de tiempo (Mitchell y col., 2008).

#### **3.1.1. Regulación transcripcional y/o post-transcripcional de la sintasa del oxido nítrico.**

Los estímulos fisiológicos y fisiopatológicos que regulan la expresión de la sintasa del oxido nítrico endotelial a nivel transcripcional y/o post-transcripcional (modificaciones del transcrito primario, transporte núcleo-citoplasmático,

localización subcelular, estabilidad del mRNA y traducción eficiente) se muestran en la tabla 2 y en la figura 2 (Fleming I y col, 2003; Searles CD y col, 2006;).

Tabla 2: Estímulos fisiológicos y fisiopatológicos que regulan la expresión de la sintasa del óxido nítrico endotelial.		
Estímulo	Regulación Transcripcional	Regulación Post-transcripcional
Fuerza de flujo	↑ Transcripción	↑ Estabilidad
Tensión cíclica	↑ Transcripción	Desconocido
Crecimiento celular	Sin efecto	↑ Estabilidad
Peróxido de Hidrogeno	↑ Transcripción	↑ Estabilidad
TGF-β1	↑ Transcripción	Desconocido
Lisofosfatidilcolina	↑ Transcripción	Desconocido
LDL-oxidada	↓ y ↑ Transcripción	↓ Estabilidad
ácido linoléico oxidado	↑ Transcripción	↑ Estabilidad
TNF-α	↓ Transcripción	↓ Estabilidad
LPS	Sin efecto	↓ Estabilidad
Hipoxia	↑ y ↓ Transcripción	↓ Estabilidad
Estatinas	Sin efecto	↑ Estabilidad
Estrógeno	↑ Transcripción	Sin efecto
PKC	↑ Transcripción	Sin efecto
Trombina	Desconocido	↓ Estabilidad
Rho GTPasa	Sin efecto	↓ Estabilidad
VEGF	Posible ↑ Transcripción	↑ Estabilidad
Hipercolesterolemia	Desconocido	↓ Estabilidad

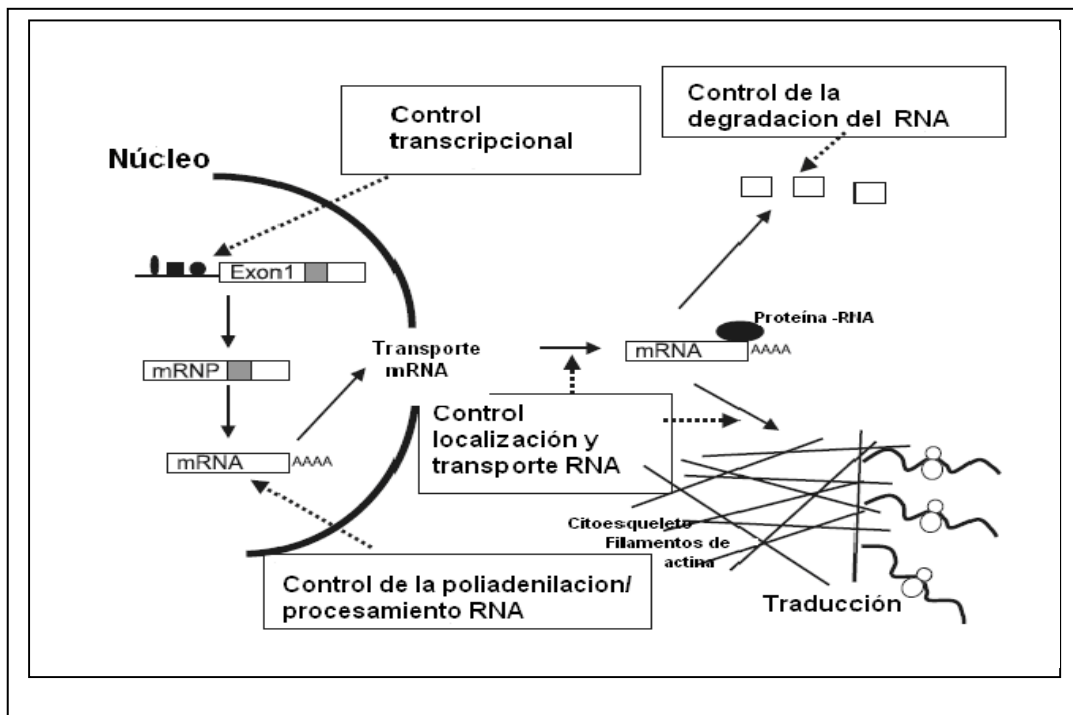


Figura 2: Mecanismos que regulan la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial. Varios estímulos fisiológicos y fisiopatológicos regulan la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial a nivel transcripcional y/o postranscripcional. (Modificado de Searles CD, 2006).

Se ha demostrado que la región promotora del gen de la sintasa del oxido nítrico endotelial no contiene la secuencia típica de la caja TATA. Sin embargo, posee múltiples elementos cis y trans-reguladores que interaccionan entre sí (Searles, 2006; Chatterjee y Catravas, 2008).

Los elementos cis-reguladores son secuencias de DNA que regulan un gen sobre el mismo tramo de DNA (es decir, los promotores y los potenciadores). Los elementos reguladores-trans son moléculas cuyos genes están localizados en otro lugar en el genoma o que pueden ser suministrados a partir de otro cromosoma y que se unen a los elementos cis-reguladores, la unión de esos reguladores afecta (aumenta o reprime) la transcripción. Los elementos trans-reguladores son usualmente factores de transcripción (Searles, 2006; Chatterjee y Catravas, 2008).

En la figura 3 se muestran los elementos cis y trans reguladores del gen de la sintasa del oxido nítrico endotelial (Searles, 2006)

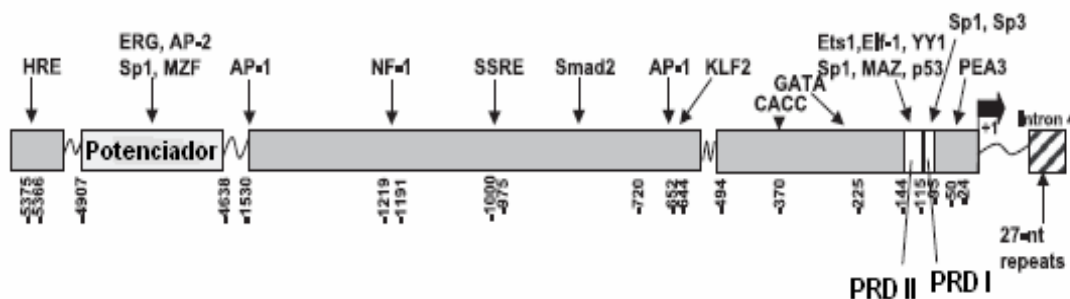


Figura 3: Elementos cis y trans del gen de la sintasa de oxido nítrico endotelial. Los elementos cis reguladores son el potenciador y el promotor. Los elementos trans-reguladores (factores de transcripción) son: HRE, ERG, AP-2, Sp1, MZF, AP-1, NF-1, SSRE, Smad2, AP-1, KLF2, CACC, GATA. La unión de los elementos cis y trans reguladores regula la transcripción. Además, el promotor de la sintasa del oxido nítrico endotelial tiene 2 regiones regulatorias: EL PRD I que está muy cerca de la iniciación de la transcripción y al cual se le unen los factores de transcripción Sp1 y Sp3. La región PRDII al cual se unen factores de transcripción (Ets-1, Elf-1, YY1, Sp1 y MYC), estas 2 regiones pueden ser metiladas y la actividad del promotor se ve afectada (Modificado de Searles CD, 2006).

### 3.1.2. Regulación post-traducciona de la sintasa del oxido nítrico.

#### Estructura de la sintasa del oxido nítrico endotelial

Todas las isoformas de la sintasa del oxido nítrico se sintetizan como monómeros. El monómero presenta en la porción amino-terminal (N) el “dominio oxigenasa”, este dominio presenta sitios de unión a arginina (Arg), Zinc (Zn), tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), Fe<sup>++</sup>. Mientras que en la porción carboxilo-terminal (C) presenta el “dominio reductasa”, este dominio presenta sitios de unión a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN) (Figura 4) (Govers y Rabelink, 2001; Förstermann y Münzel, 2006).

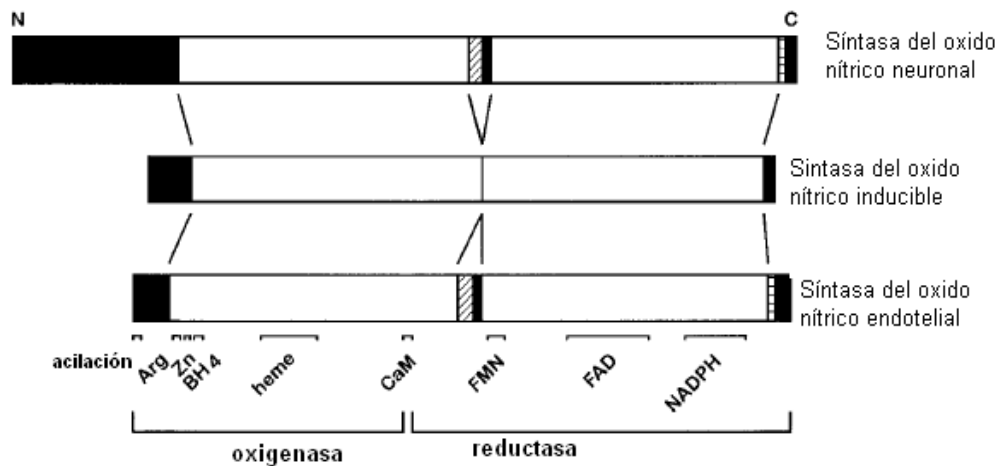


Figura 4: Estructura de los monómeros de las tres isoformas de la sintasa del oxido nítrico. Las regiones claras muestran la semejanza en su estructura entre las tres sintasas. Las zonas rayadas indican que la secuencia de aminoácidos entre la sintasa endotelial y la sintasa neuronal son muy semejantes. Las regiones oscuras indican secuencias específicas de cada isoforma. Además, en la figura se indican los sitios necesarios para la acilación, sitios de unión para los sustratos y cofactores, los cuales se encuentran dentro del dominio oxigenasa y/o reductasa. También se muestra la dirección del flujo de electrones que va del dominio reductasa al dominio oxigenasa y se indica el grupo amino-terminal (N) y carboxilo-terminal (C). (Tomada de: Govers R and Rabelink TJ., 2001).

La unión de los monómeros de la sintasa del oxido nítrico (NOS) o dimerización es esencial para su actividad, porque un solo monómero es inactivo o incapaz de producir oxido nítrico (NO) (Figura 5A, 5B) (Förstermann y Münzel, 2006; Weseler y Bast, 2010).

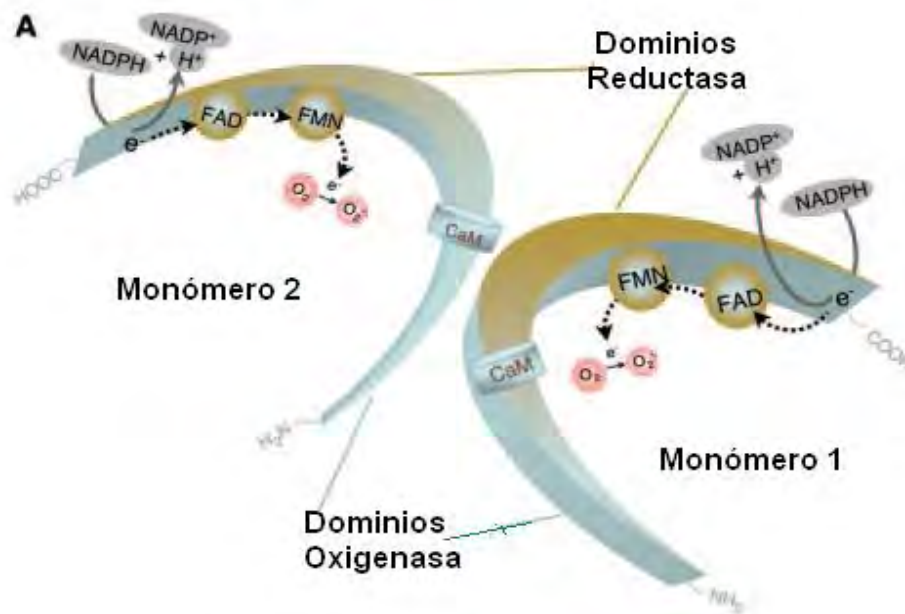


Figura 5A, Monómeros de la NOS 1 y 2 aislados, inactivos, incapaces de producir NO. Cada monómero tiene un dominio reductasa y un dominio oxigenasa. En los dominios reductasa de cada monómero se puede llevar a cabo la transferencia de electrones desde el NADPH a través del FMN y FAD, además hay una reducción del oxígeno molecular a anión O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superóxido), también se puede ver la unión de la calmodulina (CaM) al dominio reductasa la cual facilita la transferencia de electrones en el dominio reductasa. Sin embargo los monómeros son incapaces de unir L- arginina y BH<sub>4</sub>, por lo tanto no hay producción de NO. (Modificado de: Förstermann U, Münzel T., 2006).

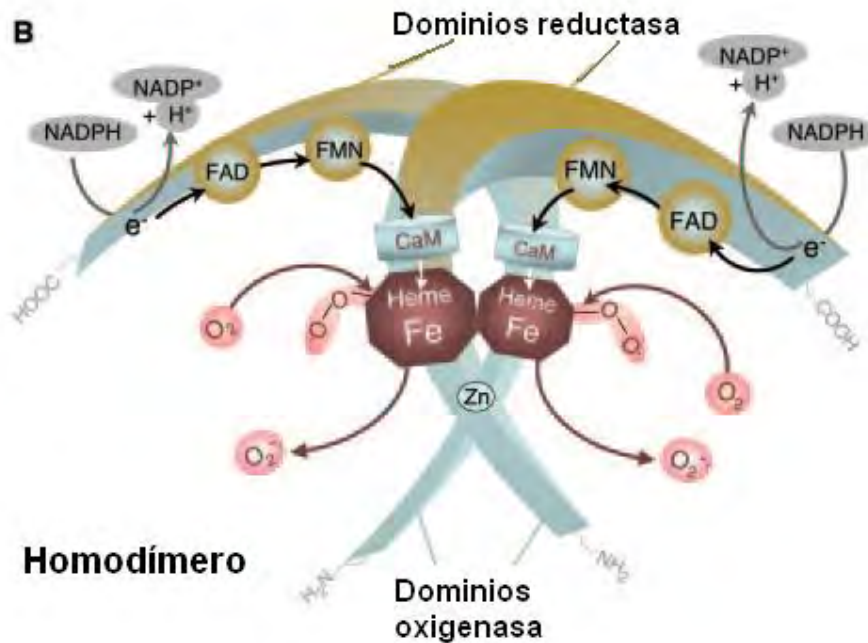


Figura 5B. Dimerización de la sintasa del óxido nítrico. La dimerización de la NOS ocurre por interacción de los dominios oxigenasa a través del cofactor BH<sub>4</sub>. El ión Zn se une en la interfase del dímero y su función es principalmente estructural. La dimerización es importante para la síntesis de NO, ya que un solo monómero de la sintasa del óxido nítrico produce radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superóxido). (Modificado de: Förstermann U, Münzel T., 2006).

Después de que la sintasa del óxido nítrico se ha sintetizado, su actividad depende de su acilación, nitrosilación, de su interacción con otras proteínas, de su localización subcelular y de su estado de fosforilación en residuos serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr) (Dudzinski y Michel, 2007; Fulton y col., 2001).

## **Acilación.**

La sintasa del oxido nítrico endotelial es una proteína integral de la membrana o transmembranal que no contiene dominios hidrofóbicos de transmembrana, por lo cual para anclarse a la membrana plasmática utiliza un proceso llamado acilación, la sintasa del oxido nítrico endotelial está doblemente acilada por los ácidos grasos saturados mirístico y palmítico. La acilación del ácido graso mirístico es un paso irreversible y le permite a la enzima anclarse en las caveolas de la membrana plasmática. La acilación del ácido graso palmítico es un proceso reversible que estabiliza la asociación de la sintasa del oxido nítrico endotelial con la membrana (Figura 6) (Fulton y col., 2001; Sessa, 2005; Dudzinski y Michel, 2007).

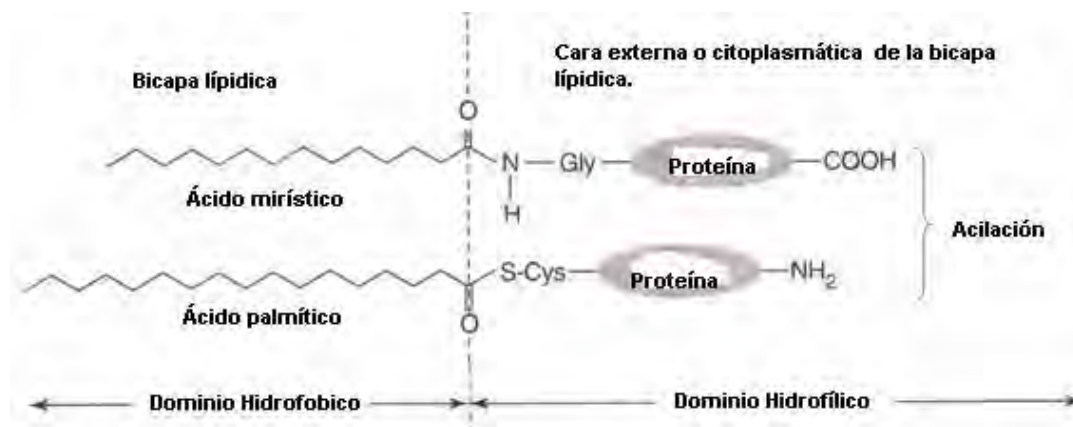


Figura 6: Acilación de la sintasa del oxido nítrico endotelial

**Proteínas que regulan negativamente la actividad de la sintasa del oxido nítrico.**

**Caveolina:** La caveolina es una proteína que se localiza en las caveolas de las membranas celulares y pueden interactuar con la sintasa del óxido nítrico endotelial. La unión de la sintasa del óxido nítrico endotelial-caveolina inhibe la actividad de la enzima y por lo tanto disminuye la producción de óxido nítrico lo que lleva a disfunción endotelial (Figura 7 y 8) (Sessa, 2005; Dudzinski y Michel, 2007; Vanhoutte y col., 2009).

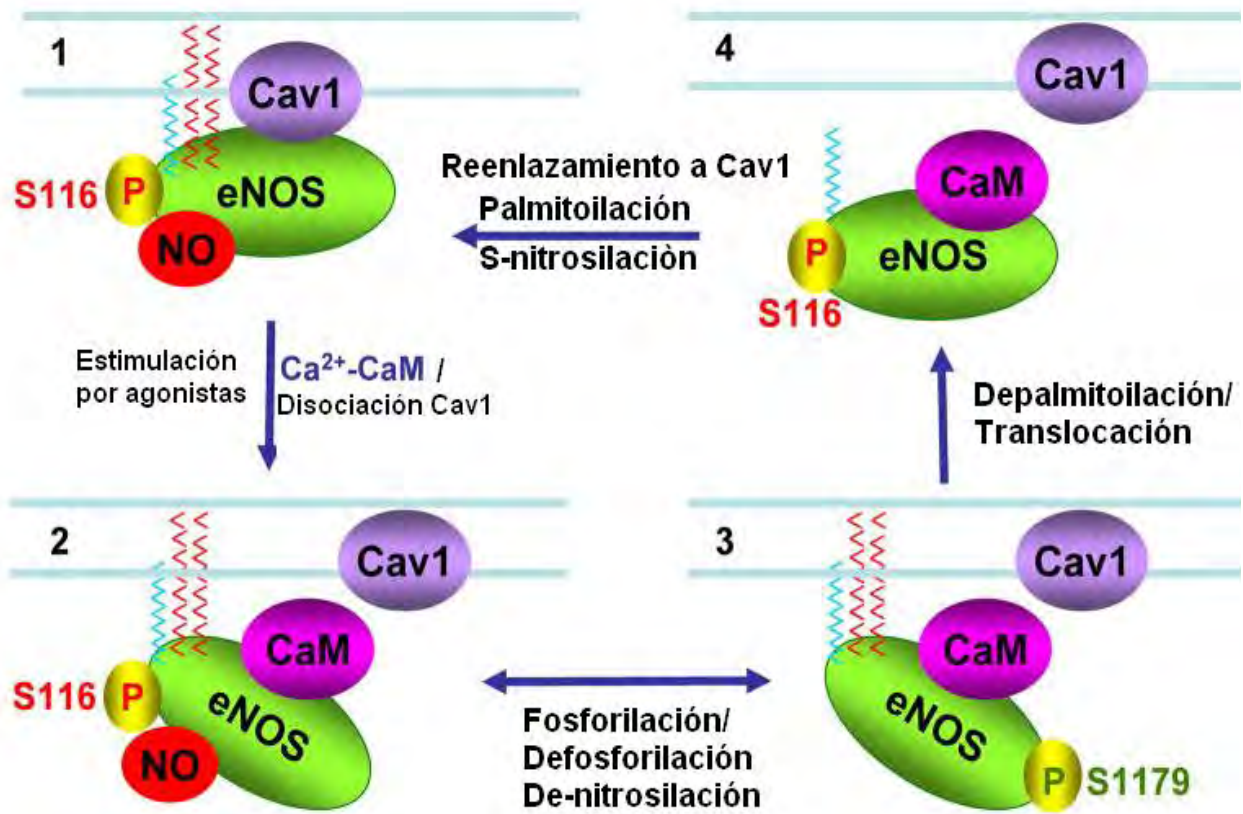


Figura 7: Relación dinámica entre los mecanismos de regulación post-traduccional de la sintasa del óxido nítrico endotelial. 1) sintasa del óxido nítrico endotelial en reposo anclada a la caveola por acilación a los ácidos grasos mirístico y palmítico (cadenas azul y roja respectivamente; en este estado la sintasa del óxido nítrico endotelial es inhibida por la unión a cav1, por la fosforilación en la serina 116, y la nitrosilación de la cisteínas 96 y 101. 2) El desplazamiento de la cav1 por la unión sintasa del óxido nítrico endotelial /CaM . 3) La denitrosilación estimula fosforilación en la ser 1179, lo cual aumenta la actividad de la enzima. 4) Después de la prolongada estimulación de los agonistas, la sintasa del óxido nítrico endotelial es des-acilada y se trasloca de la periferia de la membrana a la membrana interna. 5) La sintasa del óxido nítrico endotelial es inactivada por disociación a CaM, nuevamente se une a la caveolina, además de la re-nitrosilación y de la desfosforilación de la sintasa del óxido nítrico endotelial en sus sitios de fosforilación estimuladora. (Modificado de: Dudzinski DM, Michel T., 2007).



## **Proteínas que regulan positivamente la actividad de la sintasa del oxido nítrico.**

**Calmodulina (CaM):** Por el contrario a la caveolina, la unión de la sintasa del oxido nítrico endotelial con la CaM inducida por un aumento de calcio intracelular, desplaza la unión sintasa del oxido nítrico endotelial-caveolina activando la enzima y aumentando la producción de oxido nítrico (Figura 7 y 8) (Vanhoutte y col., 2009).

**Proteína de choque térmico 90 (hsp90):** La familia hsp90 es un grupo de proteínas que se producen en todas las células eucariotas cuando se encuentran en un medio ambiente que le provoca cualquier tipo de estrés. Se localizan en el citoplasma, su principal función es que son las responsables del correcto plegamiento de proteínas tales como receptores de esteroides y cinasas. Pero esta no es su única función, hsp90 participa en la traducción de señales en todas las células (Sessa WC, 2005; Chatterjee y Catravas, 2008; Vanhoutte y col., 2009). Hsp 90 se asocia con la sintasa del oxido nítrico endotelial en células endoteliales tanto en reposo como estimulada por VEGF, histamina, fuerza de roce y estrógenos, esto provoca la liberación de oxido nítrico, esto es debido a que la unión hsp90- sintasa del oxido nítrico endotelial aumenta la afinidad por la CaM y también aumenta su actividad reductasa es decir la transferencia de electrones del dominio reductasa al dominio oxigenasa (Sessa ,2005; Chatterjee y Catravas ,2008; Vanhoutte y col., 2009).

La formación del complejo sintasa del oxido nítrico endotelial -hsp90 ocurre simultáneamente con otros eventos tales como la movilización de calcio intracelular y/o fosforilación de proteínas. Los estudios han mostrado que la hsp 90 puede directamente activar a la sintasa del oxido nítrico endotelial in vitro. Estos resultados sugieren que la hsp 90 puede actuar como un modulador alostérico de la sintasa del oxido nítrico endotelial induciendo un cambio conformacional en la enzima que resulta en activación de la enzima. Recientemente se ha mostrado que hsp90 incrementa la afinidad de CaM por la sintasa del oxido nítrico neuronal. Alternativamente hsp 90 puede actuar como un andamio para el reclutamiento de cinasas y fosfatasa que pueden influir en la función de la sintasa del oxido nítrico endotelial (Sessa, 2005; Chatterjee y Catravas, 2008; Vanhoutte y col., 2009).

La asociación sintasa del oxido nítrico endotelial -hsp90 requiere que hsp90 esté fosforilada en residuos Tyr. Hsp90 también aumenta la actividad de sintasa del oxido nítrico endotelial facilitando su fosforilación. Hsp90 podría entonces funcionar como el factor celular que asegura la secuencia temporal de eventos que mantienen activada a la sintasa del oxido nítrico endotelial: una fase inicial dependiente de  $Ca^{+2}$  y una posterior dependiente de fosforilación (Figura 8) (Fulton y col., 2001; Sessa, 2005; Chatterjee y Catravas, 2008; Vanhoutte y col., 2009).

