



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**ESTRÉS OXIDATIVO, DISFUNCIÓN  
ENDOTELIAL Y COMPLICACIONES  
VASCULARES EN ESTADOS DE RESISTENCIA  
A INSULINA**

Autor: ANA ARAMBURU CUBERTA

Fecha: 22/07/2020

Tutor: DOLORES PRIETO OCEJO

## ÍNDICE

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	3
2. OBJETIVOS .....	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	4
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	5
4.1. Función endotelial .....	5
4.2. Especies reactivas del oxígeno, estrés oxidativo, inflamación y disfunción endotelial en el desarrollo de complicaciones cardiovasculares .....	11
4.3. Resistencia a la insulina y disfunción endotelial .....	17
5. CONCLUSIONES .....	19
BIBLIOGRAFÍA .....	20

## RESUMEN

El endotelio vascular es responsable de la regulación del tono del músculo liso vascular subyacente. En respuesta a estímulos de naturaleza química o mecánica, las células endoteliales liberan sustancias vasoactivas que ejercen efectos bien vasodilatadores –como es el caso del óxido nítrico (NO) y del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)– o bien vasoconstrictores –como ocurre con el péptido endotelina 1 (ET-1)–. La exposición del endotelio a estrés mecánico, oxidativo y metabólico, inflamación o hipoxia puede desembocar en el deterioro de su funcionamiento habitual y en el establecimiento de un fenotipo caracterizado por una deficiente capacidad vasodilatadora y una marcada tendencia proinflamatoria y protrombótica conocido como disfunción endotelial. La desregulación molecular del metabolismo de las especies reactivas del oxígeno (ROS) así como la disminución de la biodisponibilidad del NO que sobrevienen en cuadros de estrés oxidativo juegan un papel crucial en la patogénesis de la disfunción endotelial y de la inflamación vascular. Estos dos acontecimientos subyacen a la arterioesclerosis, a la hipertensión, a la enfermedad arterial coronaria y a las complicaciones vasculares de aquellas patologías que cursan con resistencia a la insulina, tales como la diabetes y la obesidad.

Palabras clave: disfunción endotelial, endotelio vascular, especies reactivas del oxígeno, estrés oxidativo, inflamación, obesidad, óxido nítrico, resistencia a la insulina.

## ABSTRACT

The vascular endothelium regulates the tone of the subjacent vascular smooth muscle. In response to stimuli of chemical or mechanical nature, endothelial cells release vasodilator substances –such as nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)– as well as vasoconstrictor substances –for example endothelin 1 (ET-1)–. Endothelial exposure to mechanical, oxidative and metabolic stress, inflammation or hypoxia may lead to the impairment of its regular functioning, and to the establishment of a phenotype characterized by a deficient vasodilator capacity and by a marked proinflammatory and prothrombotic trend known as endothelial dysfunction. The molecular dysregulation that affects the metabolism of reactive oxygen species (ROS) together with the decreased nitric oxide (NO) bioavailability observed in oxidative stress play a critical role in the pathogenesis of both endothelial dysfunction and vascular inflammation. These events underlie atherosclerosis, hypertension, coronary artery disease, and the vascular complications shown by diseases that feature insulin resistance, such as diabetes and obesity.

Key words: endothelial dysfunction, inflammation, insulin resistance, nitric oxide, oxidative stress, obesity, oxygen reactive species, vascular endothelium.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El endotelio vascular está constituido por una monocapa de células dispuestas en la cara interna de los vasos sanguíneos del organismo. Se trata de un órgano paracrino, autocrino y endocrino vasto y difuso que se extiende por la totalidad del sistema vascular [1,2]. Si bien es cierto que existen ciertas diferencias entre los endotelios de diversos tipos de lechos vasculares (véase vasos de distribución, vasos de resistencia o capilares tisulares), todos ellos son capaces de desempeñar una serie de funciones que podrían considerarse generales. Debido a su localización, el endotelio actúa como una barrera selectiva que regula activamente el paso de nutrientes, hormonas y demás sustancias a los tejidos circundantes [2]. Por otra parte, el endotelio desempeña un papel crucial en el control del tono vascular y en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Las células endoteliales se encargan de prevenir y limitar la coagulación sanguínea y la formación de trombos plaquetarios así como de producir reguladores del sistema fibrinolítico [2]. Presentan pues en su conjunto una actividad anticoagulante, antitrombótica y antiagregante. El endotelio es sensible a estímulos de naturaleza química generados por las células y por los diversos compuestos vehiculizados en la sangre además de a estímulos de tipo mecánico (generalmente conocidos como fuerzas de cizallamiento o *shear stress* en inglés) resultantes de la presión ejercida por el torrente sanguíneo sobre las paredes vasculares a su paso. La detección de estas señales permite a las células endoteliales orquestar una vasoregulación puntual o inducir la adaptación crónica de los vasos sanguíneos por medio del remodelado vascular. Gracias a la síntesis y liberación de diversas moléculas tróficas y vasoactivas el endotelio puede regular el tono del músculo liso vascular subyacente. Las sustancias vasoactivas comprenden tanto factores vasodilatadores –véase el óxido nítrico (NO), la prostaciclina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) o los factores hiperpolarizantes derivados del endotelio (*endothelium-derived hyperpolarizing factors* o EDHFs en inglés) entre los que se encuentra el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)– como factores vasoconstrictores –por ejemplo el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) o el péptido vasoconstrictor endotelina 1 (ET-1)– [1-3]. El endotelio vascular desempeña además una función clave en el control de la reacción inmunológica e inflamatoria a través de la regulación de la captación de leucocitos y de la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias. La inflamación endotelial puede activarse tras una exposición a citoquinas inflamatorias y a especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species* o ROS en inglés) originadas por alteraciones metabólicas (como es el caso por ejemplo de la resistencia a la insulina). Bajo condiciones normales, las células endoteliales muestran una expresión mínima o completamente nula de factores proinflamatorios. Por último, conviene señalar que el endotelio vascular interviene activamente en el desarrollo de la angiogénesis. La expansión y la organización de la microvasculatura es de vital importancia en el crecimiento, la reparación y la perfusión tisular. En ciertas patologías el desarrollo de una angiogénesis indebida acarrea graves complicaciones tales como hemorragias locales o irrigación sanguínea insuficiente, por nombrar algunas [2].

El abanico de funciones del endotelio vascular es flexible y puede ser modulado en vistas de adaptación a diversos estímulos, entre otros el estrés mecánico, el estrés oxidativo y metabólico, la inflamación y la hipoxia. Sin embargo, en determinadas ocasiones puede ocurrir que su funcionamiento habitual se deteriore y que se establezca el estado conocido como disfunción endotelial [2]. La disfunción endotelial implica el cambio de las funciones reguladoras del endotelio hacia un fenotipo caracterizado por una deficiente capacidad

vasodilatadora y una marcada tendencia proinflamatoria y protrombótica. El deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio –característica funcional por excelencia de la disfunción endotelial– resulta del desequilibrio que se establece en la producción y liberación de factores vasodilatadores (particularmente NO) y vasoconstrictores, mediadores coagulantes y anticoagulantes y sustancias estimulantes e inhibidoras del crecimiento celular [4]. A fin de cuentas, la disfunción endotelial engloba el conjunto de alteraciones de las funciones endoteliales generales que acontecen de forma simultánea en un lecho vascular preciso en un momento determinado y que acaban produciendo cambios estructurales y funcionales en los vasos sanguíneos afectados. Parece ser la primera etapa de una serie de acontecimientos que acaban conduciendo a la aparición de arterioesclerosis y enfermedad coronaria. Así pues, la disfunción endotelial puede ser considerada un signo distintivo e indicador de enfermedad cardiovascular [2,3]. Pese a que por lo general se considera que el estrés oxidativo, la disminución de la biodisponibilidad del NO, la inflamación crónica de las células endoteliales y la vasorreactividad anómala son factores que caracterizan a la disfunción endotelial en un gran número de situaciones clínicas (véase diabetes, hipercolesterolemia, hipertensión, obesidad o resistencia a la insulina), el origen y la magnitud de la disfunción endotelial puede variar en función de la naturaleza de los estímulos nocivos a los que son expuestos los vasos sanguíneos. El tipo de vasos afectados también juega un papel determinante en el curso que sigue la disfunción endotelial [2].