## Otros mecanismos post-traduccionales que regulan la actividad de la sintasa del oxido nitrico.

**Fosforilación de proteínas:** Otra modificación posttraduccional que puede potencialmente regular la actividad de la sintasa del oxido nítrico endotelial es a través de la fosforilación en varios sitios de la enzima, en respuesta a diversos estímulos como: fuerza de roce del flujo sanguíneo, bradicinina y factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF) entre otros. La sintasa del oxido nítrico endotelial puede ser fosforilada sobre residuos de serina, treonina y tirosina (Fulton y col., 2001; Fleming y Busse, 2003; Sessa, 2005).

**Ser<sup>1177</sup> en el dominio reductasa:** Cuando el sitio Ser<sup>1177</sup> es fosforilado promueve la activación de la enzima por provocar la dimerización de la enzima esto es porque la fosforilación en este sitio incrementa el flujo de electrones a través del dominio reductasa al dominio oxigenasa y como consecuencia también se incrementa la producción de oxido nítrico (Fleming y Busse, 2003).

**Thr<sup>495</sup>.** Este sitio se localiza en la zona de unión al complejo Ca<sup>+2</sup>-CaM el cual es fosforilado y es asociado con una disminución en la actividad de la enzima porque esta fosforilación interfiere con la unión a de la sintasa del oxido nítrico endotelial - CaM, por lo cual hay disminución en la síntesis de oxido nítrico (Fleming y Busse, 2003).

**Tyr.** Aunque la sintasa del oxido nítrico endotelial puede ser fosforilada en residuos de tirosina, no se conoce con exactitud que residuos y se especula que la fosforilación de sintasa del oxido nítrico endotelial en tirosina no afecta

directamente la actividad de la sintasa del oxido nítrico endotelial pero más probablemente podría regular la interacción de la sintasa del oxido nítrico endotelial con otras proteínas (Fleming y Busse, 2003).

### **Glicosilacion**

La glicosilacion de la sintasa del oxido nítrico endotelial reduce su actividad y por lo tanto disminuye la síntesis de oxido nítrico y es un inductor de disfunción endotelial (Vanhoutte y col., 2009).

### **ADMA (Dimetil arginina asimétrica)**

ADMA es un metabolito de la L-arginina, lo cual disminuye la producción de oxido nítrico a través de su unión competitiva a la sintasa del oxido nítrico endotelial. Por tanto esta amina endógena puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de disfunción endotelial (Chatterjee y Catravas ,2008; Vanhoutte y col., 2009).

### **Nitrosilación.**

La nitrosilación inhibe la actividad de la sintasa del oxido nítrico endotelial porque promueve la disociación de la estructura dimérica en monómeros inactivos. La nitrosilación podría funcionar entonces como un mecanismo de retroalimentación negativo que evita la formación de oxido nítrico en grandes cantidades (Figura7) (Ravi y col., 2004; Dudzinski y Michel, 2007).

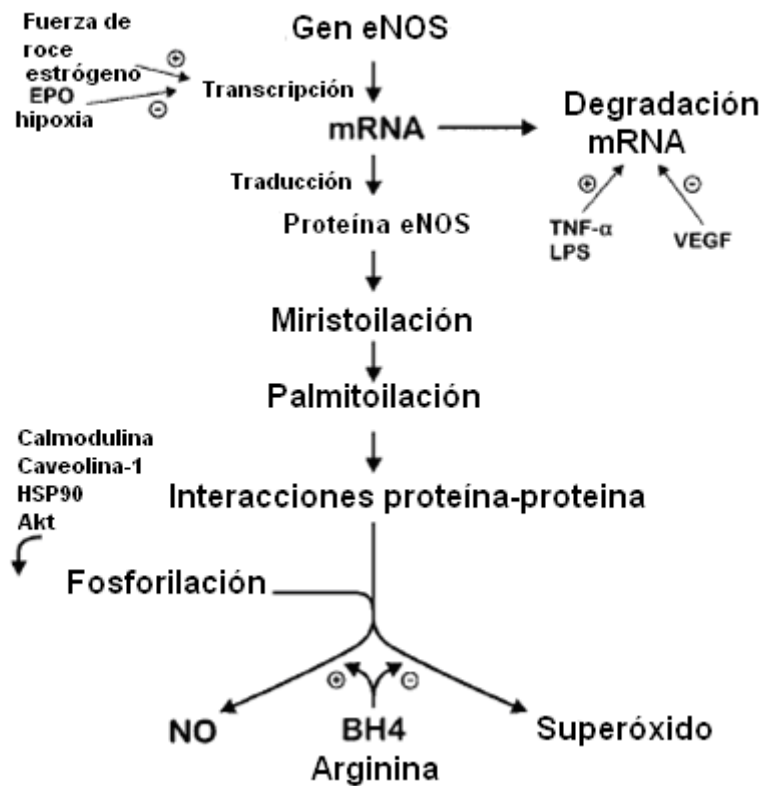


Figura 8: Esquema de los mecanismos que regulan la producción de óxido nítrico en el endotelio. El óxido nítrico se produce a través de la conversión enzimática de L-arginina por la sintasa del óxido nítrico endotelial. La transcripción de esta enzima es regulada por hormonas y factores de crecimiento. La estabilidad del mRNA de la sintasa del óxido nítrico endotelial es modulada por estatinas y hormonas. La actividad de la sintasa del óxido nítrico endotelial requiere calcio, CaM, NADPH y BH<sub>4</sub>. La asociación con las proteínas de choque térmico (hsp 90) aumenta la actividad enzimática de la sintasa del óxido nítrico. La asociación de la sintasa del óxido nítrico endotelial con la caveolina-1 o glicosilación de la enzima reduce la actividad. Un metabolito de la L-arginina ADMA, disminuye la producción de óxido nítrico a través de su unión sintasa del óxido nítrico endotelial. Modificada de: Govers R, Rabelink TJ. ., 2001).

### 3.1.3. Actividad de la sintasa del óxido nítrico

Es importante señalar que las tres isoformas de la NOS comparten un ciclo catalítico similar que consiste en la oxidación de L-arginina para formar NO y L-

citrulina, reacción que utiliza como co-sustratos  $O_2$  y NADPH, además requiere otros cofactores como FAD, FMN,  $BH_4$  y el grupo hemo para la transferencia de electrones (Figura 9) (Schmidt y Alp, 2007).

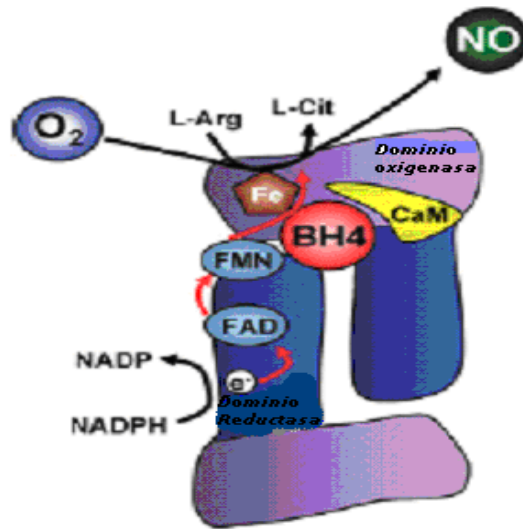


Figura 9: Síntesis del NO. La eNOS es la responsable de la producción de NO y L-citrulina a partir de  $O_2$  y L-arginina. Además requiere de cofactores como,  $BH_4$ , FAD, FMN, NADPH y grupo hemo (Fe). Modificado de: Schmidt TS, Alp NJ., 2007.

Como se mencionó anteriormente, la síntesis de NO depende de la unión de la NOS a la CaM. Para unir CaM y en consecuencia activarse, las eNOS y nNOS requieren un aumento en la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular. En contraste, iNOS, que tiene una alta afinidad por la CaM, puede unirse a esta proteína a concentraciones muy bajas de  $Ca^{+2}$  (es independiente de  $Ca^{+2}$  y su actividad es regulada por citocinas). Así, la actividad de la eNOS y de la nNOS es regulada por los cambios transitorios del  $Ca^{+2}$  intracelular en respuesta a estímulos

diversos, mientras que la actividad de las iNOS es independiente de  $\text{Ca}^{+2}$  y puede mantenerse tónicamente activa durante varios días (Fulton y col., 2001).

Los mecanismos fisiológicos más importantes que regulan la producción y liberación de NO es la fuerza de roce que ejerce el flujo sanguíneo al circular por los vasos (*shear stress*). Además numerosos agonistas, relajan indirectamente al músculo liso vascular a través de la liberación endotelial de NO. El NO es una molécula pequeña y liposoluble que atraviesa fácilmente a través de las membranas celulares. El NO difunde del endotelio a las células del músculo liso vascular adyacentes, activa a la enzima guanilato ciclasa soluble (cGS), y esto aumentan los niveles celulares del segundo mensajero guanosina monofosfato cíclico (cGMP), que a su vez disminuye la concentración de calcio necesario para la interacción de las proteínas contráctiles y esto produce vasodilatación (Figura 10) (Stankevicius y col., 2003; Vanhoutte y col., 2009).

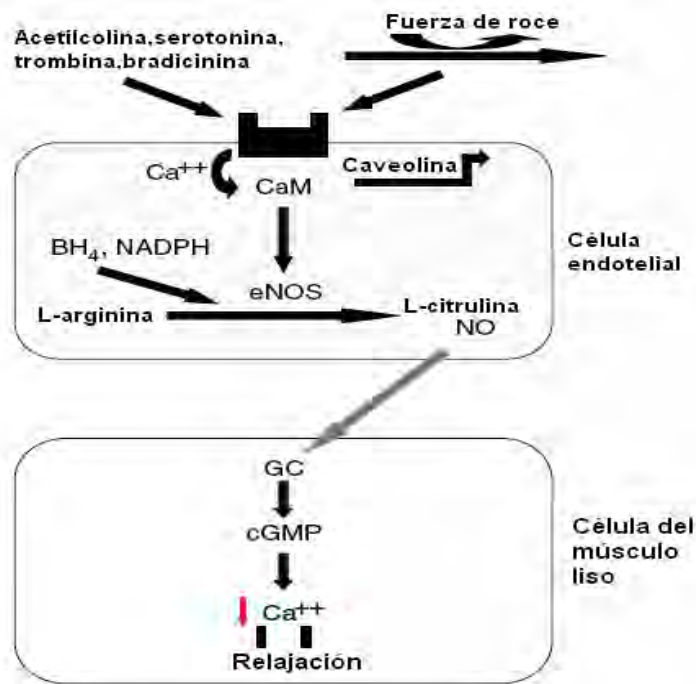


Figura10: En la célula endotelial agonistas como: acetilcolina, serotonina, trombina, bradicinina y la fuerza de roce, estimulan a sus respectivos receptores, produciendo un incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular. El  $Ca^{2+}$  se une a caM, desplazando a caveolina, lo que lleva a la activación de la eNOS. La producción del NO depende también de cofactores  $BH_4$  y NADPH así como del sustrato L-arginina. EL NO, difunde al músculo liso y activa a la guanilato ciclasa (GC) esto incrementa la producción de cGMP, disminuye la concentración de  $Ca^{2+}$  y se produce relajación del músculo liso. Tomada de: Siekmeier R, Grammer T, März W. , 2008.

Un incremento en los niveles de cGMP puede afectar el tono vascular no solo por la disminución intracelular de  $Ca^{2+}$  sino también por otros mecanismos: activación de proteína cinasa G (PKG) y la fosforilación de proteínas de choque térmico 20 (Hsp 20)) (Fleming y Busse, 2003).



## El cGMP y la activación de la PKG.

El NO producido en la célula endotelial difunde al músculo liso el cual activa a la guanilato ciclasa citosólica soluble (sGC), la cual a partir de guanosina trifosfato (GTP) aumenta los niveles celulares del segundo mensajero cGMP, lo que provoca la activación de proteínas como la PKG, la cual es una proteína quinasa específica dependiente de cGMP. En el músculo, liso vascular la PKG activa una vía de señalización que produce la inhibición del complejo actina-miosina, la relajación de la célula y la vasodilatación de los vasos sanguíneos (Figura 11) (Feil y col., 2003; Ba y col., 2009; Kitazawa y col., 2009).

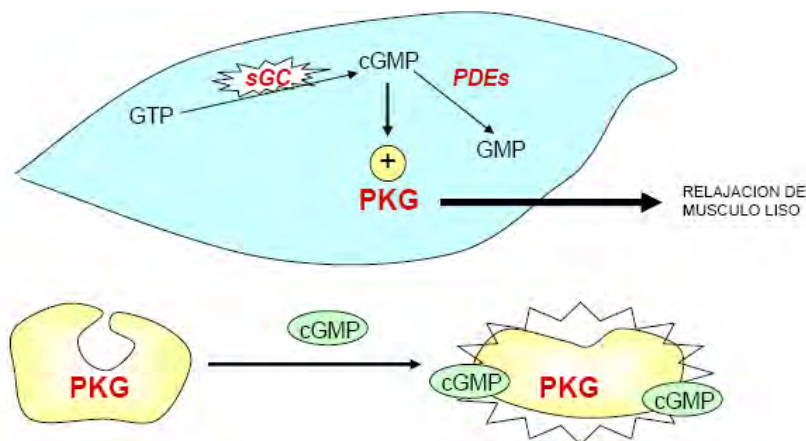


Figura 11: El cGMP activa a PKG, la cual inhibe al complejo actina-miosina y produce relajación.

### 3.1.4 Importancia de la biodisponibilidad del óxido nítrico

Hay mecanismos que conducen a una menor síntesis y/o biodisponibilidad del NO, los cuales son variados y posiblemente multifactoriales (Figura 12) (Tang y Vanhoutte, 2010; Searles, 2006).

La producción de NO puede disminuir por alteraciones en:

- El metabolismo del sustrato de la eNOS
- La disponibilidad de cofactores requeridos por la eNOS
- La expresión y/o estructura de la eNOS
- Las vías de señalización que regula la actividad de la eNOS
- Aumento en la inactivación del NO

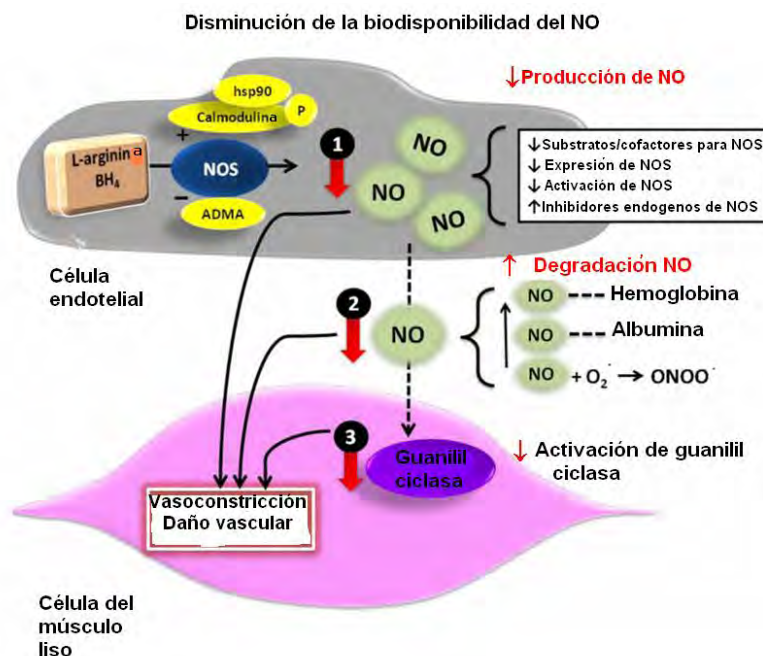


Figura 12: Los mecanismos que llevan a una disminución en la síntesis de NO: Disminución en L-arginina y BH<sub>4</sub>, decremento en la expresión y activación de la eNOS, la presencia de inhibidores de la eNOS como el dimetil arginina asimétrica (ADMA), aumento en la degradación de NO debido al incremento en la unión del NO con hemoglobina, albúmina y superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) lo cual forma peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), todo estos mecanismos disminuyen la activación de la guanilil ciclasa y la producción de NO. Tomada de: Tang EH, Vanhoutte PM, 2010.

## Desacoplamiento de la NOS

Para la síntesis del NO se requiere del aminoácido básico **L-arginina**. Si este falta o disminuye, la eNOS no funciona bien y entonces en lugar de sintetizar NO, se produce el radical libre  $O_2^-$ , a este evento se le ha nombrado **desacoplamiento de la eNOS** (Figura 13) (Schmidt y Alp, 2007; Münzel y col., 2005).

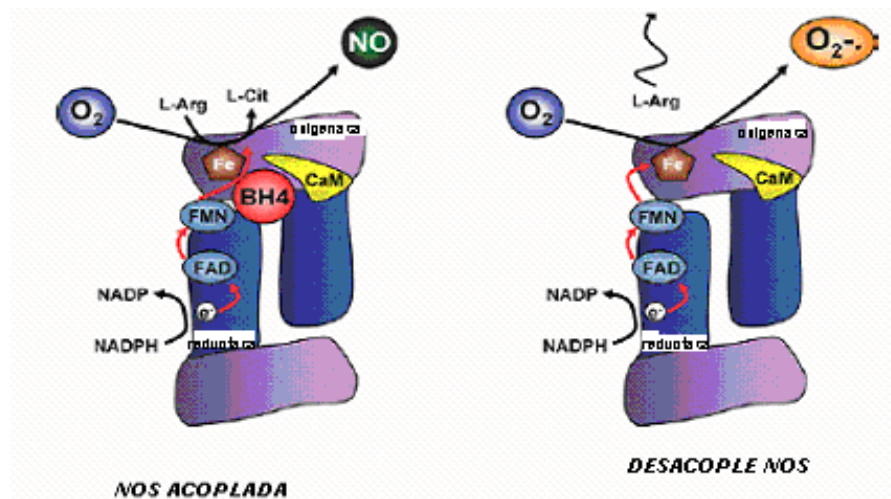


Figura 13: Desacoplamiento de la eNOS: A la izquierda de la figura se observa la eNOS en un endotelio vascular en condiciones fisiológicas normales, la biodisponibilidad de la arginina y  $BH_4$  no está limitada. A la derecha el desacople de la eNOS debido a que la biodisponibilidad de arginina y  $BH_4$  está limitada. Modificado de: Schmidt TS, Alp NJ, 2007.

Cuando el **cofactor  $BH_4$  falta o disminuye**, también se origina el desacoplamiento de la eNOS (Figura 14) (Alp y Channon, 2004; Münzel y col., 2005).

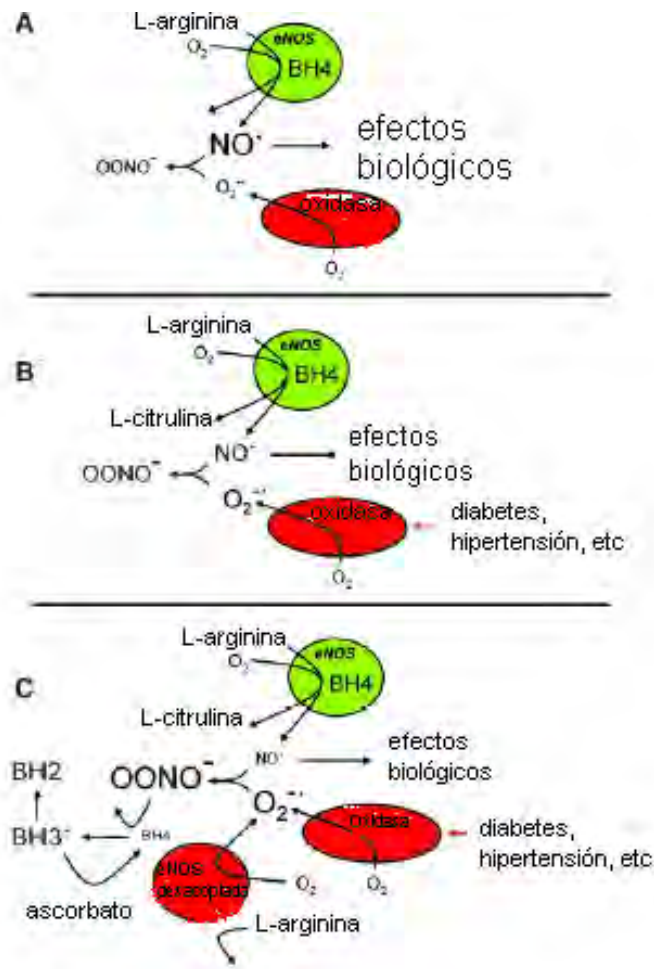


Figura 14: A) producción normal de NO. B) disminuye la estabilidad del NO por que aumenta la producción de superóxido ( $O_2^-$ ). C) desacople de la eNOS y participación de la vitamina C en la recuperación de  $BH_4$ . (Modificada de: Alp NJ, Channon KM, 2004).

### **Alteraciones en la expresión y/o estructura de la eNOS.**

Otro factor que puede afectar la producción endotelial del NO es el grado de expresión de la eNOS. La eNOS se expresa de manera constitutiva, sin embargo diversos estímulos pueden regular su expresión (Fleming y Busse, 2003). Se ha reportado que la fuerza de roce del flujo, bajas concentraciones de las lipoproteína de baja densidad (LDL)-oxidada y análogos de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) aumentan la expresión de la eNOS (Fleming y Busse, 2003). Por el contrario, la hipoxia, altas concentraciones de LDL-oxidada, citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ), o lipopolisacáridos (LPS) disminuyen su expresión. La menor expresión de la eNOS fue asociada con la vida media del mRNA (Fleming y Busse, 2003). A través de este último mecanismo, las citocinas como el  $TNF-\alpha$  o la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) disminuyen la expresión de la eNOS, impidiendo que la célula endotelial libere un nivel adecuado de NO y por lo tanto induciendo la disfunción del endotelio.

### **Aumento de la inactivación de NO.**

NO y  $O_2^{\cdot-}$  reaccionan (radical-radical) con una velocidad tres veces mayor que la velocidad de reacción de las superóxido dismutasas (SODs), enzimas que transforman el  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ . En un compartimiento en el que estén presentes

tanto NO como SODs, la reacción preferencial del  $O_2^{\cdot-}$  es con el NO para formar peroxinitrito. Dada esta rápida velocidad de reacción, siempre hay  $O_2^{\cdot-}$  inactivando NO tanto en las células como en el espacio extracelular (Figura 15)(Münzel y col., 2005).

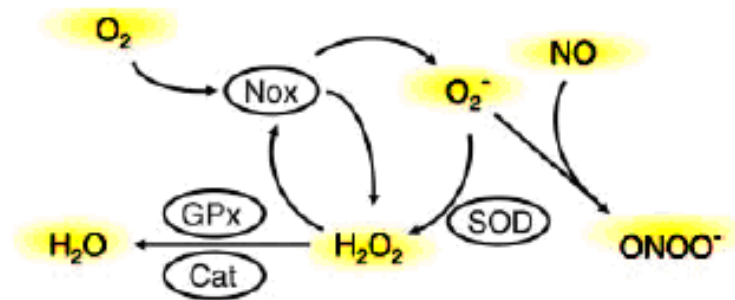


Figura 15: El  $O_2$  puede ser inactivado por la SOD para formar peróxido, el cuál es transformado por la glutatión peroxidasa o la catalasa para formar agua. Sin embargo, la interacción  $O_2 - NO$  forma  $ONOO^-$ . (Modificado de Münzel y col., 2005)

En condiciones fisiológicas las defensas antioxidantes (SOD, GPx, Cat) minimizan esta interacción y mantienen un adecuado balance  $NO-O_2^{\cdot-}$ . Sin embargo, toda situación que provoque aumento de la concentración de  $O_2^{\cdot-}$ , aún

con síntesis normal de NO, provocará disminución de la biodisponibilidad de NO (Figura 16) (Münzel y col., 2005).

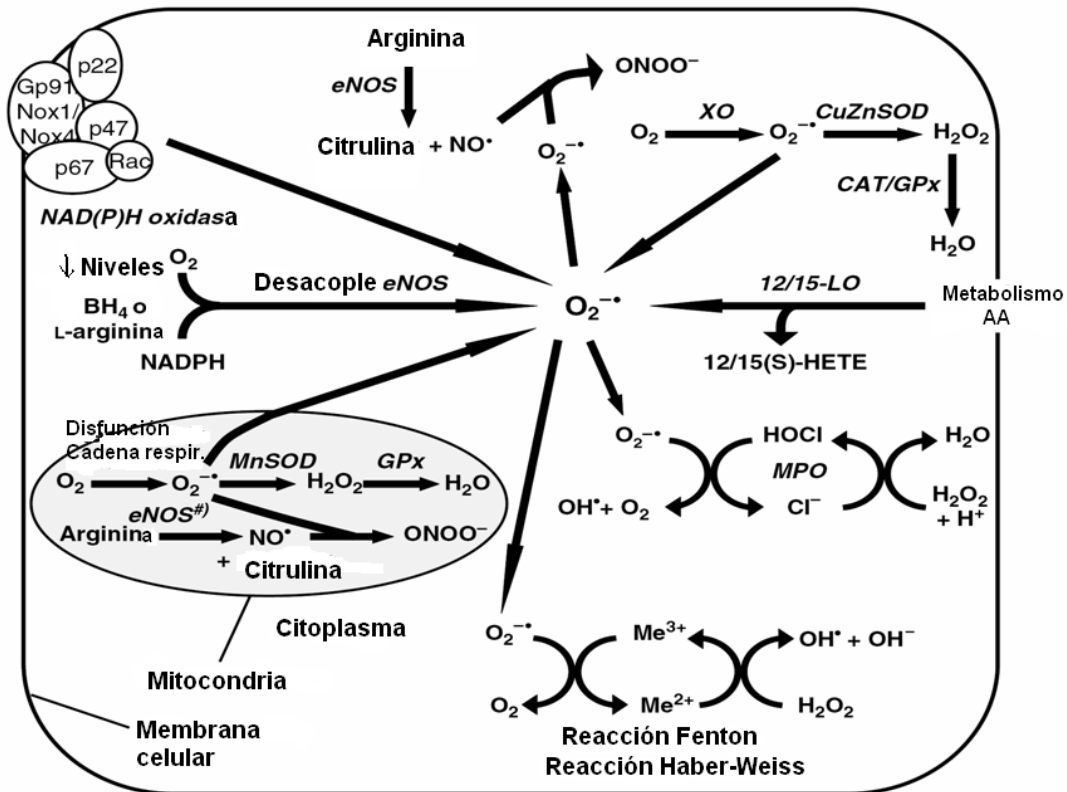


Figura 16: Inactivación del NO debido a un incremento en el estrés oxidativo. En la célula endotelial hay varias fuentes que incrementan la producción de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ): un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa, desacoplamiento de la eNOS, disfunción de la cadena respiratoria en la mitocondria, a través del metabolismo del AA vía lipooxigenasa. El superóxido producido reacciona con el NO y forma peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Esta reacción es preferida aun en presencia de las SODs, por lo tanto en condiciones donde hay un incremento de  $O_2^{\cdot-}$  siempre hay  $O_2$  inactivando NO. (Modificada de: Siekmeier R, Grammer T, März W., 2008).