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica con el fin de comprender la labor del endotelio vascular en el mantenimiento de la homeostasis, describir las fuentes y el impacto fisiopatológico del estrés oxidativo, profundizar en el progreso de la disfunción endotelial y en el desarrollo de complicaciones vasculares asociadas y esclarecer el estrecho vínculo existente entre estos fenómenos, todo ello encuadrado en el contexto de estados de resistencia a la insulina tomando como referencia la obesidad.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en la base de datos Pubmed y en el catálogo CISNE BUC de aquellos artículos científicos publicados en las dos últimas décadas con temáticas de interés para el desarrollo del trabajo –véase función y disfunción endotelial, estrés oxidativo, complicaciones vasculares y resistencia a la insulina– para así obtener la información más reciente y relevante.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Función endotelial

#### 4.1.1 El óxido nítrico: protector de la pared vascular. Síntesis, mecanismo de acción y factores de regulación

El factor relajante derivado del endotelio (*endothelium-derived relaxing factor* o EDRF en inglés) mejor caracterizado es el óxido nítrico (NO). El NO es un gas incoloro. Se trata de una molécula de carácter apolar integrada por un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno unidos por un doble enlace covalente. El átomo de nitrógeno tiene un electrón desapareado en su último orbital. Esta estructura molecular hace que el NO se comporte como un radical libre. Como tal, tiende a reaccionar con facilidad con moléculas que también presentan electrones desapareados (por ejemplo radicales libres o metales de transición como el átomo de hierro del grupo prostético hemo). La alta reactividad del NO es responsable de su corta semivida [5]. El NO está presente a nivel de la macrovasculatura (arteria aorta y arterias medianas) y de la microvasculatura (arteriolas y capilares) [6]. Juega un papel crucial en la protección ejercida por el endotelio frente a la ocurrencia de vasoconstricciones anormales o vasoespasmos y el desarrollo de arterioesclerosis en arterias de gran calibre. Inhibe la agregación y la adhesión plaquetaria, la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales –y, por ende, la adhesión y penetración de macrófagos–, la liberación del péptido vasoconstrictor y mitogénico endotelina 1 (ET-1) y la síntesis de ADN, la mitogénesis y la proliferación de las células musculares lisas. La adhesión leucocitaria a la pared vascular es un acontecimiento temprano en el desarrollo de la arterioesclerosis. Por otro lado, la exposición de las células musculares lisas a los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (y la consiguiente formación de la placa fibrosa) representa una etapa más avanzada en la evolución de la enfermedad. Dado que el NO ejerce un papel protector frente al desencadenamiento y la progresión de la arterioesclerosis, éste es considerado como el principal sistema de defensa del sistema vascular frente a la enfermedad arterioesclerótica. Cuando la función protectora del NO se ve restringida, se inicia una respuesta inflamatoria que acaba conduciendo al establecimiento de esta patología [3,7].

En el endotelio el NO es producido mayoritariamente por la isoforma constitutiva de la óxido nítrico sintasa denominada eNOS o NOS3. La forma funcional de la eNOS es un homodímero. Cada uno de los monómeros que lo integra presenta un dominio con actividad oxigenasa en el extremo N-terminal y un dominio con actividad reductasa en el extremo C-terminal. El dominio oxigenasa contiene el centro catalítico de la enzima. Las subunidades oxigenasa y reductasa quedan conectadas por una

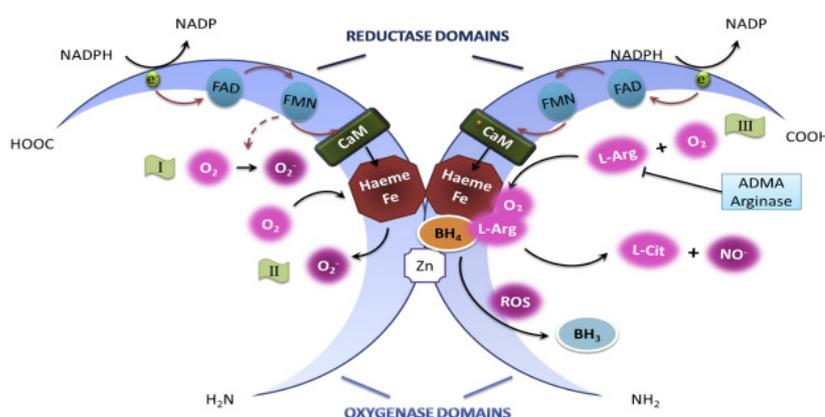


Figura 1: estructura de la eNOS y mecanismo catalítico. Recuperado de: Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS, 2015.