En condiciones patológicas el NO puede convertirse en una molécula prooxidante. En procesos inflamatorios de la pared vascular que cursan con altas concentraciones tanto de ROS como de NO, originados no sólo en las células

endoteliales sino también en los macrófagos reclutados, aumenta la formación de peroxinitrito que modifica la estructura y función de distintas proteínas y contribuye a la **disfunción vascular** (Figura 17 y 18) (Münzel y col., 2005).

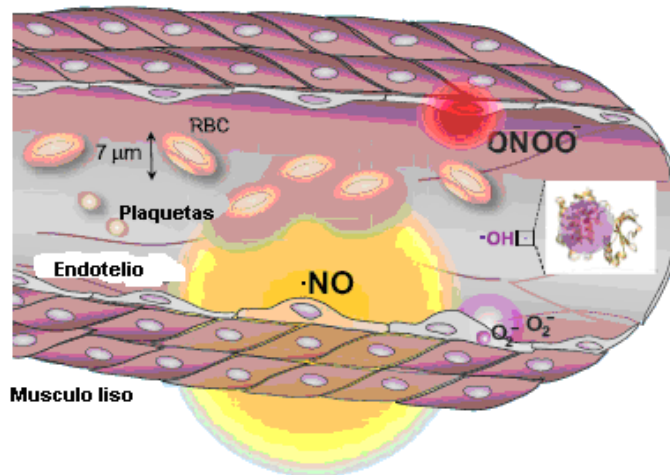


Figura 17: Producción de NO en la célula endotelial. En situaciones patológicas el NO forma ONOO<sup>-</sup> y disfunción endotelial .

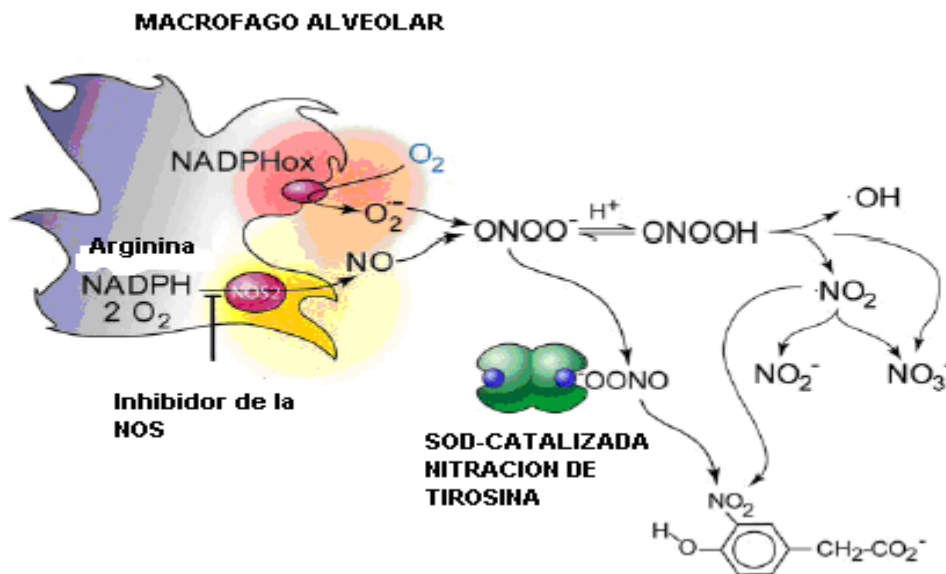


Figura 18: Producción de NO en macrófagos alveolares. El NO formado reacciona con  $\text{O}_2^-$  originando el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) el cual entra en equilibrio con su forma protonada el ácido peroxinitroso  $\text{ONOOH}$  ( $\text{pKa} = 6.8$ ). El  $\text{ONOOH}$  puede descomponerse por ruptura homolítica a radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y ( $\cdot\text{NO}_2$ ) esto facilita la formación de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ). La formación de nitritos favorece la nitrosilación de proteínas, mediante la formación de nitrotirosinas, así altera las reacciones dependientes de tirosin-kinasas, importantes por su papel como mensajeras intracelulares.



## 3.2. Canales de potasio (K<sup>+</sup>)

### Clasificación de los canales de K<sup>+</sup>

En las células endoteliales y en las células del músculo liso se expresan diferentes tipos de canales de K<sup>+</sup> (Figura 19 y 20) (Jackson, 2005; Ko y col., 2008; Wrzosek, 2009).

- 1) Canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (K<sub>v</sub>).
  
- 2) Canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> (K<sub>Ca</sub>) incluyendo los de gran conductancia (BK<sub>Ca</sub> ó K<sub>Ca</sub>), los de conductancia intermedia (IK<sub>Ca</sub> ó K<sub>Ca</sub>) y los de pequeña conductancia (SK<sub>Ca</sub> ó K<sub>Ca</sub>)  
.
  
- 3) Canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP (K<sub>ATP</sub>)
  
- 4) Canales de K<sup>+</sup> de rectificación hacia el interior (K<sub>IR</sub>)

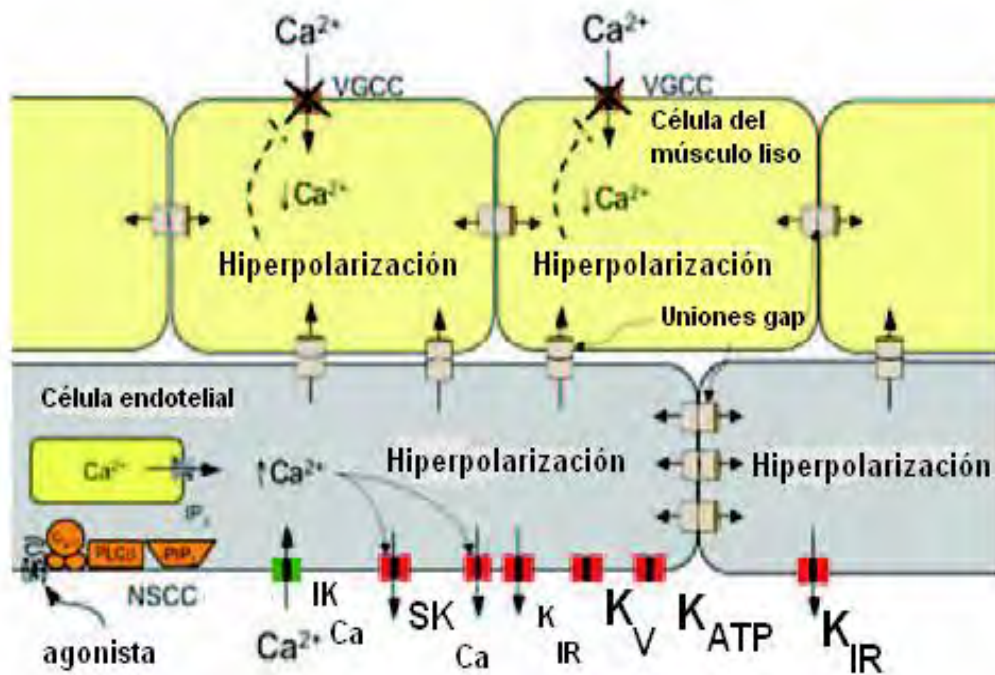


Figura 19: Los canales de  $K^+$  que se localizan en la célula endotelial de las arteriolas son:  $IK_{Ca}$ ,  $SK_{Ca}$ ,  $K_{IR}$ ,  $K_V$ ,  $K_{ATP}$  y varios tipos de canales catiónicos no selectivos (NSCC), su activación conduce a hiperpolarización de la membrana. Agonistas como Ach y BK, estimulan a sus receptores acoplados a proteína G y activan  $PLC_\beta$ , la  $PLC_\beta$  actúa sobre los fosfolípido de membrana y libera inositol 1, 4,5-trifosfato ( $IP_3$ ). El  $IP_3$  activa a sus receptores que se localizan en el retículo endoplásmico liso (RE) y libera  $Ca^{2+}$ , el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  activa  $IK_{Ca}$  y/o  $SK_{Ca}$ , lo cual estimula la salida de  $K^+$  de la célula endotelial y produce hiperpolarización de la membrana celular. Las células endoteliales presentan uniones tipo gap, por lo tanto la hiperpolarización celular puede ser transmitida a otra célula endotelial y a las del músculo liso, conduciendo a la hiperpolarización de las células del músculo liso, cierre de canales VGCC, reducción en la  $[Ca^{2+}]_i$  y vasodilatación. La transmisión de la hiperpolarización a través de uniones gap a células adyacentes también puede activar canales  $K_{ir}$  en esas células y seguir la conducción de la hiperpolarización por grandes distancias a través del endotelio. (Modificada de Jackson WF. 2005; 12(1):113-27).

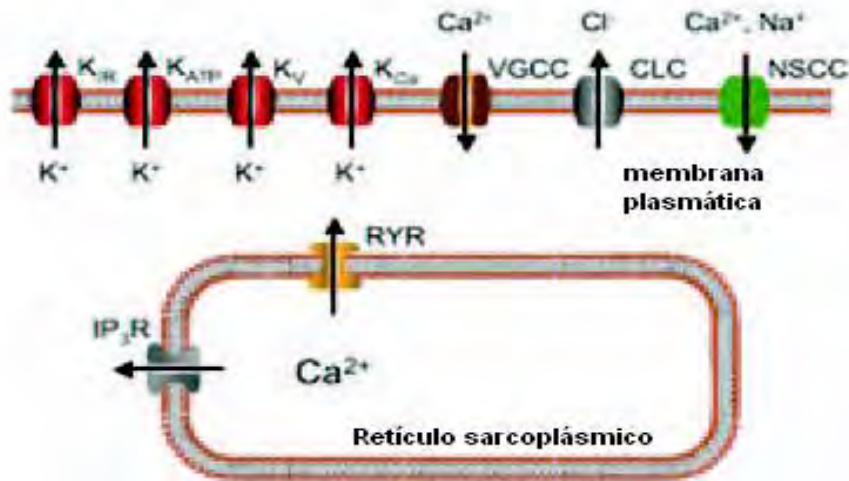


Figura 20: Los canales de K<sup>+</sup> que se localizan en las células del músculo liso de las arteriolas son: K<sub>IR</sub>, K<sub>ATP</sub>, K<sub>V</sub>, K<sub>Ca</sub>. Además expresa canales de Ca<sup>2+</sup> como VGCC, canales de cloro (Cl<sup>-</sup>) (CLC) y canales NSCC. (Modificada de Jackson WF., 2005).

### 1) Canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (K<sub>v</sub>).

Los canales K<sub>v</sub> se expresan en el músculo liso y se abren en respuesta a una despolarización de la membrana, la salida de K<sup>+</sup> restaura el potencial de membrana en reposo; sin embargo, puede ocurrir un periodo breve de hiperpolarización. Una vez que se restaura el potencial en reposo, los canales de K<sup>+</sup> se cierran (Jackson ,2005; Féléto y Vanhoutte, 2006; Ko y col., 2008).

## 2) Canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup>.

Los canales BK<sub>Ca</sub> se expresan en todas las células del músculo liso (Jackson, 2005) y también en las células endoteliales (Wrzosek, 2009). Se han descrito tres tipos de canales de potasio dependientes de calcio (K<sub>Ca</sub>): **BK<sub>Ca</sub>**, **IK<sub>Ca</sub>** y **SK<sub>Ca</sub>**. Los canales se abren ante un cambio en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y despolarización de la membrana. La salida de K<sup>+</sup> que resulta de la activación del canal BK<sub>Ca</sub> se usa para contrarrestar la despolarización inducida por agonistas contráctiles (Figura 21) (Jackson, 2005; Ko y col., 2008). Los agonistas que estimulan a sus receptores de membrana acoplados a proteína G, incrementan la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y activa a los canales SK<sub>Ca</sub> e IK<sub>Ca</sub>. La hiperpolarización de las células endoteliales a su vez favorece la entrada de Ca<sup>2+</sup>. El Ca<sup>2+</sup> participa en la activación de la NOS (Figura 21) (Sheng y Braun, 2007).

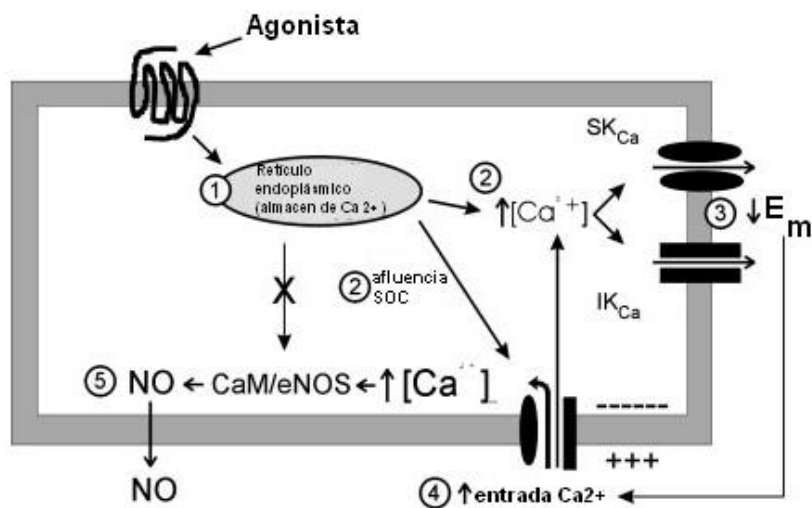


Figura 21: Participación de los canales SK<sub>Ca</sub> e IK<sub>Ca</sub>. Agonistas estimulan a receptores de membrana acoplados a proteínas G y producen la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico (paso 1). El incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico activa a los canales SK<sub>Ca</sub> e IK<sub>Ca</sub> (paso 2) y produce hiperpolarización de las células endoteliales y a su vez favorece la entrada de Ca<sup>2+</sup>. El Ca<sup>2+</sup> participa en la activación de la eNOS y la producción de NO (paso 5). (Modificada de: Sheng JZ, Braun AP., 2007).

Además el canal  $IK_{Ca}$  participa en la hiperpolarización del músculo liso en forma dependiente del endotelio, esto puede darse por acoplamiento eléctrico a través de las uniones gap-mioendoteliales. Los canales  $K_{IR}$  también participan en la hiperpolarización del músculo liso (Figura 22 ) (Félétou ,2009).

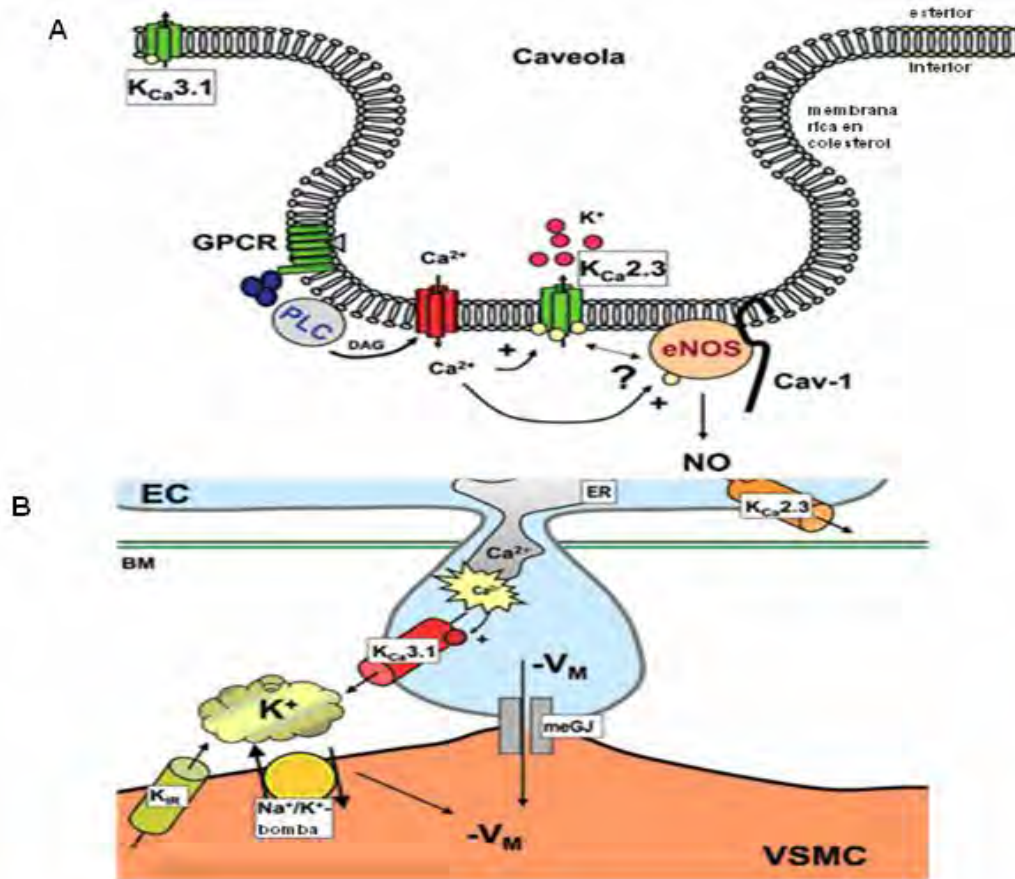


Figura 22: A) Participación del canal  $SK_{Ca}$  o  $K_{Ca}$  en la producción de NO. B) Participación del canal  $IK_{Ca}$  o  $K_{Ca}$  en la relajación del músculo liso esta puede darse por acoplamiento eléctrico directo a través de uniones gap-mioendoteliales. Los canales  $K_{IR}$  participan en la hiperpolarización del músculo liso. (Modificada de: Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R., 2009).

### **3) Canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP (K<sub>ATP</sub>)**

Los K<sub>ATP</sub> se identificaron por primera vez en el músculo cardiaco y posteriormente en células del músculo liso. El bloqueo de estos canales conduce a vasoconstricción y despolarización de la membrana celular en varios tipos de músculo liso vascular. Por lo tanto la activación o apertura de estos canales conduce a vasodilatación (Jackson ,2005; Ko y col., 2008).

### **4) Canales de K<sup>+</sup> rectificadores hacia el interior (K<sub>IR</sub>)**

Son abundantes en músculo liso, aunque su función es aun desconocida, se ha sugerido que participa en:

- 1) Mantener el potencial de membrana en reposo y el tono vascular del músculo liso vascular de vasos calibre pequeño.
- 2) Participan en la vasodilatación inducida por altas concentraciones de K<sup>+</sup> extracelular (Jackson ,2005; Ko y col., 2008).

## Participación de los canales de $K^+$ en el control del tono vascular.

Los canales de  $K^+$  participan en el control del tono vascular. El movimiento de los iones a través de los canales, determina en gran parte el potencial de membrana ( $E_m$ ). La activación de los canales de  $K^+$  produce el flujo de iones  $K^+$  al espacio extracelular del músculo liso, lo cual produce hiperpolarización de la membrana, al contrario, el cierre de estos canales produce despolarización de la membrana. Cuando se produce hiperpolarización de la membrana sobreviene la vasodilatación, en cambio con la despolarización de la membrana se produce vasoconstricción (Figura 23) (Jackson, 2005; Félétou y Vanhoutte, 2009).

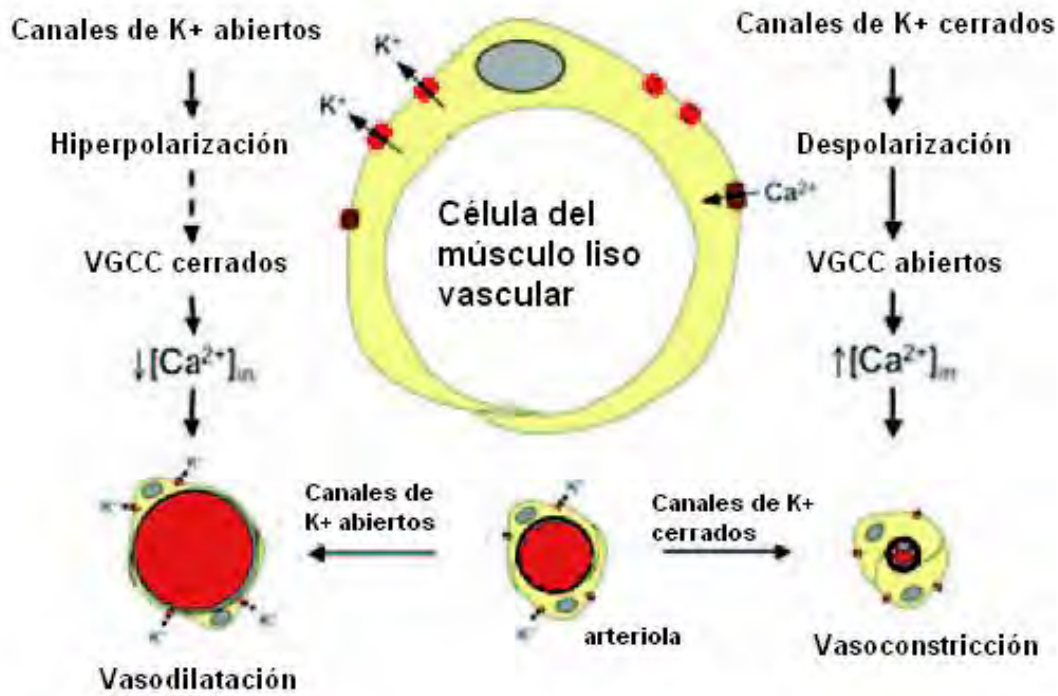


Figura 23: Los canales de  $K^+$  regulan el tono vascular afectando el potencial de membrana ( $E_m$ ). Modificada de Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. (Modificada de :Microcirculation.; 12(1):113-27; 2005).

Las relajaciones en respuesta a vasodilatadores como NO y PGI<sub>2</sub> son asociados con la hiperpolarización de las células del músculo liso. Estos pueden abrir los siguientes canales en el músculo liso: K<sub>ATP</sub>, K<sub>v</sub>, K<sub>ir</sub>, K<sub>2p</sub>, y BK<sub>ca</sub>. Por otro lado, vasoconstrictores como endotelina (ET-1) y angiotensina II (Ang II) pueden cerrar canales K<sup>+</sup> provocando vasoconstricción (Figura 24) (Ko y col., 2008; Félétou, 2009).

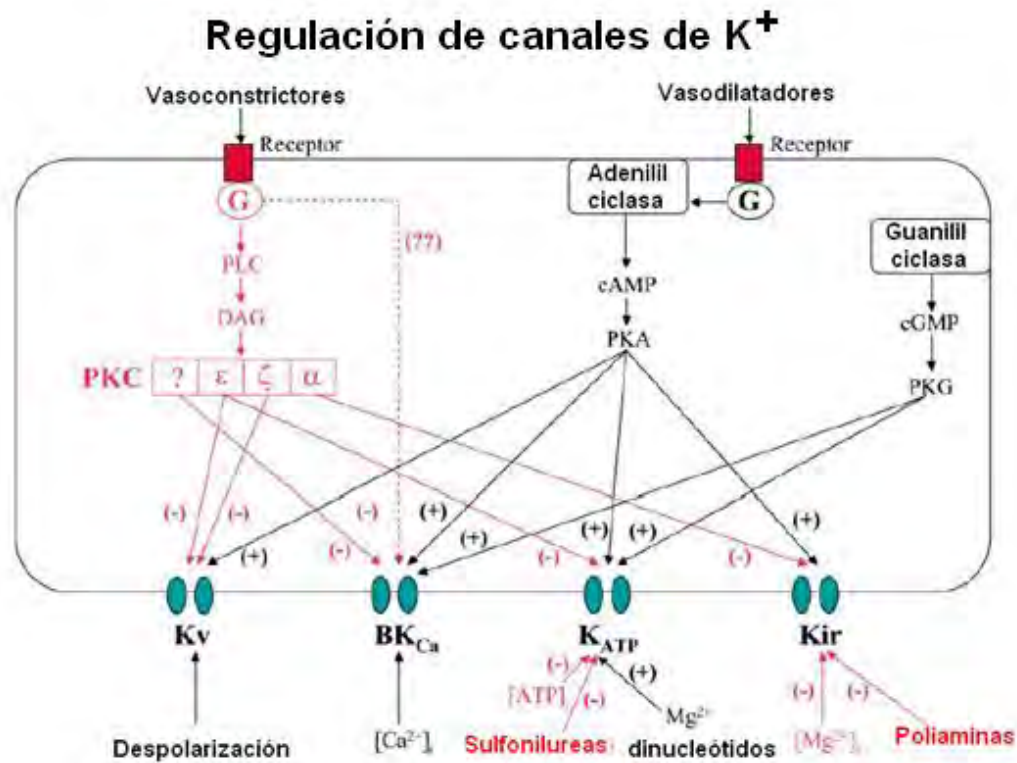


Figura 24: Vasodilatadores como PGI<sub>2</sub> y NO pueden causar vasodilatación del músculo liso a través de la activación de canales de K<sup>+</sup> (K<sub>v</sub>, BK<sub>Ca</sub>, K<sub>ATP</sub>, K<sub>ir</sub>). Por el contrario, la inhibición (cierre) de los canales de K<sup>+</sup> por los vasoconstrictores disminuye la salida de K<sup>+</sup> y abre los canales de Ca<sup>2+</sup>, incrementando así el E<sub>m</sub> lo que lleva a la despolarización y vasoconstricción. (Modificada de: Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS., 2008).



### **3.3 Peróxido de Hidrogeno ( $H_2O_2$ ).**

El  $H_2O_2$  también es considerado un EDHF (Gao y col., 2011).

#### **Síntesis del $H_2O_2$**

La actividad del citocromo P450, COX, lipooxigenasa, xantina oxidasa, NADPH oxidasa, el desacople de la eNOS y la cadena respiratoria genera superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). La interacción de  $O_2^{\cdot-}$  con el NO produce nitritos ( $ONOO^-$ ) y por lo tanto disminuye la concentración de NO. Por otro lado la superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$  en oxígeno molecular ( $O_2$ ) y  $H_2O_2$  (Figura 25)(Félétou y Vanhoutte, 2006; Félétou, 2009; Shimokawa, 2010).

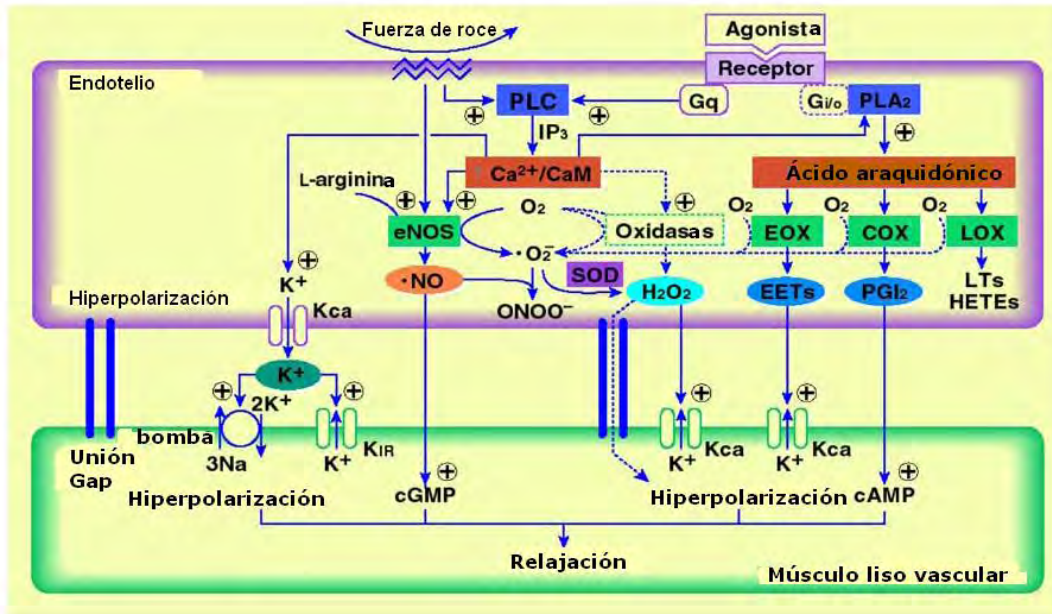


Figura 25: La actividad de citocromo P450, COX y lipooxigenasa genera superóxido ( $O_2^-$ ). La interacción de  $O_2^-$  con el NO produce nitritos ( $ONOO^-$ ) y por lo tanto disminuye la concentración de NO. Por otro lado la superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de  $O_2^-$  en oxígeno molecular ( $O_2$ ) y  $H_2O_2$ . (Modificada de: Shimokawa H., 2010).

En los vasos sanguíneos hay 3 isoformas de SOD, enzimas que utilizan cofactores como cobre (Cu), Zinc (Zn) y Manganese (Mn). La SOD con cobre o Zinc (Cu-Zn-SOD) se localizan principalmente en el citosol, lo cual prolonga la vida media del NO. La SOD con Mn (Mn-SOD) se localiza en la mitocondria y dismuta  $O_2^{\cdot-}$  derivado de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 26)(Shimokawa, 2010).

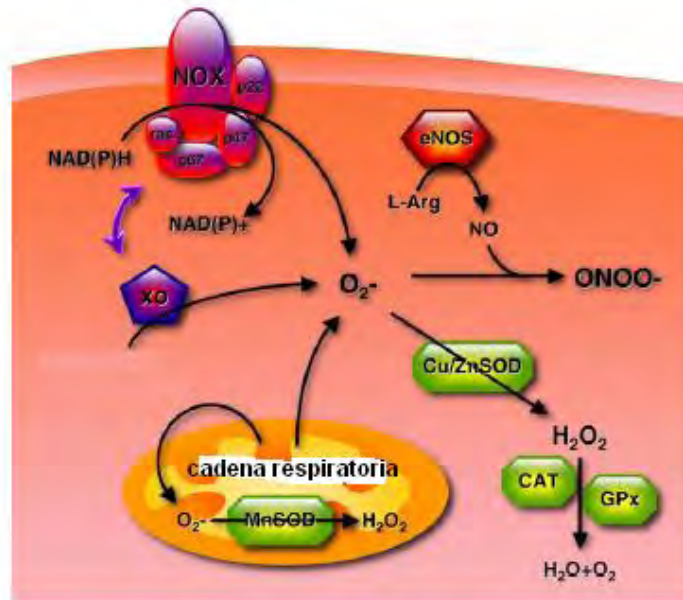


Figura 26: La Cu-Zn-SOD se localiza principalmente en el citosol, lo cual prolonga la vida media del NO. La Mn-SOD se localiza en la mitocondria.

La SOD extracelular (ecSOD) dismuta el  $O_2^{\cdot -}$  extracelular para proteger la difusión de NO. La Cu, Zn-SOD es la isoforma que participa en la síntesis de  $H_2O_2$  /EDHF. El  $H_2O_2$  producida en el endotelio, difunde hacia la célula muscular lisa y causa vasodilatación por activación de los canales  $BK_{Ca}$ , que se localizan en el músculo liso (Figura 27) (Félétou y Vanhoutte, 2006; Félétou, 2009; Shimokawa, 2010):

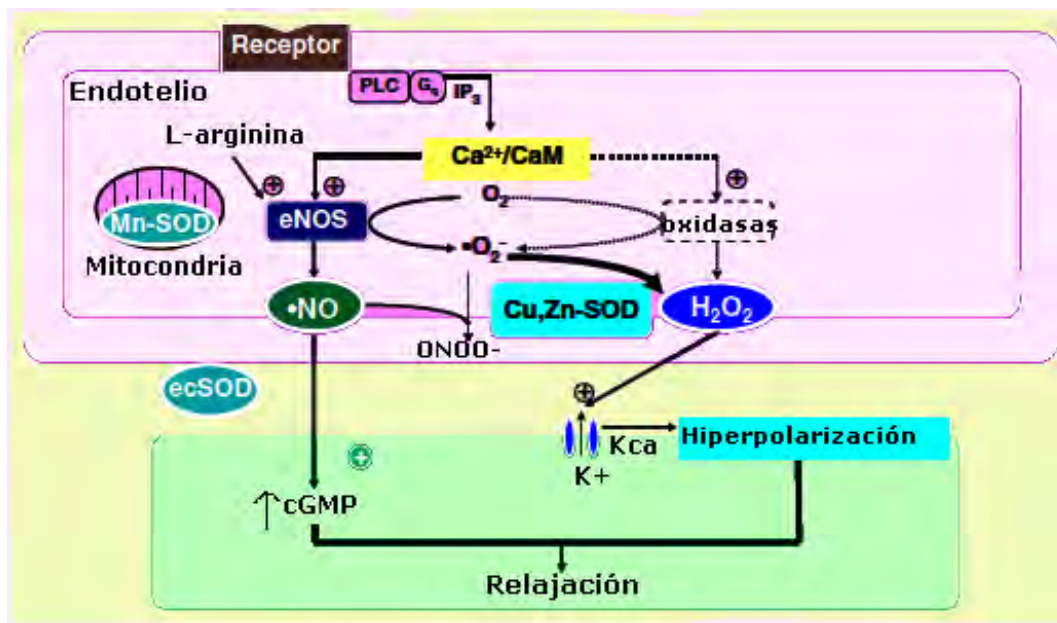


Figura 27: En el endotelio las tres isoformas de la SOD están presentes: Cu, Zn-SOD en la membrana celular, Mn-SOD en la mitocondria y la ec-SOD que se localiza en el espacio extracelular. Cu, Zn-SOD es la isoforma que participa en la síntesis de  $H_2O_2$  /EDHF. (Modificada de: Shimokawa H., 2010).

Recientemente se ha sugerido que en las arterias, las tres NOS son importante para la producción de NO, mientras que en los microvasos producen  $O_2^{\cdot-}$  y la Cu, Zn-SOD genera  $H_2O_2/EDHF$ , lo cual contribuye en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular (Figura 28) (Shimokawa, 2010).

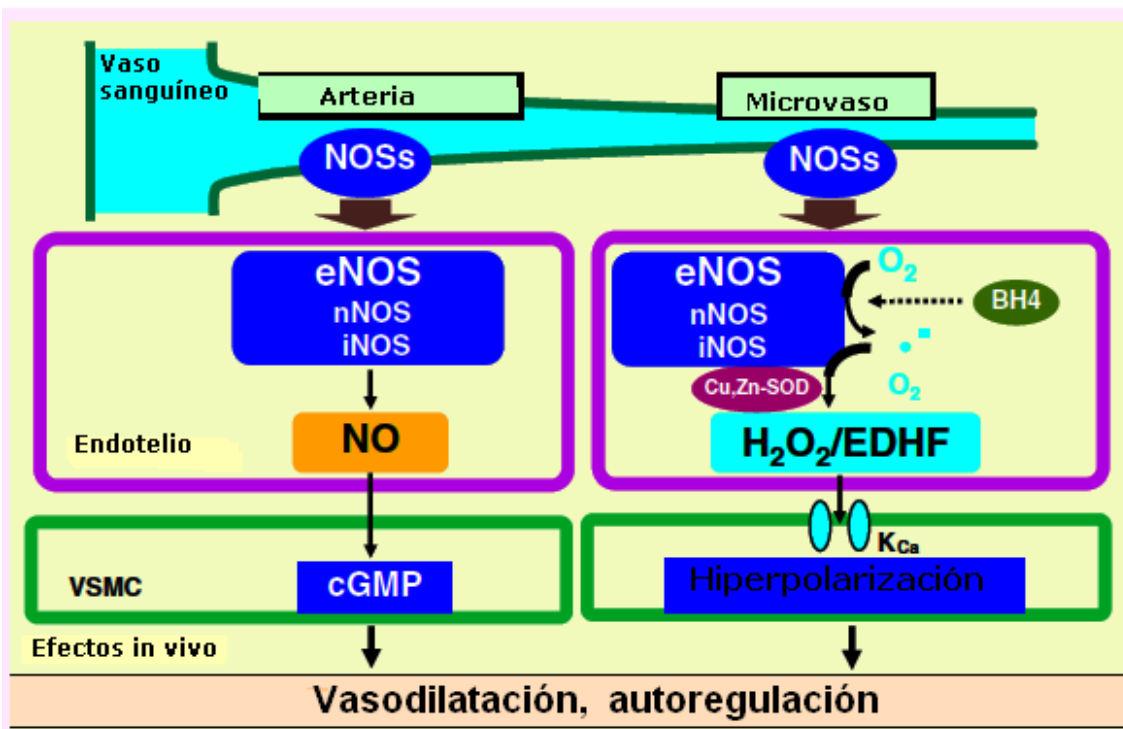


Figura 28. Importancia del  $H_2O_2/EDHF$  en los microvasos para producir vasodilatación.

(Modificada de: Shimokawa H., 2010).

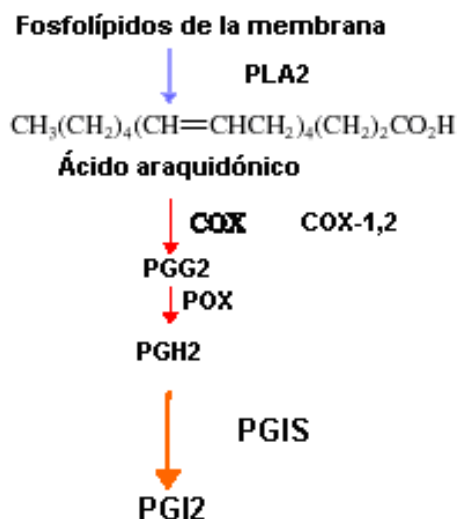
### 3.4 Metabolitos del ácido araquidónico vasodilatadores

#### 3.4.1. Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)

##### Síntesis de PGI<sub>2</sub>

La fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) libera el ácido araquidónico (AA) a partir de los fosfolípidos de la membrana plasmática. Una vez liberado el AA es metabolizado por las ciclooxigenasas (COXs). Las COXs están presentes en 2 isoformas: ciclooxigenasa-1 (COX-1) que se expresa de manera constitutiva y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) que se induce en los sitios de inflamación (Kawabe y col., 2010).

Las COXs tienen 2 actividades enzimáticas: actividad de oxigenasa y de peroxidasa, por lo tanto primero libera a la prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) y posteriormente a la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) a partir de la PGG<sub>2</sub>. La PGH<sub>2</sub> es el sustrato para la sintasa de prostaciclina (PGIS), la cual libera PGI<sub>2</sub> (Figura 29) (Kawabe y col., 2010).



## Síntesis de NO Y PGI<sub>2</sub> en las células endoteliales.

Cuando las células endoteliales son estimuladas por agonistas como la ACh se incrementan el Ca<sup>2+</sup> intracelular, esto origina que se co-liberen NO y PGI<sub>2</sub>. El Ca<sup>2+</sup> es el paso necesario para la activación de la NOS III así como de la PLA<sub>2</sub>, lo cual estimula la síntesis de NO y PGI<sub>2</sub> (Figura 30) (Mitchell y col., 2008).

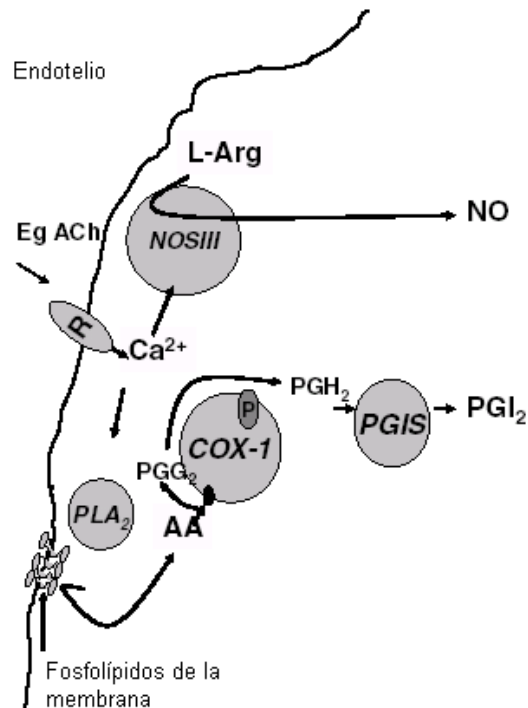


Figura 30: Síntesis de NO y PGI<sub>2</sub> por las células endoteliales. Cuando las células endoteliales son estimuladas por fuerzas físicas o por la ACh a través de receptores (R), aumenta la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular. El incremento de Ca<sup>2+</sup> activa a la NOS III y a la PLA<sub>2</sub>. La NOS III activada forma NO a partir de L-arginina. La PLA<sub>2</sub> activada libera AA de los fosfolípidos de la membrana celular, y a partir del AA la PGIS libera PGI<sub>2</sub>. (Modificada de: Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS., 2008).

Es importante señalar que aunque el NO y PGI<sub>2</sub> son co-liberados por las células endoteliales, las cinéticas de liberación son diferentes para ambas. El NO es liberado continuamente mientras las células son estimuladas, en tanto que la PGI<sub>2</sub> es liberada de manera transitoria. Las diferencias temporales en la liberación de NO y PGI<sub>2</sub> resultan de los requerimientos específicos de Ca<sup>2+</sup> para la NOS III y la PLA<sub>2</sub>. La activación de la PLA<sub>2</sub> requiere de una concentración alta de Ca<sup>2+</sup>, la cual se obtiene en los primeros minutos de haber estimulado a las células (Mitchell y col., 2008). La NOS III requiere de una menor concentración de Ca<sup>2+</sup> en comparación con la PLA<sub>2</sub> y es activada completamente cuando aumenta el nivel de Ca<sup>2+</sup> por el influjo extracelular (Mitchell y col., 2008).



La PGI<sub>2</sub> activa a los receptores IP sobre el músculo liso vascular produciendo vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria (Figura 31) (Félétou y Vanhoutte, 2006). Estos efectos los realiza en forma sinérgica con el NO (Figura 30) (Mitchell y col., 2008). Además contrarresta los efectos vasoconstrictores del tromboxano (TXA<sub>2</sub>) proporcionando un equilibrio importante en la homeostasis cardiovascular (Kawabe y col., 2010; Mitchell y col., 2008).

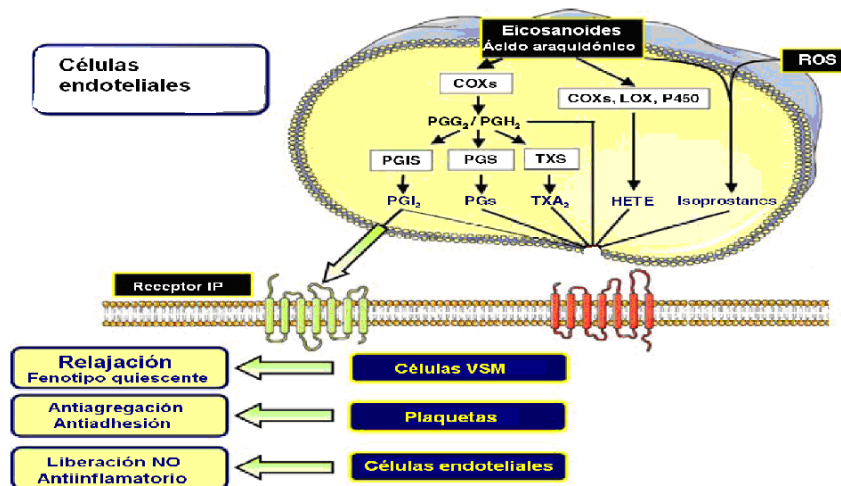


Figura 31: El endotelio libera PGI<sub>2</sub> y se une a los receptores IP en el músculo liso lo cual produce vasorelajación.

La hiperpolarización producida por la  $PGI_2$  implica la apertura de uno o varios tipos de canales de  $K^+$ . Por lo tanto, los  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$ ,  $K_{ir}$  y/o  $K_v$ , pueden estar asociados con la relajación inducida por la  $PGI_2$ . Por lo tanto en algunos lechos vasculares se le considera un factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) (Figura 32) (Félétou y Vanhoutte, 2006). La  $PGI_2$  en algunos lechos vasculares causa relajación por incremento de cAMP en las células del músculo liso (Figura 32) (Mitchell y col., 2008).

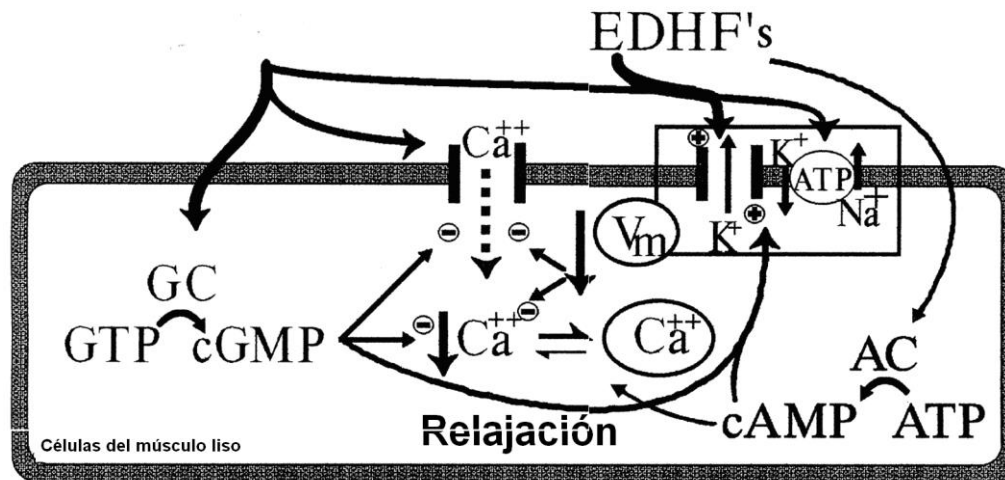


Figura 32: En algunos lechos vasculares a la  $PGI_2$  se le considera un EDHF. En este esquema se muestra como la  $PGI_2$  puede hiperpolarizar a las células del músculo liso vascular por activación de canales de  $K^+$ . La hiperpolarización estimula el cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, lo cual disminuye la  $[Ca^{2+}]_i$ , aumenta la recaptura de  $Ca^{2+}$  en el retículo endoplásmico liso, lo cual disminuye el nivel de  $Ca^{2+}$  libre intracelular y produce relajación. El cAMP generado por adenilato ciclasa (AC) a partir de ATP en respuesta a la  $PGI_2$  y otros agonistas.

### 3.4.2. Ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs).

Los EETs son metabolitos del AA liberados a través de la vía del citocromo P450 (epoxigenasa), causan hiperpolarización de la membrana celular y relajación del músculo liso vascular por la apertura de canales de  $K_{Ca}$  (Figura 33) (Spector y Norris, 2007; Campbell y Falck, 2007).

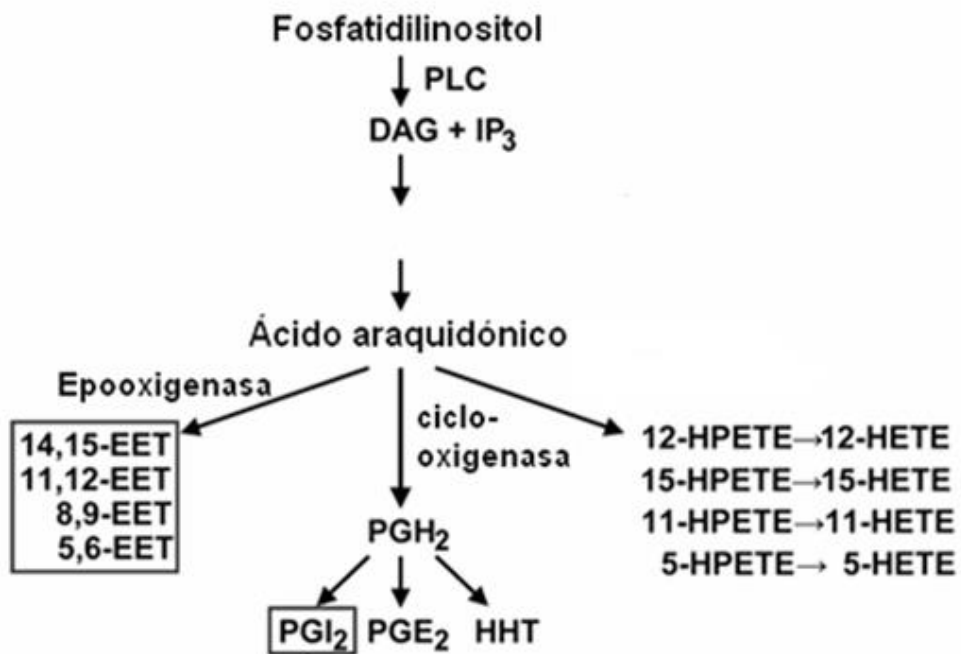


Figura 33: Metabolismo del AA. Las células endoteliales metabolizan el AA por 3 vías, los principales metabolitos de la vía de la epoxigenasa son los EETs, los de la COX son  $PGI_2$ ,  $PGE_2$  y el ácido 12-hidroxieptadecatrienoico (HHT), de la vía de la lipooxigenasa (LO) son los ácidos 12- y 15-Hidroxieicosatetraenoicos (HETEs). (Modificada de: Campbell WB, Falck JR., 2007).

## Mecanismos de acción de los EETs

Los EETs son producidos por el endotelio vascular en respuesta a agonistas como BK y ACh. Los EETs liberados difunden hacia el espacio subendotelial y activan a sus receptores que se localizan en las células del músculo liso vascular, lo cual estimula la apertura de canales de  $K_{Ca}$ . La salida de  $K^+$  a través de estos canales origina que aumente el  $E_m$ , lo cual inhibe la entrada de  $Ca^{2+}$  y finalmente produce relajación vascular (Figura 34) (Campbell y Falck, 2007).

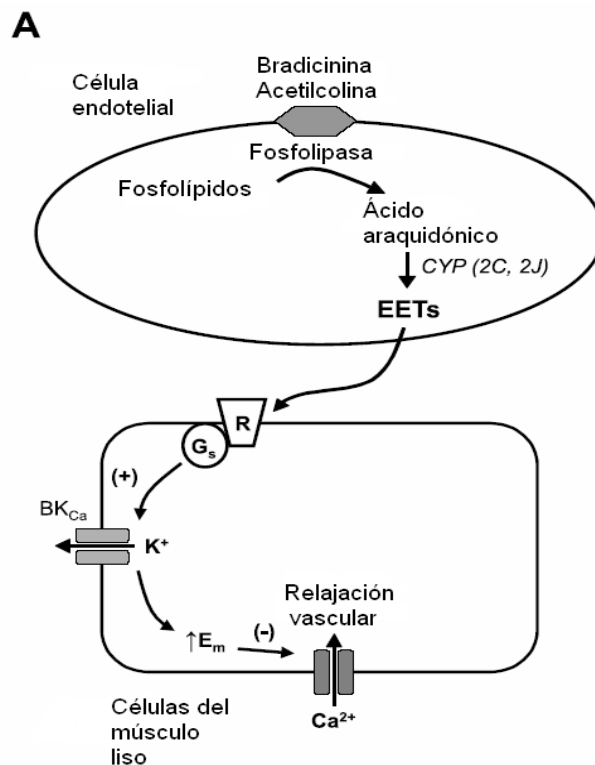


Figura 34: EETs regulan el tono vascular a través de la activación de  $BK_{Ca}$ , en el músculo liso vascular. (Modificada de: Campbell WB, Fleming I., 2010).