secuencia central de unión de calmodulina (CaM). El dímero de eNOS es estabilizado por la unión de la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y de zinc al dominio oxigenasa del extremo amino terminal. Además de estabilizar la estructura del dímero de eNOS, es probable que la BH<sub>4</sub> module el potencial redox del grupo prostético hemo situado en el centro catalítico del dominio oxigenasa. Únicamente la asociación de calcio y calmodulina (Ca<sup>2+</sup>/CaM) puede ser reconocida por el dominio de unión de calmodulina situado en la secuencia central de cada monómero. La actividad de la eNOS está de este modo íntimamente ligada a la concentración de calcio intracelular. La eNOS es por lo tanto una enzima calcio-calmodulin-dependiente cuya activación requiere en primer lugar una elevación del nivel de calcio intracelular y la subsiguiente activación de la calmodulina [5,6].

El estímulo mecánico producido constantemente por las fuerzas de cizallamiento y el aumento puntual del flujo sanguíneo inducen la apertura de los canales iónicos situados sobre la membrana de las células endoteliales y, por consiguiente, el aumento de la concentración del calcio intracelular. Por añadidura, la unión de determinadas sustancias vasoactivas (acetilcolina, histamina, vasopresina, noradrenalina, bradiquinina, serotonina y trombina por nombrar algunas) a sus receptores de membrana específicos conduce a la activación de la eNOS. Los receptores en cuestión están acoplados a proteínas G. Cuando estas proteínas son estimuladas, se produce la activación de la fosfolipasa C y se inicia la producción de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) a partir del fosfatidilinositol bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). El IP<sub>3</sub> favorece la liberación de los depósitos internos de calcio situados en el retículo sarcoplásmico. Este primer aumento de la concentración de calcio citoplasmático favorece la entrada de calcio desde el medio extracelular a través de canales no selectivos. El incremento de los niveles de calcio intracelular hace posible la asociación del ión con la calmodulina. El complejo Ca<sup>2+</sup>/CaM se une a la secuencia de unión de calmodulina situada entre los dominios oxigenasa y reductasa de cada uno de los monómeros de la eNOS. Este fenómeno induce un cambio en la disposición espacial de las subunidades oxigenasa y reductasa. El reordenamiento de las subunidades permite que tenga lugar la reacción de transferencia de electrones que activa el centro catalítico de la enzima. Las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavín adenín dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN) establecen un flujo de electrones desde el dominio reductasa hasta el dominio oxigenasa que resulta en la reducción de los grupos hemo-férricos de los dos monómeros que conforman el homodímero de eNOS. El grupo hemo-ferroso (forma reducida del grupo hemo-férrico) puede catalizar la síntesis de NO a partir de los sustratos L-arginina y oxígeno (O<sub>2</sub>). Como resultado de esta reacción también se genera el subproducto L-citrulina [5,6]. El proceso global tiene lugar en dos etapas. En un primer momento la eNOS hidroxila la L-arginina a N<sup>ω</sup>-hidroxi-L-arginina. Seguidamente la eNOS oxida la N<sup>ω</sup>-hidroxi-L-arginina a L-citrulina y NO [7].

La regulación de la eNOS es compleja. La enzima es susceptible a toda una serie de modificaciones postraduccionales distintas (fosforilación, S-nitrosilación, acetilación, glucosilación, S-glutationilación y tiopalmitilación). La actividad enzimática de la eNOS puede verse favorecida por un conjunto de modificaciones postraduccionales de residuos moleculares específicos que facilitan el flujo de electrones desde el dominio reductasa hasta el dominio oxigenasa. Paralelamente, las modificaciones postraduccionales de una serie distinta de residuos moleculares puede producir el efecto contrario. La biodisponibilidad de los cofactores afecta también al rendimiento enzimático. Los elementos reguladores de la actividad de la eNOS pueden estar presentes simultáneamente, de modo que la regulación

total de la enzima en un determinado momento resulta de la combinación del conjunto de factores concurrentes [6].