El mecanismo antes descrito no es el único a través del cual los EETs producen relajación. En algunas arterias los EETs actúan de manera autocrina y promueven la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo (TRP), este cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la apertura de  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  e  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cuál hiperpolariza al endotelio y libera  $\text{K}^+$  hacia el espacio subendotelial, Además, en este mecanismo intervienen las llamadas uniones Gap que proporcionan un acoplamiento eléctrico entre las células endoteliales y células musculares, lo cual aumenta el  $E_m$ , y disminuye  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , lo cual produce relajación. (Campbell y Falck, 2007). Por otro lado, el  $\text{K}^+$  que fue expulsado al espacio subendotelial estimula a la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y a los canales  $\text{K}_{\text{ir}}$  que se localizan en el músculo liso, lo cual aumenta el  $E_m$ , y disminuye  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , lo cual produce relajación. Algunas arterias usan una combinación de los mecanismos (Figura 35) (Campbell y Falck, 2007)

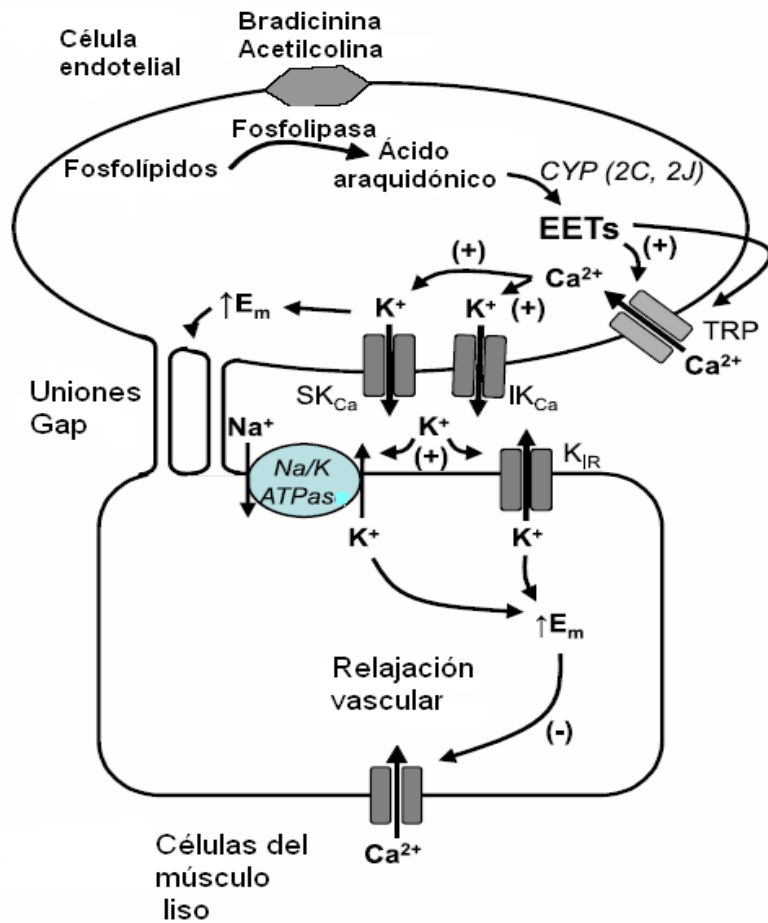


Figura 35: En el endotelio, los EETs actúan en forma autócrina y estimulan la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales TRPV4. El Ca<sup>2+</sup> activa a los canales SK<sub>Ca</sub> e IK<sub>Ca</sub> y produce hiperpolarización endotelial. Las uniones gap proporcionan un acoplamiento eléctrico entre las células endoteliales y células musculares, lo cual favorece la vasodilatación. El K<sup>+</sup> que se localiza en el espacio subendotelial estimula a la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y a los canales K<sub>ir</sub>, lo cual produce hiperpolarización y relajación del músculo liso vascular. (Modificada de: Campbell WB, Fleming I., 2010).

Los EETs liberados por la célula endotelial también pueden activar canales de Ca<sup>2+</sup> (TRPV4) en el músculo liso, aumenta la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular

y activa a los canales BK<sub>Ca</sub>. La salida de K<sup>+</sup> aumenta el E<sub>m</sub> y produce relajación vascular (Figura 36) (Félétou, 2009).

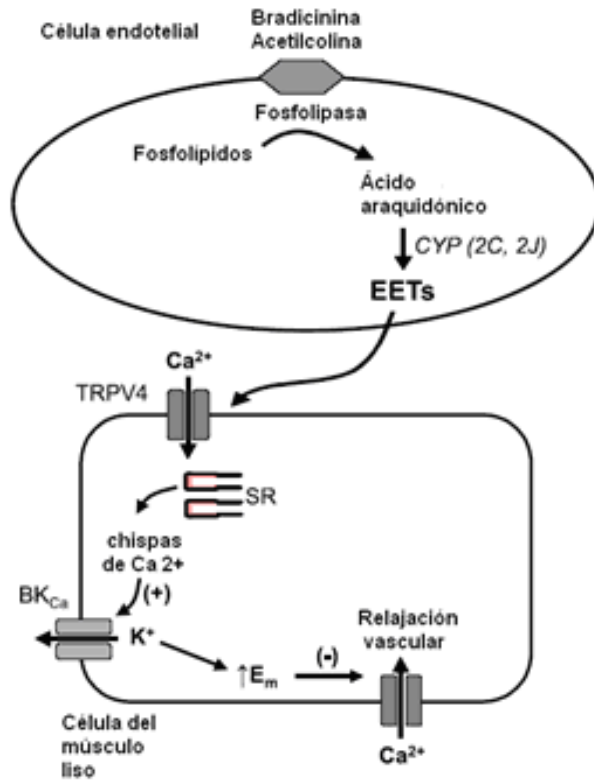


Figura 36: Los EETs liberados del endotelio promueven la activación de los canales BK<sub>Ca</sub> y producen relajación del músculo liso. (Modificada de: Campbell WB, Flemina I., 2010).

Los EETs liberados por el endotelio, se unen a sus receptores acoplados a proteínas G, activan a la AC y produce cAMP. El cAMP estimula a la proteína

cinasa A (PKA), la PKA fosforila a los canales  $K_{ATP}$ , esto favorece la hiperpolarización y relajación vascular (Figura 37) (Féléto, 2009).

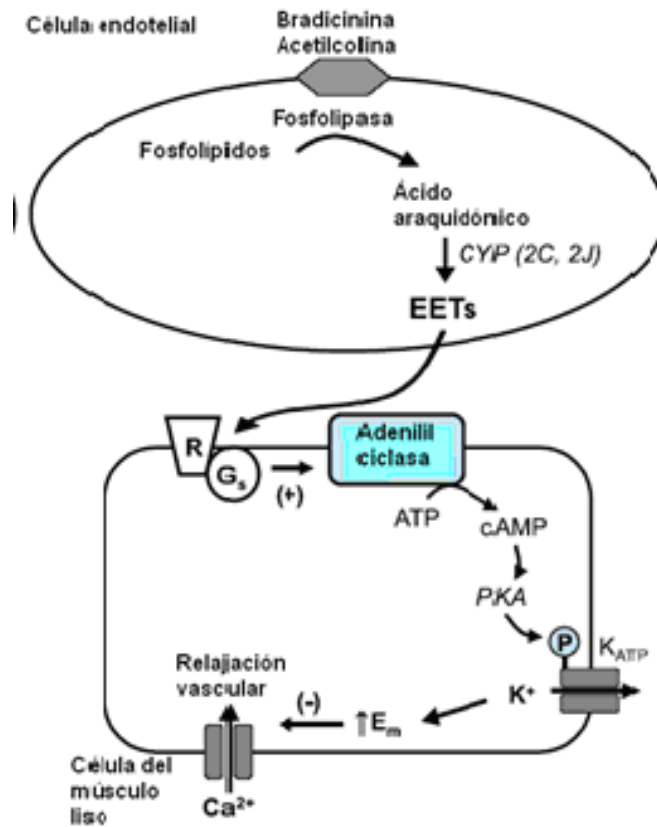


Figura 37: Los EETs liberados del endotelio promueven la activación de los canales  $K_{ATP}$  y producen relajación del músculo liso. Modificada de: Campbell WB, Fleming I., 2010.



Considerando los mecanismos antes descritos, los EETs también han sido propuestos como el EDHF en algunos lechos vasculares (Luksha y col., 2009), así como los iones  $K^+$  y el  $H_2O_2$ . (Figura 38) (Gao y col., 2011).

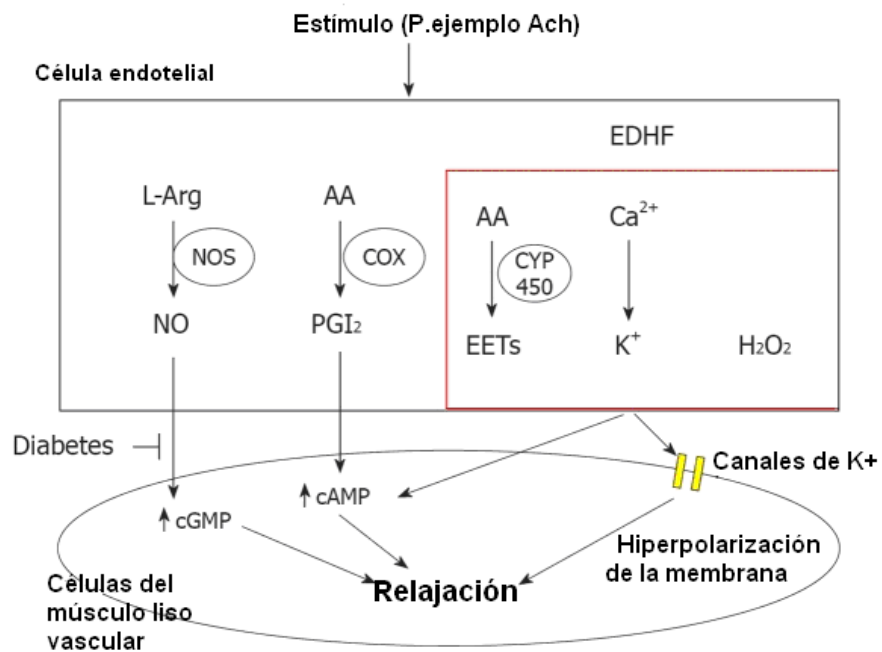


Figura 38. La vasodilatación dependiente del endotelio ocurre en respuesta a estímulos que inducen la liberación de factores que causan relajación de las células del músculo liso vascular adyacentes. Estos factores incluyen NO, PGI<sub>2</sub> y EDHF. Dependiendo de la especie y lecho vascular estudiado, los EDHF incluyen EETs, canales de K<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Modificada de: Gao X, Martínez-Lemus LA, Zhang C. , 2011).

## 4. Vasoconstrictores

### 4.1 Metabolitos del ácido araquidónico vasoconstrictores

#### 4.1.1 Tromboxano (TXA<sub>2</sub>).

El TXA<sub>2</sub> es un metabolito del AA generado por la acción secuencial de 3 enzimas: PLA<sub>2</sub>, COX-1 ó COX-2 y tromboxano sintasa (TXAS). Los efectos del TXA<sub>2</sub> son vía receptores de superficie acoplados a proteínas G denominados receptores TP (isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ ) (Figura 39), los cuales se expresan en plaquetas (TP  $\alpha$  únicamente), macrófagos, células endoteliales y músculo liso. Las acciones son agregación plaquetaria, inflamación, expresión de moléculas de adhesión, contracción y proliferación vascular, respectivamente (Figura 40) (Smyth, 2010).

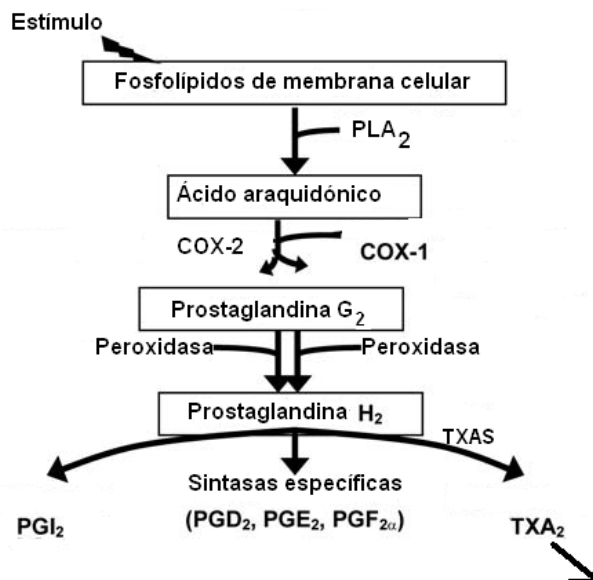


Figura 39: Biosíntesis de TXA<sub>2</sub> en la membrana celular. Agonista como la Ang II estimulan a la PLA<sub>2</sub> y liberan AA. La COX cataliza la conversión de AA en varias prostaglandinas. La prostaglandina H<sub>2</sub> por acción de la TXAS origina TXA<sub>2</sub>, el cual ejerce sus efectos a través de receptores TP  $\alpha$  y  $\beta$ .

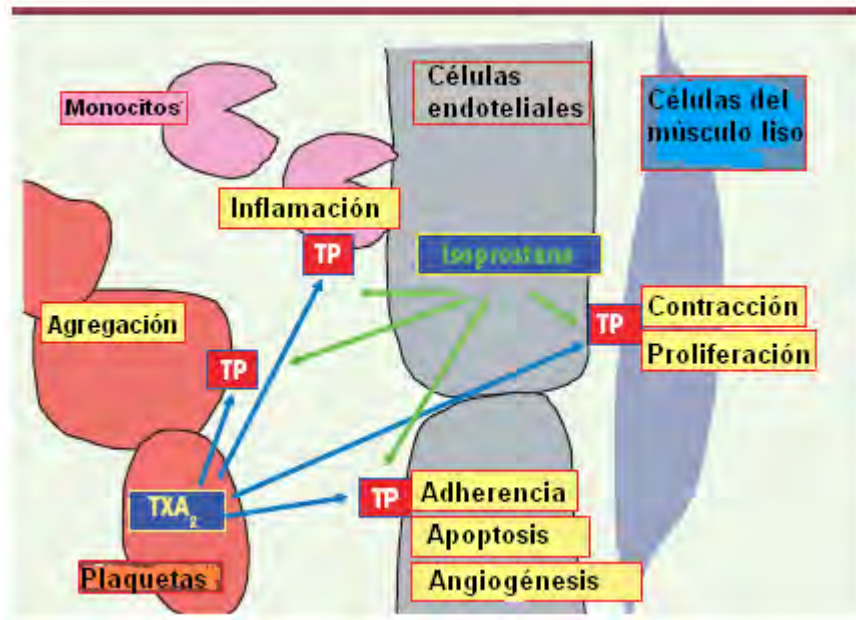


Figura 40: Localización y actividad de los receptores TP. La activación de receptores TP en las plaquetas provoca su agregación, en los monocitos podría estar implicados en el proceso inflamatorio; en el músculo liso causa contracción y proliferación, en las células endoteliales induce la expresión de moléculas de adhesión, apoptosis y angiogénesis. El isoprostano también ejerce sus acciones vía receptores TP. (Modificado de: Verbeuren TJ., 2006).

## **Equilibrio entre la producción de $TXA_2$ por la COX-1 y $PGI_2$ por la COX-2 en lesiones vasculares.**

En condiciones normales, la producción endotelial de  $PGI_2$  es predominantemente dependiente de la COX-1. Sin embargo, en respuesta a una lesión vascular se induce la expresión de la COX-2 para aumentar la producción

de PGI<sub>2</sub>, oponiéndose a los efectos aterogénicos de TXA<sub>2</sub> (Figura 41 ) (Kawabe y col., 2010; Sellers y col., 2010; Smyth, 2010).

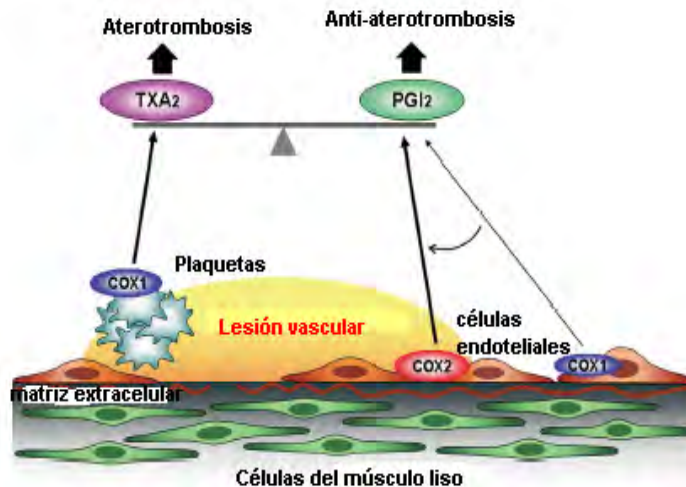


Figura 41: Equilibrio entre la producción de TXA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> por el endotelio para mantener la homeostasis. En condiciones saludables, la producción endotelial de PGI<sub>2</sub> es predominantemente dependiente de la COX-1. Sin embargo, en respuesta al daño vascular, la expresión de la COX-2 se induce en las células endoteliales para aumentar la producción de PGI<sub>2</sub>, oponiéndose al aumento de los efectos aterogénicos de TXA<sub>2</sub>, que es sintetizada a través de la COX-1 por las plaquetas. (Modificado de: Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N., 2010).

El TXA<sub>2</sub> al unirse a los receptores TP inhibe a canales K<sub>v</sub>, produce despolarización de la membrana celular, activa canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje tipo L, incrementa la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y produce vasoconstricción (Figura 42) (Cogolludo, 2003).

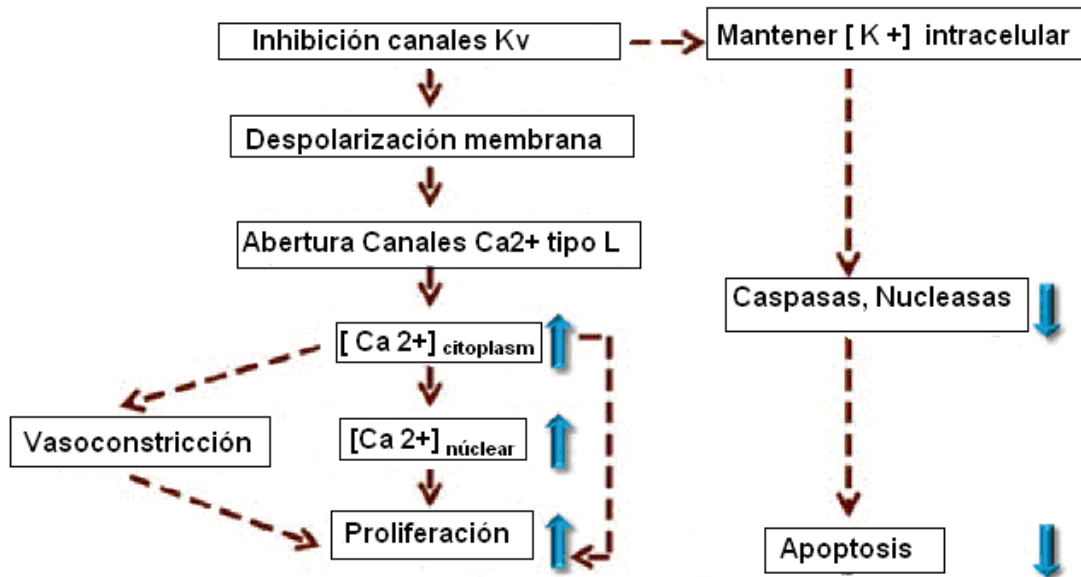


Figura 42: El TXA<sub>2</sub> al unirse a sus receptores TP inhibe canales Kv, esto conduce a una despolarización de la membrana celular, apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L, incrementa el Ca<sup>2+</sup> intracelular (citoplasmico y nuclear), promueve la proliferación celular y vasoconstricción. (Modificado de: Park WS, Firth AL, Han J, Ko EA., 2010).

#### 4.1.2. 20-ACIDO HIDROXIEICOSATETRAENOICO (20-HETE).

El 20-HETE es un metabolito del AA derivado del citocromo P-450 (CYP) (Figura 43) (Stec, 2007; Pat Kunert y Drenjancevic, 2011).

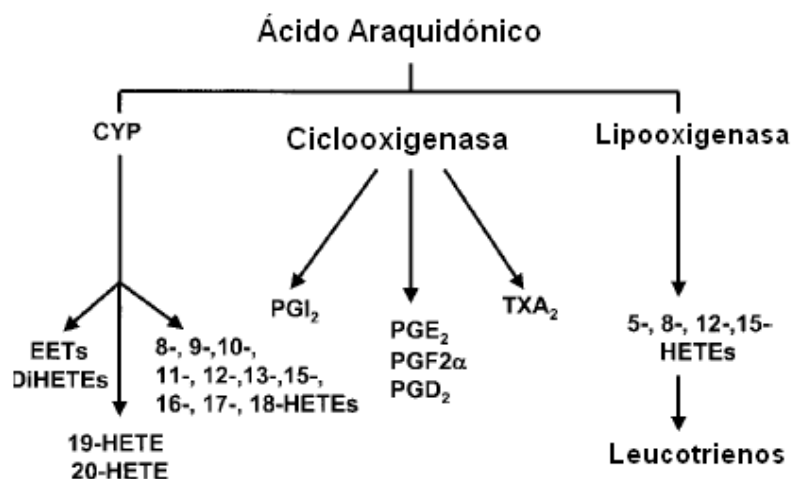


Figura 43: El AA es metabolizado por las enzimas del citocromo P-450 (CYP) en el cerebro, pulmón, riñón y vasculatura periférica a EETs, ácidos dihidroxieicosatetraenoicos (DiHETEs) y 8-,9-,10-,11-,12-,13-,15-,16-,17-,18-,19-,20-HETEs; (Modificado de: Roman RJ.,2002).

La formación de 20-HETE en el músculo liso es estimulada por Ang II, norepinefrina y ET-1, es inhibida por NO y monóxido de carbono (CO)(Figura 44 y 45) (Roman, 2002; Miyata y Roman, 2005; Stec, 2007). En las células del músculo liso, 20-HETE inhibe la actividad de los canales BK<sub>Ca</sub>, produce despolarización de la membrana e incrementa la actividad de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L lo cual

produce vasoconstricción (Figura 44) (Roman, 2002; Stec, 2007; Pat Kunert y Drenjancevic, 2011).

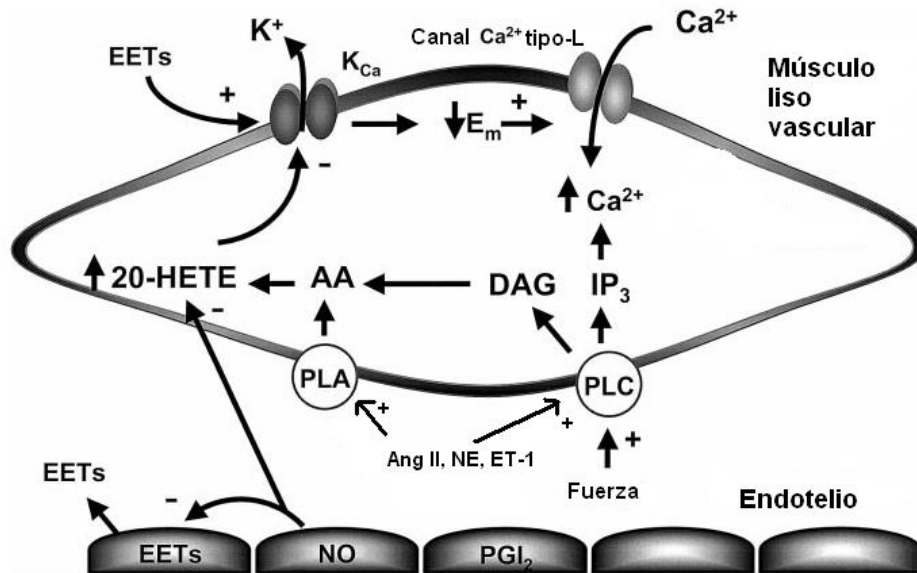


Figura 44: El 20-HETE bloquea canales  $BK_{Ca}$  en células del músculo liso vascular, ocasionando una disminución en el  $E_m$  lo cual aumenta la entrada de  $Ca^{2+}$  por canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje tipo L. Este aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular causa vasoconstricción en el músculo liso. La Ang II, Norepinefrina (NE) y ET-1 estimulan la formación de 20-HETE en el músculo liso.

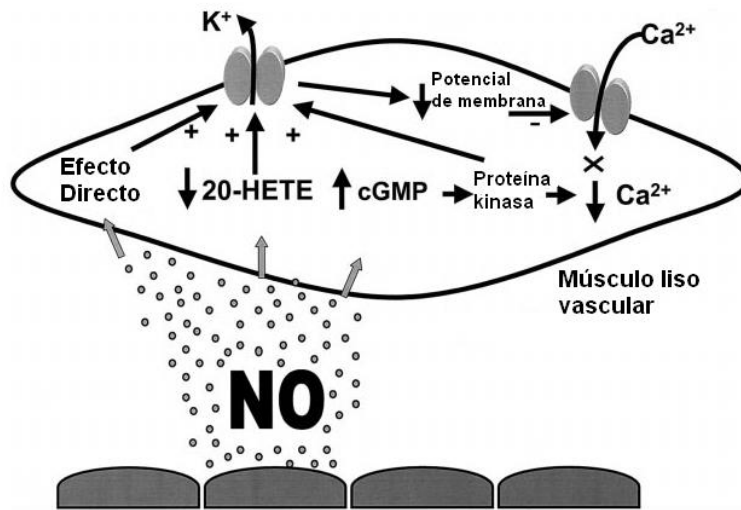


Figura 45: El NO inhibe la formación de 20-HETE. La caída en los niveles de 20-HETE incrementa la actividad de canales BK<sub>Ca</sub>. Esto hiperpolariza la célula y reduce el flujo de Ca<sup>2+</sup> por canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles al voltaje, esta disminución en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular causa vasodilatación de las arterias. El NO también directamente activa canales de K<sup>+</sup>.



El 20-HETE también contribuye a los efectos mitogénicos de una variedad de factores de crecimiento en el músculo liso, células epiteliales renales y células mesangiales (Roman, 2002). Además, se ha demostrado que el 20-HETE activa Rho kinasa y la fosforilación de la cadenas ligeras de miosina (MLC20) y sensibiliza al aparato contráctil de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 46) (Roman, 2002; Stec, 2007; Ishizuka y col., 2008).

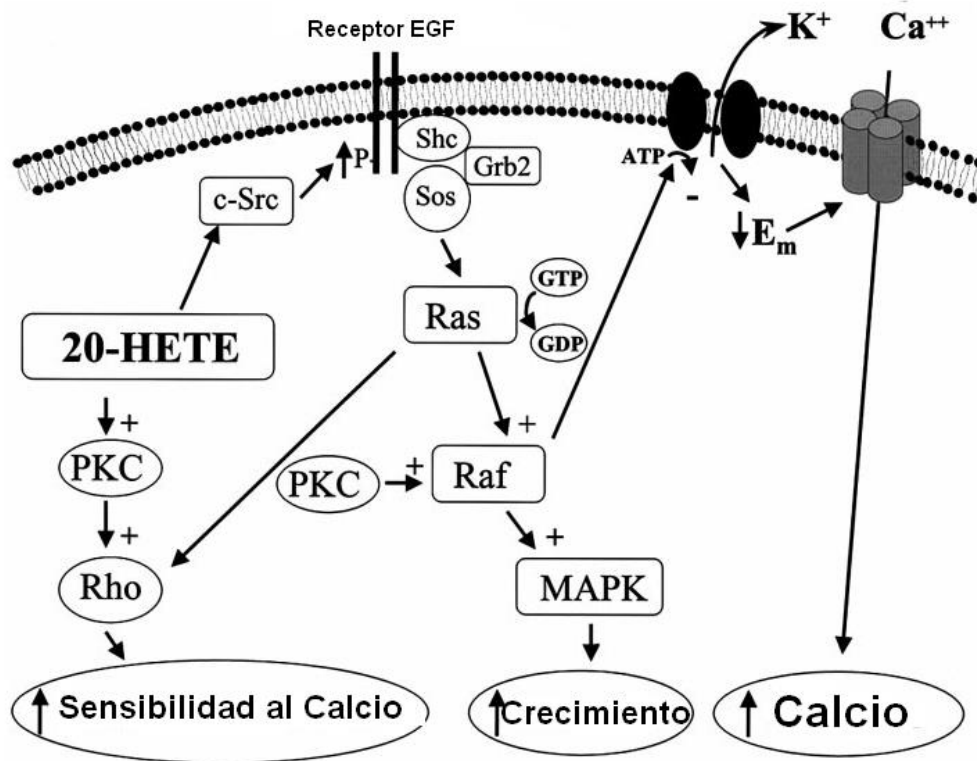


Figura 46: El 20-HETE activa PKC y Rho e incrementa la sensibilidad de mecanismos contráctiles de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En el riñón, el 20-HETE es producido en el túbulo proximal (PT) y en la rama ascendente del asa de Hengle (TALH), por lo tanto regula el transporte de  $\text{Na}^+$  en estos segmentos de la nefrona (Figura 47) (Roman, 2002; Miyata y Roman, 2005; Roman y Lombard, 2007).

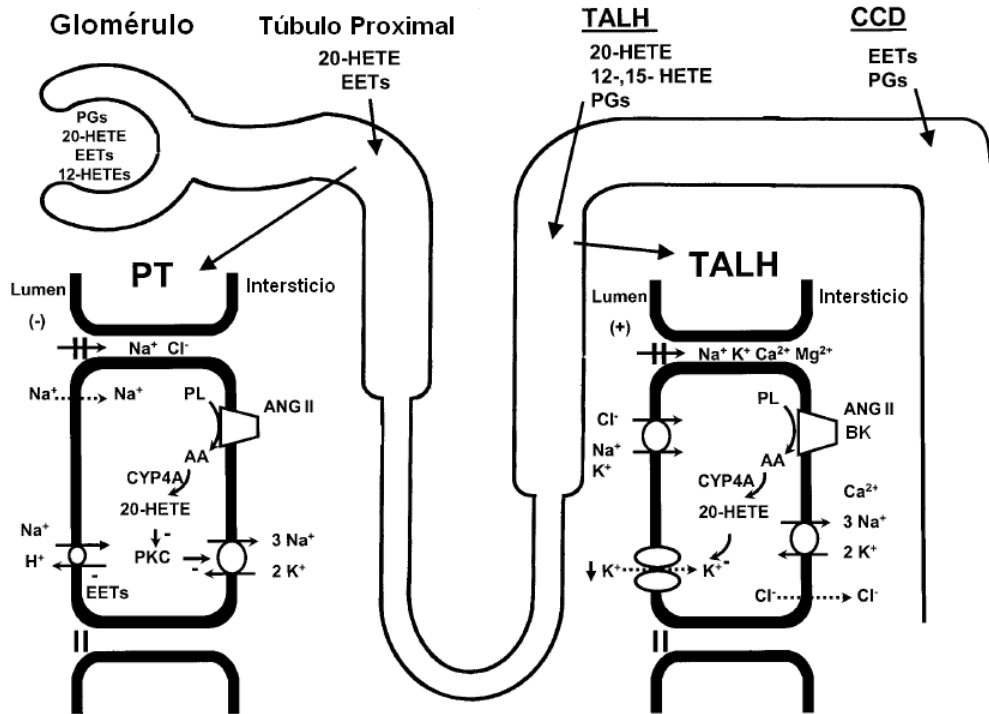


Figura 47: El 20-HETE en el túbulo proximal impide la reabsorción de  $\text{Na}^+$  por inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . En el túbulo proximal la Ang II estimula la formación de 20-HETE, lo cual inhibe la actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . En TALH, el 20-HETE también inhibe un canal de  $\text{K}^+$  en la membrana apical. El bloqueo de este canal limita la biodisponibilidad de  $\text{K}^+$  para el transporte vía el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  y reduce la luz positiva transepitelial que provee la fuerza que maneja la reabsorción pasiva de cationes en esta porción de la nefrona. (Modificado de: Roman R.J., 2002).

Estudios recientes han mostrado que un aumento en la síntesis de andrógenos, catecolaminas y Ang II aumenta la formación de 20-HETE vía CYP-450-4A. Este incremento de 20-HETE aumenta el estrés oxidativo en el riñón y la vasculatura lo cual produce disfunción endotelial e hipertensión (Figura 48) (Roman y Lombard, 2007).

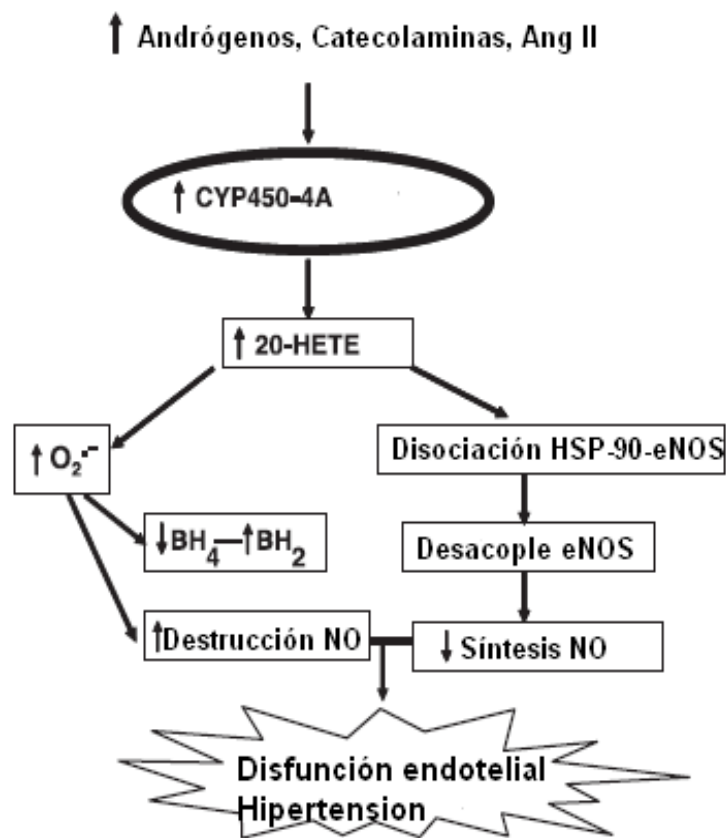


Figura 48: Ang II, ET, andrógenos y catecolaminas incrementan la expresión de las enzimas CYP 4A en la vasculatura. (Modificado de: Roman RJ, Lombard JH., 2007).

## 4.2. Endotelina (ET).

La familia de la ET se compone de 3 péptidos vasoactivos: ET-1, ET-2 y ET-3, cada uno contiene 21 aminoácidos.

El gen de la ET codifica para la pre-proendotelina-1, la cual es convertida a proendotelina-1, esta es hidrolizada y se genera un péptido inactivo de 38 aminoácidos denominado big ET-1. La big ET-1 es hidrolizada por las enzimas convertidoras de ET (ECEs) y libera a la ET-1 (Figura 49) (Agapitov y Haynes, 2002; Böhm y Pernow, 2007).

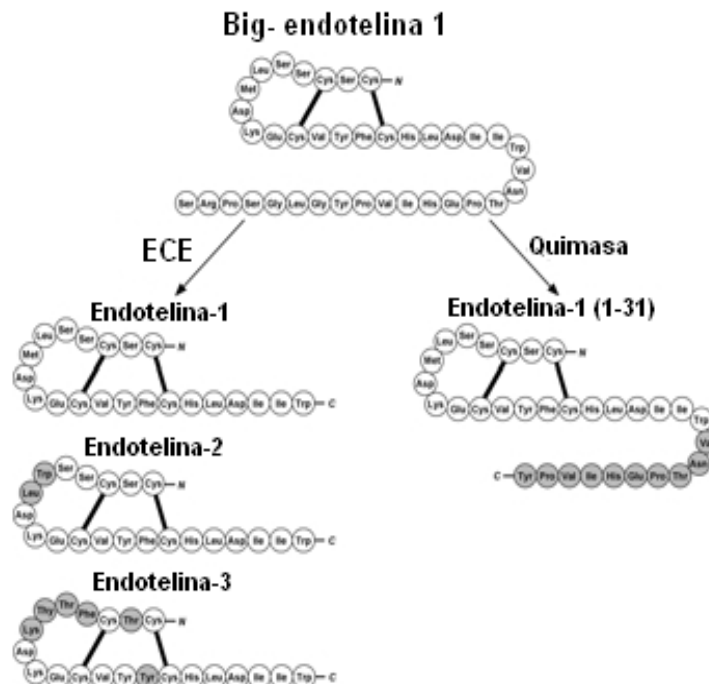


Figura 49: La familia de la ET se compone de 4 isoformas, cada isoforma contiene 2 puentes disulfuro unidos a cisteínas (cys) produciéndose una estructura semicónica. Los círculos más oscuros indican los aminoácidos que son diferentes en cada isoforma. Las 4 isoformas se sintetizan en el endotelio a partir del péptido inactivo big-endotelina 1 esta es hidrolizada por la ECE y la quimasa formándose ET-1 y ET-1(1-31) respectivamente. (Modificado de: Agapitov AV, Haynes WG.,2002).

## Receptores de ET-1.

Las acciones biológicas de la ET-1 son mediadas por 2 subtipos de receptores de membrana: ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. Ambos subtipos de receptores se localizan en el músculo liso y su activación produce vasoconstricción (Figura 50). En las células endoteliales, la estimulación de los receptores ET<sub>B</sub> libera NO y/o PGI<sub>2</sub> lo cual produce vasodilatación (Figura 50) (Agapitov y Haynes, 2002; Böhm y Pernow, 2007).

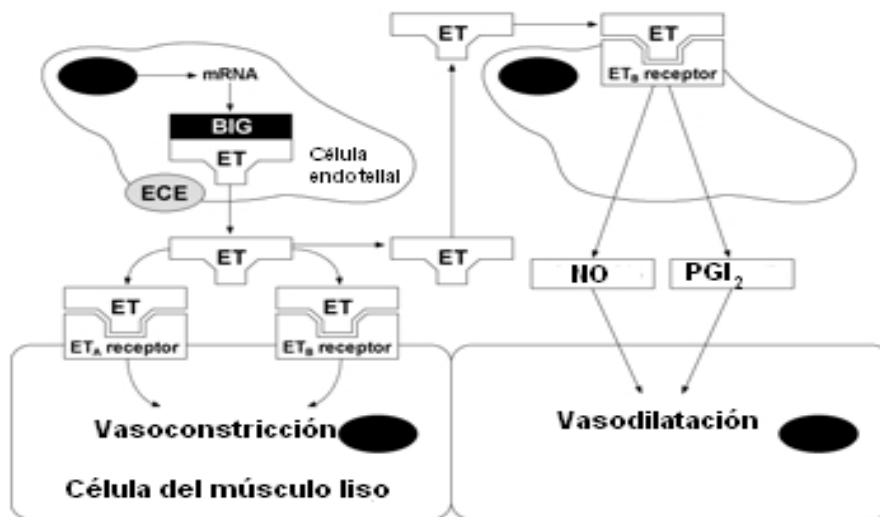


Figura 50: El músculo liso expresa los 2 subtipos de receptores: ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> y su activación produce vasoconstricción. En la célula endotelial se expresa el receptor ET<sub>B</sub> y su activación libera NO y/o PGI<sub>2</sub> cual induce vasodilatación. (Modificado de: Agapitov AV, Haynes WG., 2002).

En el músculo liso, la estimulación de los receptores  $ET_A$  por la ET-1 activa a la PLC, la cual hidroliza los enlaces éster de los fosfolípidos y libera DAG e  $IP_3$ . El DAG activa a la PKC y el  $IP_3$  incrementa la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, lo cual produce vasoconstricción (Figura 51) (Dai y Dai, 2010).

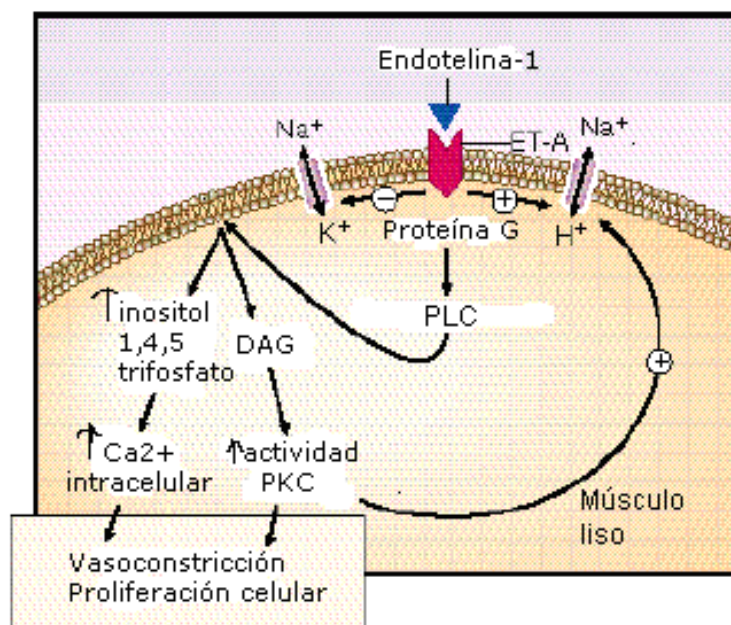


Figura 51: Vía de señalización de la endotelina a través de los receptores  $ET_A$  en el músculo liso. (Modificado de: Goldberg AT, Bond BR, Mukherjee R, New RB, Zellner JL, Crawford FA Jr, Spinale FG., 2000).

La ET-1 también participa en los procesos inflamatorios: activando a los macrófagos, activa el factor de transcripción NF- $K\beta$ , regula la expresión de citocinas (TNF- $\alpha$ , Interleucina-1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6)) y liberación de

radicales libres (Böhm y Pernow, 2007; Kalani, 2008; Abraham y Dashwood, 2008).

Los estímulos que incrementan la producción de ET-1 son: factores de crecimiento, hipoxia, fuerza de roce, Ang II, insulina, LDL, HDL y ROS. Los que inhiben su producción son: NO y las prostaglandinas (Agapitov y Haynes, 2002).

En condiciones fisiológicas, las células endoteliales sintetizan pequeñas cantidades de ET-1 y actúa de forma autocrina/paracrina, la respuesta que predomina es la relajación. Sin embargo, en condiciones patológicas la ET-1 estimula a otras células: células del músculo liso, miocitos cardiacos, macrófagos y leucocitos. En el músculo liso produce vasoconstricción (Figura 52) (Böhm y Pernow, 2007).

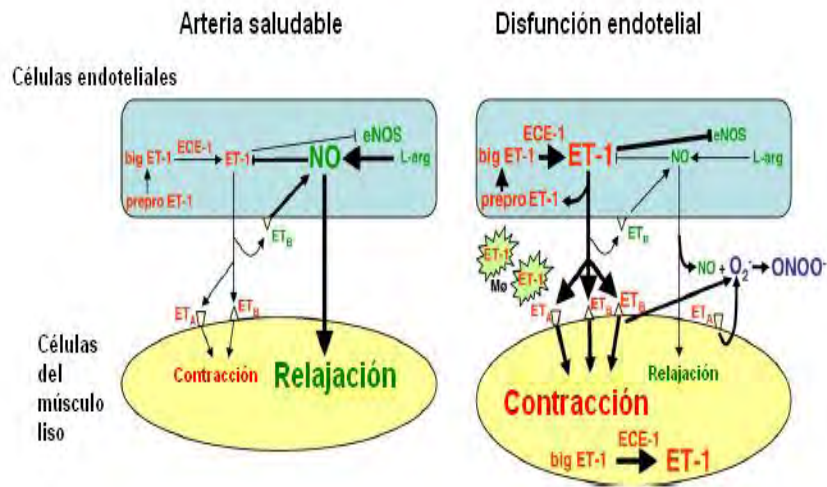


Figura 52: En condiciones fisiológicas, la ET-1 produce relajación vascular, mientras que en condiciones patológicas aumenta su concentración y produce vasoconstricción. (Modificada de: Böhm F, Pernow J. 2007).

### 4.3 Angiotensina II (Ang II).

El sistema renina angiotensina (RAS) está formado por un conjunto de péptidos y enzimas que conducen a la síntesis de la Ang II. Los componentes del RAS son: angiotensinógeno, renina, enzima convertidora de angiotensina (ACE) y Ang II. La renina hidroliza al angiotensinógeno y libera un decapeptido, la angiotensina I; después la ACE separa los dos aminoácidos terminales de la angiotensina I para producir un octapéptido, la Ang II. La ACE también hidroliza a la BK y de esta manera inactiva a un vasodilatador y produce un vasoconstrictor (Figura 53). (Watanabe y col., 2005; Mehta y Griendling, 2007; Ribeiro-Oliveira y col., 2008).

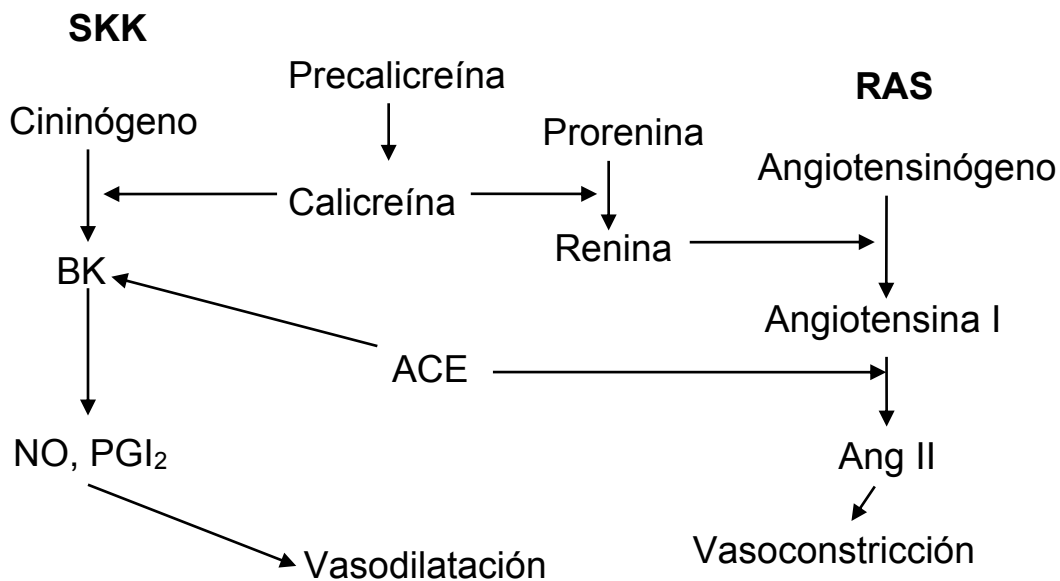


Figura 53: RAS. En la vía clásica del RAS la Ang II se origina a partir del angiotensinógeno de origen hepático, el cual es hidrolizado por la renina que se sintetiza y es liberada por el riñón. La hidrólisis del angiotensinógeno produce Ang I que es inactivo y es hidrolizado por la ACE, la cual se localiza en el endotelio vascular. La hidrólisis de Ang I genera Ang II. La Ang II al interactuar con su receptor AT1 produce vasoconstricción y a través del receptor AT2 produce vasodilatación.



Se ha demostrado que todos los componentes del RAS sistémico también se localizan en el corazón, riñón, glándula adrenal, páncreas, sistema nervioso central, sistema reproductor, tejido linfóide, tejido adiposo y en las **células vasculares** (Ribeiro-Oliveira y col., 2008).

La Ang II afecta a prácticamente todas las **células vasculares** (músculo liso, células endoteliales, fibroblastos, monocitos/macrófagos) por lo tanto su participación es importante en el desarrollo de la disfunción endotelial (Figura 54) (Mehta y Griendling, 2007)

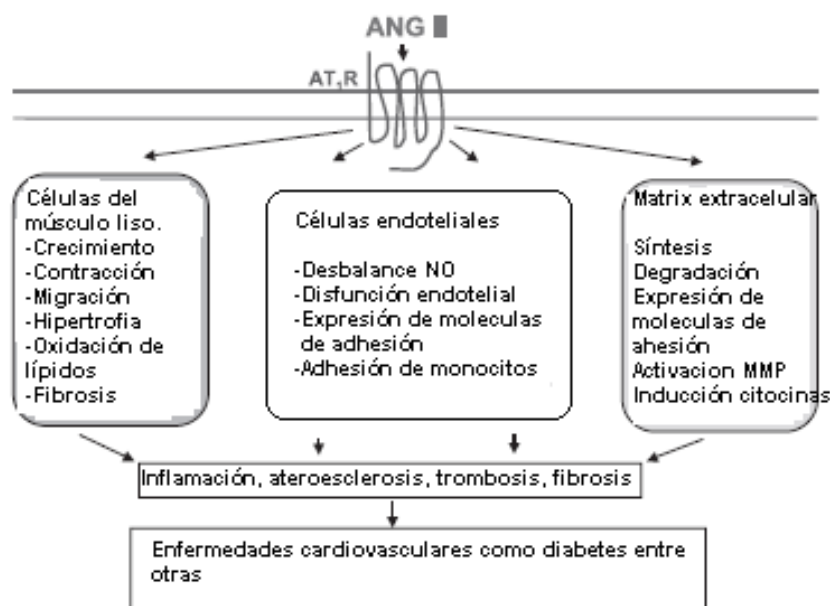


Figura 54: La Ang II ejerce numerosos efectos en el músculo liso, células endoteliales, matriz extracelular. (Modificada de: Mehta PK, Griendling KK., 2007).

La Ang II ejerce sus efectos a través de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> los cuales se acoplan a proteínas G (Watanabe y col., 2005).

En el músculo liso, la Ang II a través de los receptores AT<sub>1</sub> activa a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), fosfolipasa C (PLC), y fosfolipasa D (PLD).

La activación de la PLA<sub>2</sub> conduce a la liberación de AA y sus metabolitos (PGH<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, LTs) lo cuáles al interactuar con sus receptores TP induce vasoconstricción (Viridis y col., 2011). Tales mecanismos contribuyen a la disfunción endotelial (Figura 55) (Mehta y Griendling, 2007).

La activación de la PLC produce IP<sub>3</sub> y DAG. El IP<sub>3</sub> al unirse a sus receptores en el RE abre canales de Ca<sup>2+</sup> y aumenta la concentración de este en el citoplasma, el Ca<sup>2+</sup> se une a la CaM y promueve la interacción de los filamentos de actina y miosina para iniciar la contracción del músculo liso. Por otro lado también el DAG activa a la PKC y esto produce vasoconstricción (Figura 55) (Mehta y Griendling, 2007).