El NO producido por la eNOS de las células endoteliales funciona como un regulador paracrino. Difunde hasta las células del músculo liso vascular subyacentes y atraviesa su membrana celular para alcanzar el citoplasma. Una vez allí activa la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) y pone en marcha la síntesis del mensajero secundario guanosín monofosfato cíclico (GMPc) a partir de guanosín trifosfato (GTP). El GMPc activa una proteína quinasa dependiente del GMPc (PKG), específicamente la isoforma PKG-I. La PKG-I es capaz de fosforilar el receptor de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) ubicado sobre el retículo sarcoplásmico, frenando así el vaciamiento de las reservas intracelulares de calcio. Adicionalmente, la PKG-I puede fosforilar el fosfolamban, una proteína situada en la membrana del retículo sarcoplásmico encargada de regular la actividad de la ATPasa de calcio (también conocida como bomba de calcio del retículo sarcoplásmico o SERCA). Cuando el fosfolamban se encuentra fosforilado promueve la actividad de SERCA y favorece por consiguiente la recaptación del calcio citosólico libre. La PKG-I participa también en la inhibición de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK). En ausencia de GMPc y en presencia de calcio, la MLCK fosforila las cadenas ligeras reguladoras de miosina. La miosina fosforilada puede interactuar con la actina e iniciar el proceso de contracción muscular. La PKG-I fosforila la MLCK. La MLCK fosforilada presenta menor afinidad por el complejo  $Ca^{2+}/CaM$  encargado de activarla. De por sí la depleción de los niveles intracelulares de calcio trae consigo una disminución de la cantidad de complejos  $Ca^{2+}/CaM$ , lo cual dificulta todavía más la actividad enzimática de la MLCK. Por otra parte, la PKG-I fosforila y activa la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP). Esta enzima defosforila las cadenas ligeras reguladoras de miosina, de modo que en definitiva logra impedir la contracción muscular. La PKG-I estimula además la apertura de los canales de potasio regulados por calcio ( $BK_{Ca}$ ). La apertura de los canales  $BK_{Ca}$  produce una salida masiva de potasio que conduce a la hiperpolarización de la membrana celular. En consecuencia, los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC) se cierran y la concentración intracelular de calcio disminuye. La PKG-I puede interferir directamente con la actividad de los VDCC [8]. En resumidas cuentas, el GMPc desencadena una cascada de señalización intracelular que termina produciendo una hiperpolarización dependiente del endotelio (*endothelium-derived hyperpolarization* o EDH en inglés) en las células que integran el músculo liso vascular. La hiperpolarización induce la relajación de la capa muscular de los vasos sanguíneos. Es así como el NO generado por las células endoteliales es capaz de producir vasodilatación.

La liberación con función vasoprotectora de NO es desencadenada por la presencia a nivel local de trombina y de sustancias segregadas por plaquetas en proceso de agregación. La serotonina (5-HT) en primer lugar y la adenosina difosfato (ADP) de manera algo más secundaria son dos de los mediadores liberados por los agregados plaquetarios capaces de activar la eNOS y potenciar la producción de NO. Así pues, cuando se da la agregación plaquetaria en arterias cuyo endotelio se encuentra en estado óptimo, la 5-HT y la ADP liberada por las plaquetas y la trombina generada localmente estimulan indirectamente la relajación del músculo liso vascular subyacente gracias a la producción de NO por parte de las células endoteliales. La relajación del tono vascular inducida por este mecanismo va acompañada de un incremento del flujo sanguíneo, hecho que interfiere mecánicamente con el agravamiento de la coagulación. Por el contrario, cuando el endotelio se encuentra dañado o incluso totalmente ausente, este mecanismo vasoprotector deja de darse. La 5-HT y el tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) liberados por los agregados plaquetarios alcanzan directamente

las células musculares lisas y provocan la contracción de las mismas. Como consecuencia, el fenómeno de agregación plaquetaria se ve favorecido y el flujo sanguíneo local queda notablemente comprometido [3].

La capacidad de las células endoteliales para producir NO puede ser regulada a la alza o a la baja por toda una serie de factores. El aumento tanto agudo como crónico del flujo sanguíneo y el incremento inherente de las fuerzas de cizallamiento aumentan la actividad de la eNOS y, por consiguiente, la liberación de NO. La biodisponibilidad del aminoácido semi-esencial L-arginina es raramente un factor limitante para la producción endotelial de NO. Sin embargo, la carencia crónica del cofactor BH<sub>4</sub> trae consigo una disminución de las relajaciones dependientes del endotelio mediadas por el NO. Los estrógenos influyen a largo plazo sobre la función de las células endoteliales. Desempeñan un papel protector frente al desarrollo de la disfunción endotelial. Su unión a los receptores ER $\alpha$  endoteliales provoca un aumento de la producción de NO y de PGI<sub>2</sub>. La insulina facilita la ocurrencia de vasodilataciones dependientes del NO. Esta propiedad se analizará en más detalle en el apartado 4.3. del trabajo. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) también estimula la actividad de eNOS. El tejido adiposo perivascular (TAPV) localizado en la capa adventicia de los vasos sanguíneos tiene la capacidad de regular el tono del músculo liso vascular al que rodea mediante la liberación de una serie de factores conocidos como adipoquinas. Los factores relajantes derivados de los adipocitos (ADRF) son una clase particular de adipoquinas que inducen vasodilatación. Uno de los ADRF más estudiados es la adiponectina. Se trata de un sensibilizador de la insulina que además es capaz de ejercer un efecto directo sobre la pared vascular limitando el desarrollo de la disfunción endotelial. Disminuye la producción de las ROS, estimula la actividad de la eNOS, aumenta la biodisponibilidad de la BH<sub>4</sub>, suprime la apoptosis de las células endoteliales y promueve la reparación endotelial. La deficiencia de adiponectina prolongada en el tiempo es un factor de riesgo para el desarrollo de disfunción endotelial, hipertensión, enfermedad coronaria, infarto de miocardio y demás complicaciones cardiovasculares. La actividad física impacta profundamente tanto a corto como a largo plazo sobre la reactividad vascular de la circulación coronaria y de la musculatura esquelética. Estimula la liberación de NO y las respuestas mediadas por EDH. Los niveles elevados de HDL ejercen un papel protector frente al desarrollo de disfunción endotelial y enfermedades vasculares varias [3].

Existe, por otra parte, todo un conjunto de factores que limitan la producción endotelial de NO. Una exposición prolongada a presiones sanguíneas altas desencadena disfunción endotelial y acelera el desarrollo de arterioesclerosis. El incremento de los niveles de la dimetilarginina asimétrica (ADMA) –un inhibidor endógeno de la eNOS cuya producción se ve favorecida por el estrés oxidativo– trae consigo la disminución de las vasodilataciones dependientes del endotelio y predispone a la aparición de hipertensión y enfermedad cardiovascular. El envejecimiento limita la capacidad del endotelio para inducir vasodilataciones debido a la ocurrencia simultánea de varios acontecimientos que diezman la biodisponibilidad del NO: la mayor expresión de la enzima arginasa que compite con la eNOS por el sustrato común arginina, el incremento de la producción de ROS y la disminución tanto de la expresión como de la actividad de la eNOS. Paralelamente el envejecimiento provoca una disminución de la liberación de los prostanoides vasodilatadores derivados del endotelio, una disminución en la expresión de la GCs y un aumento de la liberación endotelial de prostaglandinas vasoconstrictoras. La exposición tanto activa como pasiva al tabaco interfiere con las vasodilataciones derivadas del endotelio. La biodisponibilidad del NO se ve comprometida porque la nicotina favorece la

síntesis de ADMA y porque se da un aumento generalizado de la síntesis de ROS. La exposición aguda y crónica a la contaminación ambiental también conduce al aumento de la síntesis de ROS y a la consiguiente disminución de las vasodilataciones derivadas del endotelio. La hipercolesterolemia en general y los niveles elevados de LDL en particular entorpecen las relajaciones derivadas del endotelio. Las formas oxidadas y carbamiladas del LDL obstaculizan las respuestas mediadas por el NO. La obesidad inducida por la dieta estimula la producción de ROS, lo cual perjudica las vasodilataciones mediadas por NO y por EDH y favorece la liberación de prostanoïdes vasoconstrictores derivados del endotelio y la actividad del sistema ET-1, además de contribuir al progreso de la disfunción endotelial. El PVAT inflamado libera de forma masiva toda una serie de adipoquinas que restringen las relajaciones dependientes del endotelio: la quemerina, la leptina, la lipocalina-2, la resistina y la visfatina. La relación entre la obesidad y la disfunción endotelial se verá en mayor profundidad en el apartado 4.2.2. del trabajo [3].