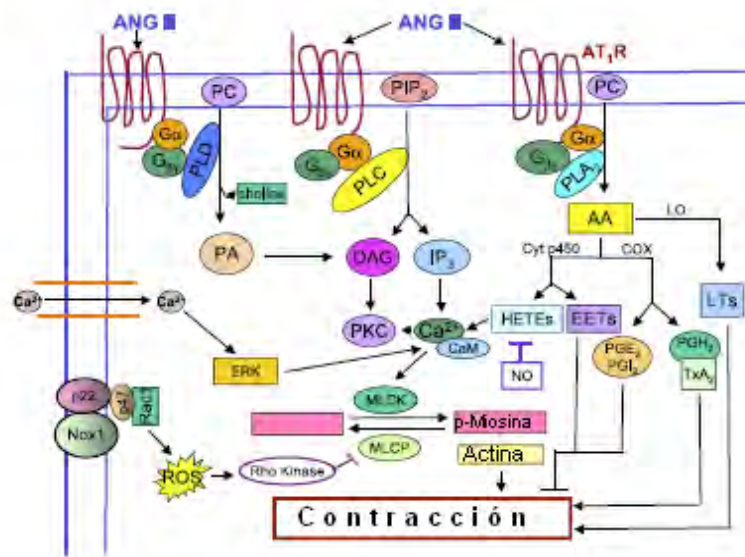


Figura 55: En el músculo liso, la Ang II a través de los receptores AT1 activa a la PLD, PLC y PLA<sub>2</sub> e induce vasoconstricción. (Modificada de: Mehta PK, Griendling KK..., 2007).

La PLD hidroliza a la fosfatidilcolina (PC), libera colina y ácido fosfatidico (PA). El PA es rápidamente convertido a DAG y este activa a la PKC (Figura 55) (Mehta y Griendling, 2007).

Además, en el músculo liso y en las células endoteliales, la Ang II al unirse a los receptores AT<sub>1</sub> activa a la NADPH oxidasa, aumenta la producción de ROS y produce vasoconstricción; en tanto que la unión de la Ang II a los receptores AT<sub>2</sub> en el endotelio produce vasodilatación vía BK-NO- cGMP (Figura 56) (Watanabe y col., 2005).

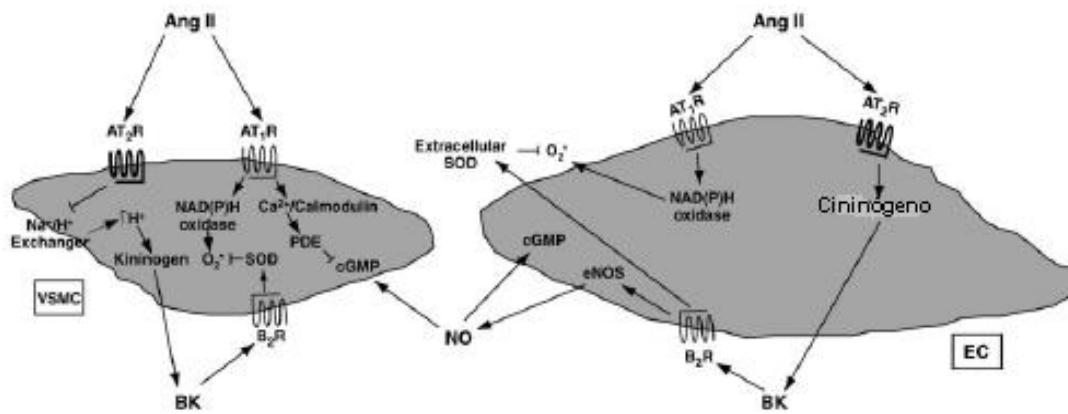


Figura 56: Participación de los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> en la regulación del tono vascular. (Modificada de: Watanabe T, Barker TA, Berk BC., 2005).

#### 4.4. Proteína cinasa C (PKC)

La PKC es una enzima que pertenece a la familia de serina-treonina cinasas, se han reportado al menos 11 isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ ,  $\zeta$ ,  $\lambda$ ). Las isoformas de la PKC se clasifican como se muestra en la Tabla 3. (Noh y King., 2007; Menne y col., 2009):

Tabla 3: Diferentes isoformas de PKC (Idris y Donnelly, 2006).

Grupo A	Grupo B	Grupo C
Convencional (cPKCs)	Novel (nPKCs)	Atípica (aPKCs)
Dependiente de $Ca^{+2}$ y <u>fosfolípidos</u>	Independiente de $Ca^{+2}$ y dependiente de <u>fosfolípidos</u>	Independiente de $Ca^{+2}$ y <u>fosfolípidos</u>
$\alpha$	$\delta$	$\zeta$
$\beta I$	$\epsilon$	$\iota / \lambda$
$\beta II$	$\eta$	
$\gamma$	$\theta$	
	$\mu$	

De las 11 isoformas de PKC la **isoforma  $\beta II$**  es la más activada en las células vasculares (Van den Oever y col., 2010).

Para la activación de PKC, es necesario el diacilglicerol (DAG). En condiciones de hiperglicemia, el DAG se puede generar por diferentes vías en el músculo liso vascular (Inoguchi y col., 2003; Van den Oever y col., 2010).

**a) Hidrólisis de fosfolípidos mediada por receptor acoplado a la fosfolipasa C (PLC).**

En la membrana citoplasmática se encuentran receptores acoplados a proteínas G, la estimulación de estos receptores activa a la PLC, la cual hidroliza los enlaces éster de los fosfolípidos (fosfatidilinositol, fosfatidilcolina o lecitina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina o cefalina , difosfatidilglicerol o cardiolipina y ácido fosfatídico) y libera DAG e IP<sub>3</sub>. Este último, se une a sus receptores localizados en el retículo endoplasmático liso y libera Ca<sup>2+</sup>, el Ca<sup>2+</sup> activa a la PKC citoplasmática y favorece su traslocación del citosol a la membrana plasmática, donde se asocia al DAG y adquiere su forma activa (Figura 60 A y B) (Idris y Donnelly, 2006).

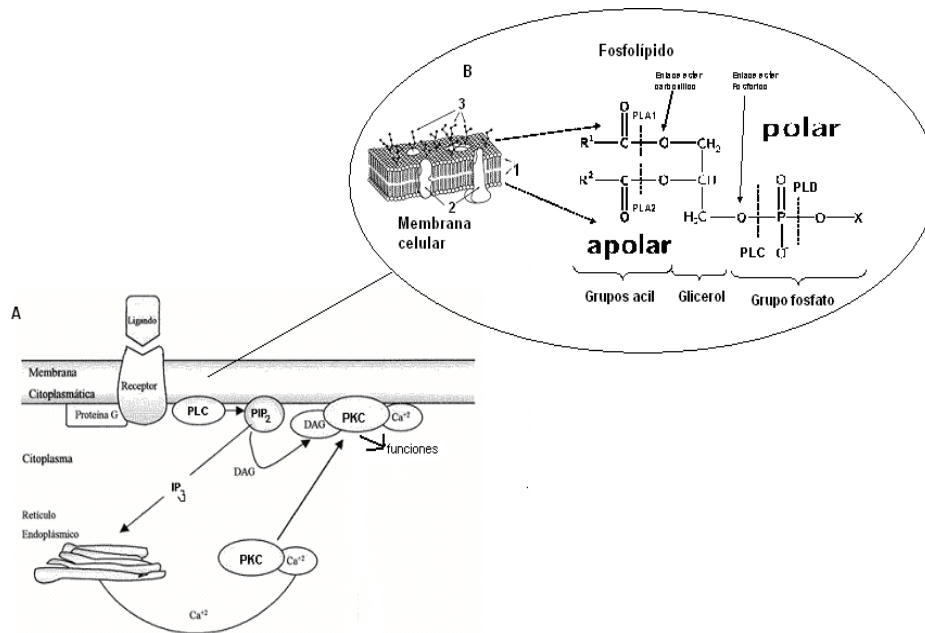


Figura 57 A: La unión de un ligando a su receptor activa a la fosfolipasa C, esta hidroliza los fosfolípidos de membrana y genera diacilglicerol (DAG) e IP<sub>3</sub>, el estimula la liberación de calcio del retículo endoplasmático liso. El calcio participa de manera importante en el proceso de contracción.

Un fosfolípido está compuesto por una molécula de glicerol al que se le unen 2 ácidos grasos en el carbono 1 y 2 (parte apolar) y en el carbono 3 del glicerol se une un grupo fosfato al que a su vez está unido a un grupo X, que dependiendo de la identidad de este puede ser: Fosfatidato (X=Hidrogeno), Fosfatidilcolina (X=colina), Fosfatidilinositol (X=inositol), Fosfatidiletanolamina (X=etanolamina), Fosfatidilserina (X=serina), Fosfatidilglicerol (X=glicerol), Cardiolipina (X=glicerofosfato); (es la parte polar). (Modificado de: Voet, Donald; Voet, Judith G. Bioquímica. Buenos Aires. Medica Panamericana. 2006. 1776p).

## b) Síntesis de novo a partir de ácido fosfatídico

Un intermediario de la glucólisis es el glicerol 3-fosfato (G-3-P), que proviene de 2 vías:

- Reducción de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) formada en la glucólisis mediante la acción de la enzima glicerofosfato deshidrogenasa.
- A partir del glicerol mediante la reacción catalizada por la enzima glicerol cinasa, (Figura 58) (Van den Oever y col., 2010).

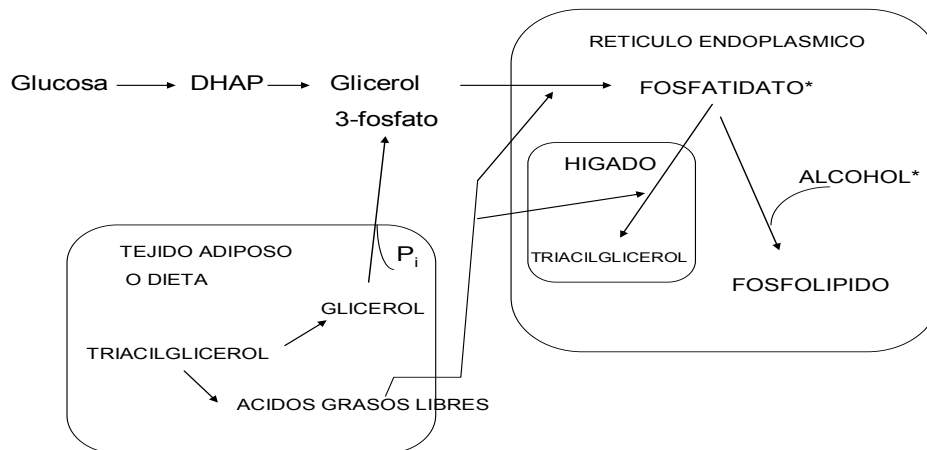


Figura 58: Integración de vías: Fuentes de intermediarios en la síntesis de triacilglicérol y fosfolípidos. (Modificado de: Fornaguera Jaime; Gómez Georgina. Bioquímica la ciencia de la vida. Editorial Universidad estatal a distancia, 2004. 1a edición).

A partir del G-3-P se libera el ácido fosfatídico o fosfatidato y posteriormente DAG (Figura 59) (Idris y Donnelly, 2006).



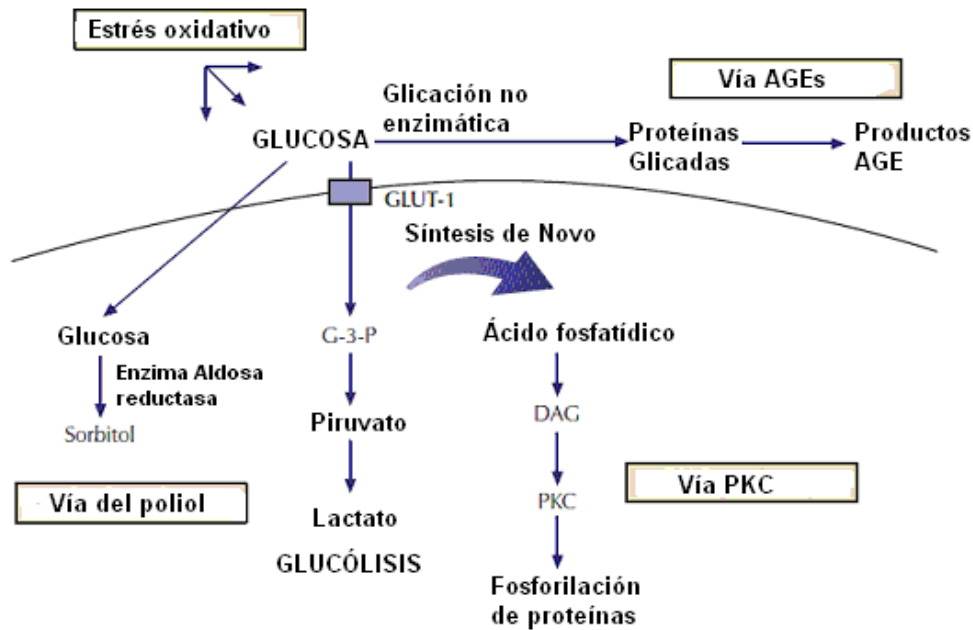


Figura 59: Origen de DAG/PKC a partir de gliceraldehido-3-P que se genera a partir de la glucólisis. (Modificado de: Idris I, Donnelly R., 2006).

Para la formación de ácido fosfatídico es necesario la acilación del glicerol 3 fosfato en el átomo de carbono 2 de sus 3. La primera acilación es catalizada por la aciltransferasa I y forma ácido lisofosfatídico. La segunda acilación es catalizada por la aciltransferasa II, y forma ácido fosfatídico. Los ácidos grasos son incorporados por 2 acil-CoA. Finalmente el ácido fosfatídico es desfosforilado para formar DAG (Figura 60) (Van den Oever y col., 2010).

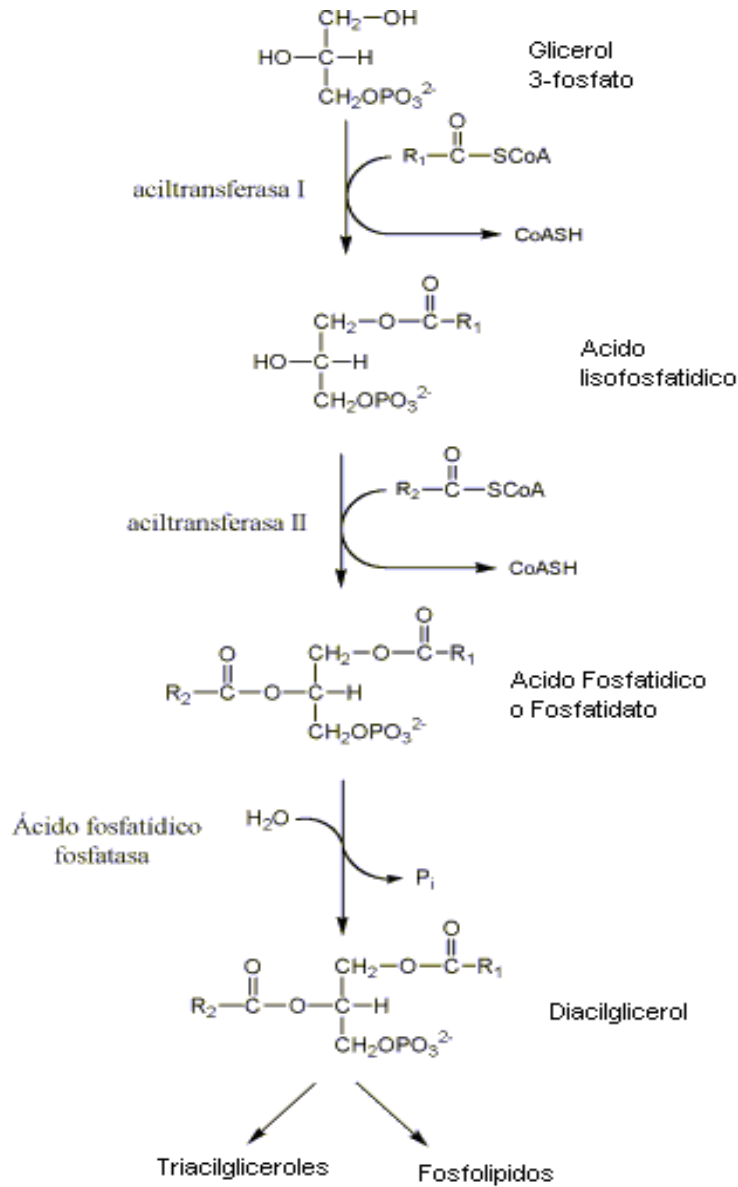
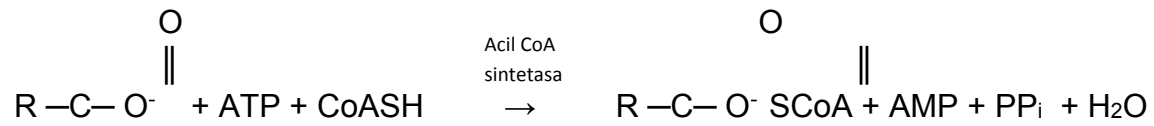


Figura 60: Biosíntesis del ácido fosfatídico a partir del glicerol 3-fosfato y papel de la ácido fosfatídico fosfatasa que origina DAG y posteriormente fosfolípidos y triacilgliceroles. (Modificado de: Devlin Tomas .Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial reverte S.A. 4ª edición .p707).

Para la parte de los ácidos grasos el glicerol 3 fosfato es esterificado en el grupo OH de los C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> por acil-CoA (Ver siguiente reacción):



Otra fuente donde se pueden incrementar los niveles de DAG/PKC es a partir de oxidantes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y productos glicosados (Van den Oever y col., 2010).

### **Alteraciones celulares y funcionales en las células vasculares inducidas por la activación de DAG-PKC.**

Muchas anormalidades celulares y funcionales en el tejido vascular de una persona con diabetes son atribuidas a la activación de DAG-PKC. Algunos de estos cambios se describen a continuación (De Vriese y col., 2000; Idris y Donnelly, 2006; Bakris, 2007; Van den Oever y col., 2010):

- Desregulación de la permeabilidad vascular a través de la inducción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (citocina que incrementa la permeabilidad vascular e induce la angiogenesis) en células del músculo liso, lo que promueve el crecimiento celular y la angiogenesis o neovascularización con la consecuente activación de la inflamación a través de la inducción de la secreción de otras citocinas.

- Desregulación del flujo de la sangre al disminuir la actividad de la eNOS y/o el incremento en la síntesis del vasoconstrictor ET-1, lo cual favorece la disfunción endotelial.

- Engrosamiento de la membrana basal a través del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) mediada por una mayor producción de colágeno tipo IV y fibronectina, el incremento en la expresión de PAI-1 el cual causa deterioro de la fibrinólisis.

- Activación de enzimas como la NADPH que producen súperoxido así como también un incremento en la expresión del desacople de la eNOS que produce súperoxido, disminuyendo la biodisponibilidad del NO, lo que aumenta el estrés oxidativo.

- Alteración en el metabolismo del ácido araquidónico el cual es un precursor de las prostaglandina E<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub> que son vasoconstrictores y por lo tanto favorecen la disfunción endotelial.

La hiperglicemia y altos niveles de ácidos grasos en una persona con diabetes causa disfunción endotelial debido a que estos factores causan un incremento de la síntesis de DAG y activación de PKC, lo que origina una estimulación de la NADPH oxidasa, un aumento en la producción de ROS, un desacople de la NOS y una disminución en la síntesis de NO (Figura 61) (Inoguchi y col., 2003; Bakris, 2007; Menne y col., 2009).

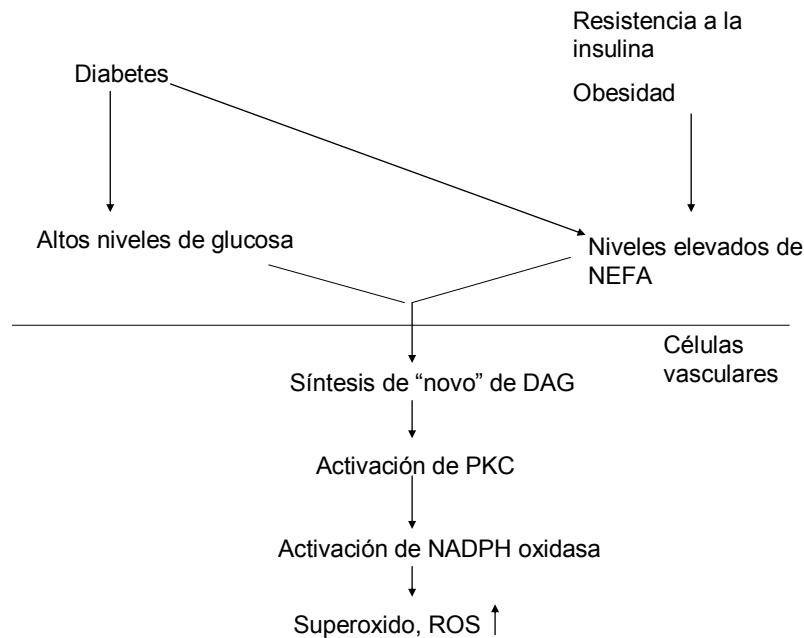


Figura 61: Participación de la hiperglicemia y los ácidos grasos no esterificados (NEFA) en la disfunción endotelial. Los niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en la diabetes se encuentran elevados y causan disfunción endotelial produciendo un aumento en la síntesis de "novo" de diacilglicerol (DAG), activando la PKC, que a su vez estimula a la NADPH oxidasa, esta es una enzima considerada como una importante fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los vasos sanguíneos. La presencia de estos ROS causa aumento del estrés oxidativo y también una disminución en la producción y biodisponibilidad del NO. (Modificado de: Inoguchi T y col, 2003).

## 5. Tratamientos para revertir la disfunción endotelial.

Varias intervenciones terapéuticas han sido probadas en estudios clínicos orientados para mejorar la función endotelial, entre estos tenemos:

### Sensibilizadores de insulina

Los estados de resistencia a la insulina están asociados con disfunción endotelial. Recientemente, han evaluado si los agentes terapéuticos que incrementan la sensibilidad a la insulina pueden también mejorar la función endotelial (Calles-Escandon y Cipolla, 2001; Hadi y Suwaidi, 2007; Matsumoto y col., 2008).

Las **tiazolidinedionas** (TZD), son una clase de medicamentos introducidos a finales de los años 1990 como terapia para la diabetes mellitus tipo 2 y otras enfermedades relacionadas. Las tiazolidinedionas mejoran la sensibilidad de los tejidos blancos a la insulina.

Las tiazolidinedionas actúan uniéndose al receptor activado por el proliferador de los peroxisomas gamma (PPAR $\gamma$ ), un grupo de receptores intracelulares dentro del núcleo. El ligando normal para estos receptores son los ácidos grasos libres y eicosanoides. Al ser activado, el receptor se une al ADN, activando la transcripción genética de un número específico de genes.

Al activar al PPAR $\gamma$ :

- Disminuye la resistencia a la insulina;
- La diferenciación del adipocito es modificada;

- Se inhibe la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF);
- Los niveles de la leptina disminuyen, causando un aumento del apetito;
- Caen los niveles de ciertas interleucinas (por ej: IL-6)
- Aumentan los niveles de adiponectina

Además, los antidiabéticos orales tiazolidinedionas (TZD) (troglitazona, ciglitazona, rosiglitazona, y pioglitazona) corrigen la disfunción endotelial a través de la modulación/incremento en la producción de NO endotelial, aumento en la actividad de la Cu/Zn SOD, lo cual suprime la generación de  $O_2^{\cdot-}$ , inhibición de la NADPH oxidasa e inhibición de la síntesis de ET-1. (Figura 62) (Hadi y Suwaidi, 2007; Siekmeier y col., 2008)

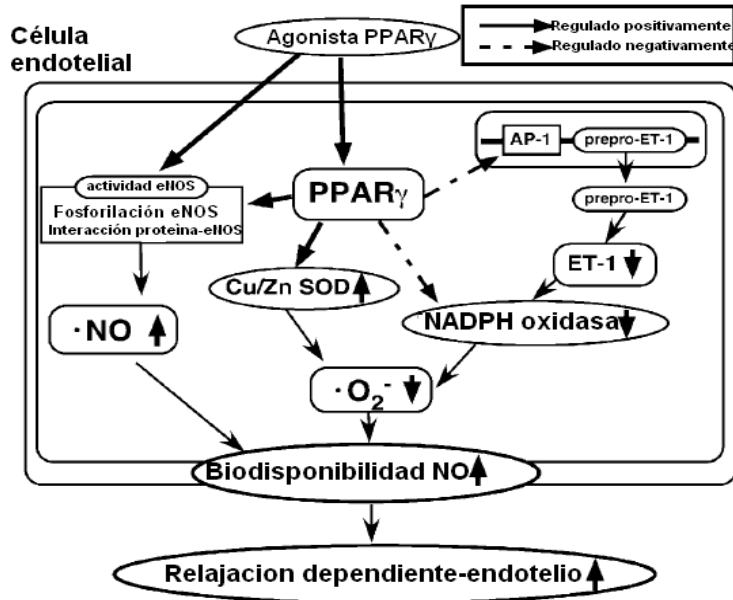


Figura 62: Mecanismos de agonistas PPAR $\gamma$  para mejorar la relajación dependiente del endotelio: estimulación de la actividad de la eNOS (vía su fosforilación e interacción proteína-e-NOS); aumento en la actividad de la Cu/Zn SOD, suprimiendo la generación de  $O_2^{\cdot-}$ ; inhibición de la NADPH oxidasa e inhibición de la síntesis de ET-1; todo esto lleva a un incremento en biodisponibilidad del NO y aun aumento en la relajación dependiente del endotelio. (Modificado de: Matsumoto T y col., 2008).

Se ha reportado que otros antidiabéticos orales tales como glinidas (ejemplo: repaglinida y nateglinida) y sulfonilureas (ejemplo: gliclazida) estimulan la secreción de insulina por reducción de la conductancia del  $K^+$  de la membrana de células B y a través de este mecanismo corrigen la disfunción endotelial (Siekmeier y col., 2008). En este grupo también se encuentra la metformina la cual mejora la resistencia a la insulina e inhibe la gluconeogenesis hepática (vía inhibición de  $NF-\kappa\beta$  a través del bloqueo de la vía P13K) (Siekmeier y col., 2008).

### Inhibidores de la ACE

Un número de estudios han demostrado que los inhibidores de la ACE (ACE-I) por ejemplo: captopril, enalapril, perindopril, ramipril mejoran la disfunción endotelial (Siekmeier y col., 2008). Los ACE-I impiden la hidrólisis de la BK y su acumulación conduce a un incremento en la síntesis de NO. Además los ACE-I inhiben la producción de Ang II y de  $O_2^-$  (Figura 63) (López-Jaramillo y Casas, 2002).

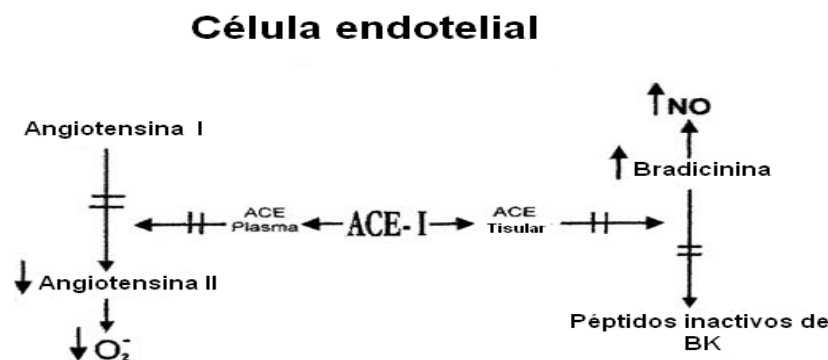


Figura 63: Mecanismo de acción de los ACE-I para invertir la disfunción endotelial a través de mejorar el desequilibrio entre NO y  $O_2^-$ . Los inhibidores de la ACE plasmática impiden la formación de angiotensina II, y disminuyen la formación de  $O_2^-$ . Los inhibidores de la ACE tisular impiden la degradación de BK y su acumulación conduce a un aumento en la síntesis y actividad de NO. (Modificado de: López-Jaramillo P., 2002).



## **Bloqueadores de receptores de angiotensina (ARBs)**

Los antagonistas de los receptores de la angiotensina II, también llamados bloqueantes del receptor de la angiotensina, son un grupo de medicamentos que modulan al sistema renina angiotensina aldosterona. Su principal indicación en medicina es en la terapia para la hipertensión arterial, la nefropatía diabética—que es el daño renal debido a la diabetes mellitus—e insuficiencia cardíaca congestiva.

Los antagonistas del receptor de la angiotensina son sustancias, como su nombre lo indica, que actúan como antagonistas o bloqueantes del receptor de la hormona angiotensina II, llamado receptor AT<sub>1</sub>. El bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> de manera directa causa vasodilatación, reduce la secreción de la vasopresina y reduce la producción y secreción de aldosterona, entre otras acciones. El efecto combinado es una reducción en la presión sanguínea.

Estos compuestos también llamados sartanes, (ejemplo: candesartan, losartan, telmisartan) aunque mejoran la función endotelial su modo de acción es menos claro (Figura 64) (Siekmeier y col., 2008).

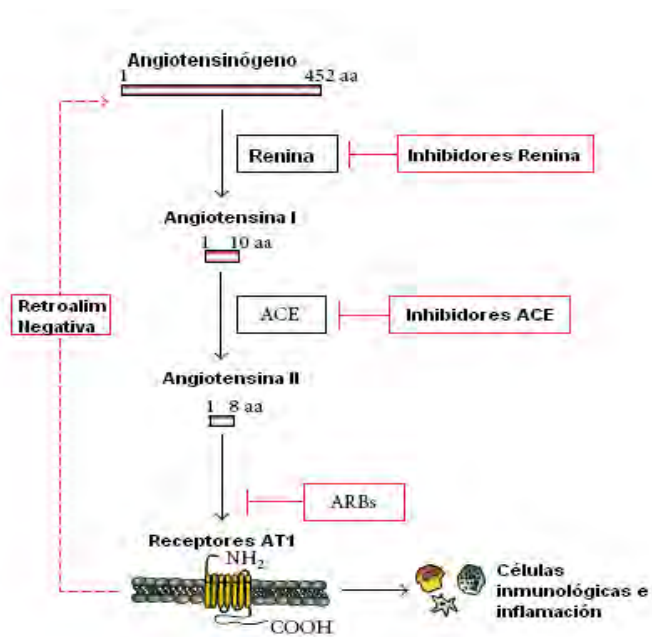


Figura 64: Sistema RAS y su inhibición farmacológica. Inhibidores de la renina, inhibidores de la ACE y bloqueadores del receptor de angiotensina (ARBs) modulan las actividades de la angiotensina II en procesos inflamatorios.

Otro enfoque es el bloqueo del sistema de la endotelina por compuestos que bloquean específicamente el receptor  $ET_A$  únicamente o ambos  $ET_A$  y  $ET_B$  (Siekmeier y col.,

2008). Estos fármacos mejoran la disfunción endotelial debido a que disminuyen la producción de  $O_2^-$  originado por la NOX (vía PKC), el cual al unirse con NO forma ONOO $^-$  disminuyendo la biodisponibilidad de NO y por lo tanto aumentando la vasoconstricción del músculo liso. Sin embargo sustancias de este grupo por ejemplo: bosentan son usadas predominantemente para el tratamiento de la hipertensión pulmonar (Siekmeier y col., 2008).

### **Inhibidores de PKC**

Mesilato de ruboxistaurina (LY333531) es un inhibidor específico de la isoforma PKC $\beta$  en modelos animales en terapia oral ha mostrado mejoras en el tratamiento retinopatía, nefropatía y neuropatía, también disminuye la disfunción celular endotelial y el estrés oxidativo en animales diabéticos o con resistencia a la insulina (Idris y Donnelly, 2006; Noh y King, 2007).

### **Agentes que reducen los lípidos.**

#### **Estatinas**

Las Estatinas han demostrado tener efectos beneficiosos sobre la disfunción endotelial, lo cual puede ser el resultado en parte de la reducción de lípidos (colesterol) por la inhibición de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, pero también por sus efectos antiinflamatorios pleiotropicos (Figura 65) (Endemann y Schiffrin ,2004; Pahan, 2006; Siekmeier y col., 2008).

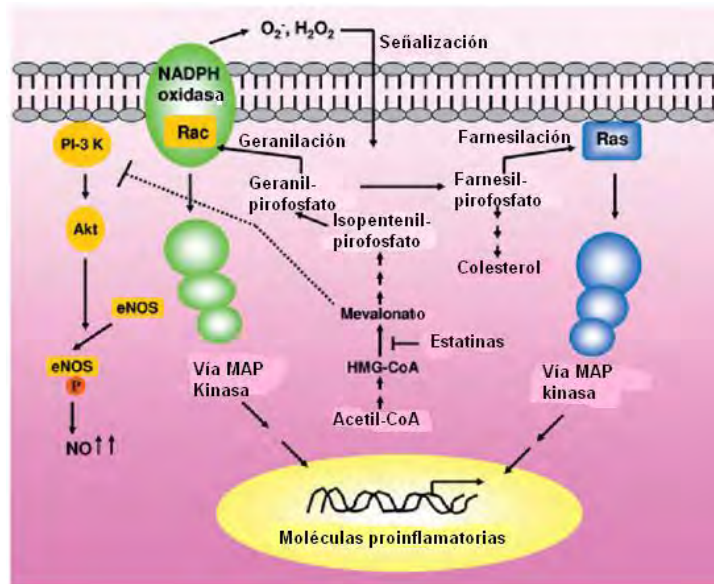


Figura 65: Las estatinas suprimen la actividad de la HMG-CoA reductasa y su inhibición interfiere en el metabolismo del mevalonato, de los isoprenoides (geranilpirofosfato y farnesilpirofosfato y por lo tanto del colesterol. Los isoprenoides activan pequeñas proteínas G (*Rac* y *Ras*), debido a que *Rac* y *Ras* son acopladas para la transcripción de moléculas proinflamatorias vía MAP kinasa, las estatinas reducen la expresión de moléculas proinflamatorias. Por supresión de la geranilación de *Rac*, las estatinas también atenúan la producción de ROS mediada por la NADPH oxidasa. Fosfatidilinositol-3 kinasa (PI3-K) activan Akt, la kinasa que ha mostrado que fosforila y estimula la eNOS. Mevalonato es capaz de inhibir PI-3 kinasa, por lo tanto reduciendo la concentración de mevalonato las estatinas sobregulan la producción de NO mediada por la eNOS resultando en vasorelajación. (Modificado de: Pahan K., 2006).

## **Fibratos**

En contraste con las estatinas este grupo de fármacos no inhibe la biosíntesis del colesterol pero disminuye los niveles plasmáticos de ácidos grasos y triglicéridos. Su modo de acción de los fibratos como clofibrato y fenofibrato activan los PPAR- $\alpha$ . Bezafibrato actúa como un agonista-pan. Los fibratos inhiben la producción de diferentes moléculas proinflamatorias como la IL-6 en músculo liso, la actividad de la iNOS en macrófagos, la expresión de VCAM-1 en células endoteliales. Gemfibrozil inhibe factores de transcripción proinflamatorios tales como NF- $\kappa$ B, AP-1 y C/EBP $\beta$ , los cuales son requeridos para la transactivación del promotor iNOS humano (Pahan, 2006).

## **Vitaminas**

### **Vitamina C y E**

Efectos antioxidantes, en el caso de la vitamina E efectos adicionales como degradación reducida de NO, expresión reducida de moléculas de adhesión y mejora en la vasodilatación dependiente de flujo (Simonsen y col., 2009).

Además el antioxidante vitamina E ha sido identificado como un inhibidor de la vía DAG/PKC y ha mostrado ser una promesa para reducir las complicaciones vasculares en modelos animales con diabetes (Idris y Donnelly, 2006).

### **Acido fólico, vitamina B6 y B12**

Reducción en plasma de homocisteína debido a la acción de cofactores en el metabolismo de homocisteína (Simonsen y col., 2009).

## **BH4**

Substrato eNOS. Así la suplementación con BH<sub>4</sub> y con miméticos o análogos de BH<sub>4</sub> pueden mejorar la función endotelial vía aumento de la biodisponibilidad del NO (Figura 69) (Siekmeier y col., 2008; Simonsen y col., 2009).

## **Arginina**

Substrato eNOS. La L-arginina se encuentra dentro de las células endoteliales en concentraciones suficientemente altas como para que la eNOS tenga una máxima actividad, sintetizando NO. La evidencia clínica y experimental de los últimos años indica que la administración oral o intravenosa de L-arginina mejora la síntesis de NO y la vasodilatación dependiente del endotelio en patologías como diabetes (Figura 66) (Simonsen y col., 2009).

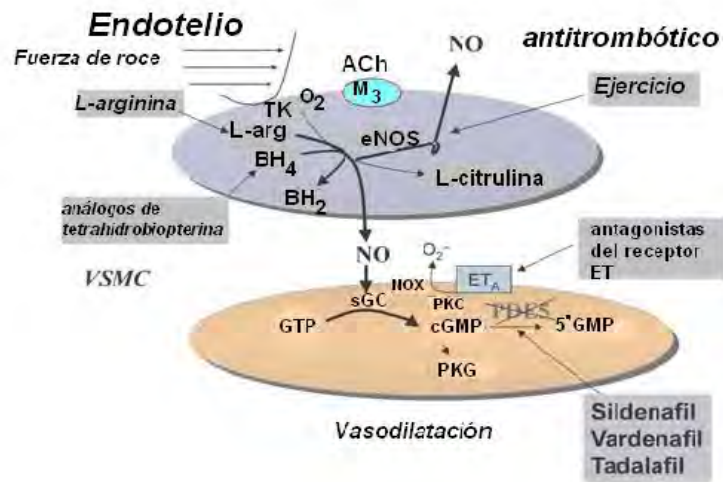


Figura 66: Tratamientos específicos para restaurar la vasodilatación dependiente del endotelio. (Modificado de: Simonsen U y col., 2009).

## Otros fármacos

### Estrógenos

Su modo de acción es a través de la unión a receptores de estrógenos nucleares (ER-a and ER-b) (Simonsen y col., 2009).

### Desferoxamina

Quelación de cationes metálicos bivalentes (Ej.  $Fe^{2+}$ ) (Simonsen y col., 2009).

## **Alopurinol**

El inhibidor de la xantina oxidasa "alopurinol", también ha mostrado resultados alentadores en la mejora de la disfunción endotelial (Figura 70) (Simonsen y col., 2009).

## **Flavonoides**

Los flavonoides tiene actividad antioxidante debido que impiden que citocina, quimiocinas, factores de crecimiento (TGF- $\beta$  y PDGF ), ET-1 y la fuerza de roce estimulen a la NOX para generar  $O_2^-$ . Las citocinas al verse inhibidas también disminuyen la inflamación de células vasculares generadas por ellas mismas y factores de crecimiento (Figura 67).



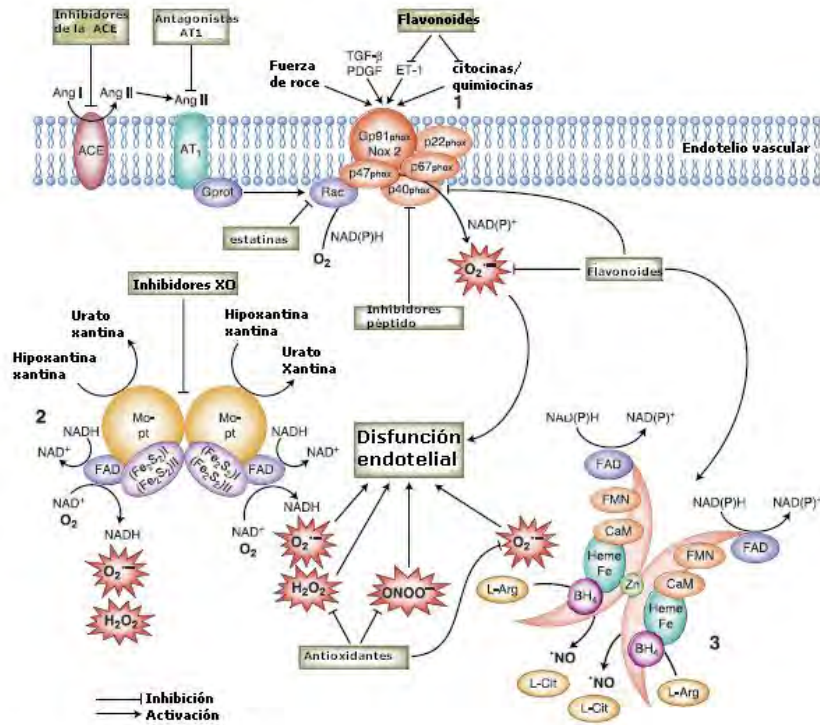


Figura 67: Inhibidores de la xantina oxidasa, disminuyen el estrés oxidativo en el endotelio vascular. (Modificado de: Weseler AR., 2010).

### **Bloqueadores TNF- $\alpha$**

Efecto antiinflamatorio por inhibición de TNF- $\alpha$  (Simonsen y col., 2009).

### **Inhibidores de la fosfodiesterasa-5 (PDE-5)**

Sildenafil, vardenafil y tadalafil son inhibidores de la (PDE-5), esta enzima inactiva al cGMP dentro del músculo liso vascular evitando que se hidrolize a 5' GMP, y de este modo el cGMP disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  y produce vasodilatación (Figura 66) (Simonsen y col., 2009).

Otro compuesto que ha mostrado una mejora en la vasodilatación mediada por NO dependiente del endotelio es el ácido oleico el cual es un componente del aceite de oliva que fosforila la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS activándola y por lo tanto aumentando la vasodilatación mediada por NO (Figura 68) (Simonsen y col., 2009).

El Tempol un mimético de la SOD ha mostrado disminuir la concentración de  $\text{O}_2\cdot^-$  y por lo tanto desacople de la eNOS, pero a su vez aumenta la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que es un EDHF y por lo tanto al verse disminuido el NO para compensar esto el  $\text{H}_2\text{O}_2$  causa vasodilatación (Figura 68)(Simonsen y col., 2009).

Moléculas pequeñas como el NS309 y el SKA-31 modulan los canales de K<sup>+</sup> (IK<sub>Ca</sub> e SK<sub>Ca</sub>) respectivamente induciendo hiperpolarización endotelial por la salida de K<sup>+</sup> y el aumento de Ca<sup>2+</sup> del RE, el cual se une con CaM, activa a la eNOS y a la producción de NO (Figura 68) (Simonsen y col., 2009).

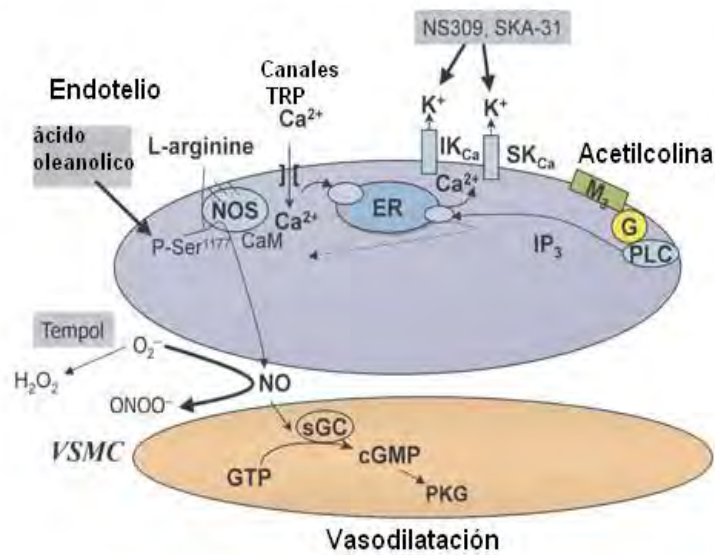


Figura 68: Nuevos enfoques para mejorar la vasodilatación mediada por NO dependiente del endotelio. (Modificado de: Simonsen U y col., 2009).

## Otros

### Modificación del estilo de vida

Reducción en varios efectos deletorios a través de la modificación en el estilo de vida: reducción en el peso corporal, modificación hábitos dietéticos, moderada ingesta alcohol, dejar de fumar, ejercicio físico.

El ejercicio físico, se han encontrado que mejora la vasodilatación dependiente del endotelio estimulado por el flujo en pacientes con diabetes e hipertensión (Simonsen y col., 2009).

## **6. CONCLUSION**

El endotelio tiene varias funciones esenciales para la salud, que se ejercen en su mayoría a través de mediadores químicos. La función más conocida es el mantenimiento de un tono vascular dilatado en la proporción exacta para conservar la presión arterial en valores normales y permitir la perfusión tisular. Esta función vasodilatadora la ejerce el endotelio por intermedio de el oxido nítrico, los canales de potasio, el peróxido de hidrogeno, los metabolitos del ácido araquidónico, la endotelina y la angiotensina II. Por lo tanto la detección temprana de la disfunción endotelial puede ser una medida provechosa para la terapia guiada en las enfermedades cardiovasculares.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham D, Dashwood M. Endothelin-role in vascular disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; 47 (5):v23-4.
2. Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2002; 3(1):1-15.
3. Alp NJ, Channon KM. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease. *Arterioscler.Thromb.Vasc. Biol*. 2004; 24:413-420.
4. Ba M, Singer CA, Tyagi M, Brophy C, Baker JE, Cremo C, Halayko A, Gerthoffer WT. HSP20 phosphorylation and airway smooth muscle relaxation. *Cell Health Cytoskelet*. 2009 ;( 1):27-42.
5. Bakris GL. Protein Kinase C- $\beta$  Inhibition: A Promise Not Yet Fulfilled. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007; 2: 619-620.
6. Böhm F, Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2007; 76(1):8-18.
7. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocrine Reviews*. 2001; 22 (1): 36-52.
8. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension*. 2007; 49(3):590-6.
9. Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Thromboxane A<sub>2</sub>-induced inhibition of voltage-gated K<sup>+</sup> channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase C zeta. *Circ Res*. 2003; 93(7):656-63.
10. Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*. 2008; 49(4-6):134-40.
11. Dai DZ, Dai Y. Role of endothelin receptor A and NADPH oxidase in vascular abnormalities. *Vasc Health Risk Manag*. 2010; 6: 787-94.
12. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lamiere NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000; 130:963-974.
13. Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res*. 2007; 75(2):247-60.

14. Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol.* 2006; 5:4.
15. Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U, Hofmann F. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res.* 2003; 93(10):907-16.
16. Félétou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options?. *Br J Pharmacol.* 2009; 156(4):545-62.
17. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(6):1215-25.
18. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284(1):R1-12.
19. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006; 113(13):1708-14.
20. Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 299(3):818-24.
21. Gao X, Martinez-Lemus LA, Zhang C. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and diabetes. *World J Cardiol.* 2011; 3(1):25-31.
22. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 280(2):F193-206.
23. Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R. Endothelial Ca<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2009; 157(4):509-26.
24. Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag.* 2007; 3(6):853-876
25. Idris I, Donnelly R. Protein kinase C  $\beta$  inhibition: a novel therapeutic strategy for diabetic microangiopathy. *Diabetes Vasc Dis Res* 2006; 3:172–8.
26. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H.. Protein Kinase C-Dependent Increase in Reactive Oxygen Species (ROS) Production in vascular Tissues of Diabetes: Role of Vascular Tissues of

Diabetes: Role of Vascular NAD(P)H oxidase. *J Amer Soc Nephrol.* 2003; 14:S227- S232.

27. Ishizuka T, Cheng J, Singh H, Vitto MD, Manthati VL, Falck JR, Laniado-Schwartzman M. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor- $\kappa$ B activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 324(1):103-10.
28. Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation.* 2005; 12(1):113-27.
29. Kalani M. The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vasc Health Risk Manag.* 2008; 4(5):1061-8.
30. Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives. *Circ J.* 2010; 74(5):836-43.
31. Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczek W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol.* 2006; 57(4):529-39.
32. Kitazawa T, Semba S, Huh YH, Kitazawa K, Eto M. Nitric oxide-induced biphasic mechanism of vascular relaxation via dephosphorylation of CPI-17 and MYPT1. *J Physiol.* 2009; 587:3587-603.
33. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 2008; 44(2):65-81.
34. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2009; 202(2):330-44.
35. Menne J, Meier M, Park J-K, Haller. H. Inhibition of protein kinase C in diabetic nephropathy—where do we stand?. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24(7):2021-3.
36. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(1):C82-97.
37. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol.* 2008; 93(1):141-7.



38. Miyata N, Roman RJ. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J Smooth Muscle Res.* 2005; 41(4):175-93.
39. Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(8):1551-7.
40. Noh H, King GL. The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney Internat.* 2007; 72:S49–S53.
41. Pat Kunert M, Drenjancevic I. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, endothelial dysfunction and hypertension. *Med Glas Ljek komore Zenicko-dobojskantonu.* 2011; 8(2):170-80.
42. Ravi K, Brennan LA, Levic S, Ross PA, Black SM. S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(8):2619-24.
43. Ribeiro-Oliveira A Jr, Nogueira AI, Pereira RM, Boas WW, Dos Santos RA, Simões e Silva AC. The renin–angiotensin system and diabetes: An update. *Vasc Health Risk Manag.* 2008; 4(4).
44. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1):131-85.
45. Roman RJ, Lombard JH. Does 20-hydroxyeicosatetraenoic acid contribute to sex differences in cardiovascular risk by increasing oxidative stress?. *Hypertension.* 2007; 50(1):37-8.
46. Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 291(5):C803-16.
47. Sellers RS, Radi ZA, Khan NK. Pathophysiology of cyclooxygenases in cardiovascular homeostasis. *Vet Pathol.* 2010; 47(4):601-13.
48. Sessa WC. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100 (1):15-8.
49. Serban DN, Nilius B, Vanhoutte PM. The endothelial saga: the past, the present, the future. *Pflugers Arch.* 2010; 459(6):787-92.

50. Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2007; 113(2):47-63.
51. Shimokawa H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pflugers Arch*. 2010; 459(6):915-22.
52. Siekmeier R, Grammer T, März W. Roles of oxidants, nitric oxide, and asymmetric dimethylarginine in endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2008; 13(4):279-97.
53. Smyth EM. Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clin Lipidol*. 2010; 5(2): 209-219.
54. Spector AA, Norris AW. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292(3):C996-1012.
55. Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina (Kaunas)*. 2003; 39(4):333-41.
56. Stec DE, Gannon KP, Beaird JS, Drummond HA. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) stimulates migration of vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem*. 2007; 19(1-4):121-8.
57. Tang EH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension?. *Pflugers Arch*. 2010; 459(6):995-1004.
58. Van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm*. 2010; 2010: 792393.
59. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009; 196(2):193-222.
60. Verbeuren TJ. Terutroban and endothelial TP receptors in atherogenesis. *Med Sci (Paris)*. 2006; 22(4):437-43.
61. Viridis A, Duranti E, Taddei S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int J Hypertens*. 2011; 2011.
62. Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the Endothelium: Diverse Signals and Effects. *Hypertension*. 2005; 45:163-169.
63. Weseler AR, Bast A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. *Curr Hypertens Rep*. 2010; 12(3):154-61.

64. Wrzosek A. Endothelium as target for large-conductance calcium-activated potassium channel openers. *Acta Biochim Pol.* 2009; 56(3):393-404.