#### 4.1.2. El endotelio vascular regenerado

En condiciones fisiológicas las células endoteliales se disponen formando una monocapa como consecuencia del fenómeno de inhibición por contacto. Permanecen quiescentes durante años hasta que da comienzo su envejecimiento. Es entonces cuando se activa la modalidad de muerte celular programada conocida como apoptosis. Los factores de riesgo cardiovascular aceleran este proceso. Las células endoteliales que mueren y que son retiradas de la zona por el torrente sanguíneo son rápidamente reemplazadas por células endoteliales regeneradas. Las células que conforman el endotelio regenerado son disfuncionales. Desarrollan una disfunción selectiva a las respuestas dependientes de la proteína  $G_i$  sensible a la acción de la toxina de *Bordetella pertussis* (proteína  $G_i$ ). La proteína  $G_i$  se encuentra asociada entre otros a los receptores de 5-HT y a los de trombina, de modo que el endotelio regenerado es incapaz de orquestar relajaciones vasculares mediadas por el NO frente a la presencia local de plaquetas en proceso de agregación. Sin embargo, las respuestas mediadas por la proteína  $G_q$  insensible a la acción de la toxina de *Bordetella pertussis* (proteína  $G_q$ ) no se ven alteradas. La proteína  $G_q$  por su parte está asociada a los receptores de ADP y a los de bradiquinina. La disfunción selectiva del endotelio vascular regenerado disminuye gracias al consumo crónico de ácidos grasos insaturados  $\omega$ -3 y es agravada por el consumo crónico de una dieta hipercolesterolémica. Se considera que la disfunción selectiva de las células endoteliales regeneradas es el primer factor desencadenante de la arterioesclerosis. Como ya se ha explicado con anterioridad, la incapacidad de producir niveles suficientes de NO para hacer frente a la agregación plaquetaria da pie a la aparición de vasoespasmo, al desarrollo de trombosis, a la infiltración de macrófagos, al crecimiento de las células musculares lisas y al establecimiento de una reacción inflamatoria local que desemboca en última instancia en arterioesclerosis. Adicionalmente, la expresión y la actividad de la eNOS de las células endoteliales regeneradas se encuentra reducida. Se observa además que la producción de ROS por parte de las NADPH oxidasas está notablemente aumentada. Todas las células endoteliales regeneradas presentan unos niveles de LDL oxidado (oxyLDL) superiores a la media. Se cree que la presencia aumentada de oxyLDL es responsable de la pérdida selectiva de las respuestas mediadas por la  $G_i$  en el endotelio regenerado. El oxyLDL interfiere con el suministro de L-arginina a la eNOS potenciando la actividad de diversos inhibidores competitivos endógenos (entre otros la ADMA y la arginasa). También provoca la

disminución tanto de la expresión como de la actividad de la eNOS y reduce la biodisponibilidad del NO mediante la activación de las NADPH oxidasas. El mecanismo por el cual la actividad de las NADPH oxidasas perjudica el normal funcionamiento de la eNOS será descrito más adelante [3].

#### 4.1.3. EDHF: el papel vasorregulador del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivado del endotelio

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el endotelio vascular dispone de múltiples herramientas para controlar el tono vascular. Además del NO, existen otras sustancias capaces de provocar vasodilataciones mediadas por “hiperpolarización derivada del endotelio” o EDH. Las respuestas EDH independientes del NO predominan sobre todo en las arterias de menor tamaño. Se ha observado que en algunas de las arterias de mayor calibre estas EDH independientes de NO son prevalentes únicamente cuando la síntesis de NO se encuentra inhibida. De ahí que las EDH puedan en cierto modo tomar el relevo –al menos temporalmente– en caso de darse una disfunción endotelial asociada a una pérdida de la síntesis de NO. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* llevados a cabo sobre arterias coronarias porcinas y caninas respectivamente pusieron de manifiesto que el NO exógeno atenúa las respuestas mediadas por EDH. Adicionalmente, una serie de estudios clínicos realizados en pacientes con cardiopatías isquémicas demostraron que un tratamiento crónico con nitratos no presenta ningún efecto positivo sobre la mortalidad. La totalidad de estos estudios refleja la gran importancia que tiene el equilibrio fisiológico entre el NO y las EDH en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Así pues, el valor del NO va más allá de su papel vasodilatador. También modula directa o indirectamente la síntesis, la liberación y la actividad de diversos mediadores derivados del endotelio, entre otros los prostanoideos vasoconstrictores, la ET-1 y el que en los últimos años ha sido identificado como uno de los principales factores EDH: el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [3,9,10].

Bajo condiciones fisiológicas, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivado del endotelio es generado a partir de los aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) producidos por la eNOS o por las NADPH oxidasas, que son luego dismutados por la isoforma 1 de la superóxido dismutasa (SOD1 o Cu/Zn SOD) endotelial. El papel que desempeña esta ROS en la regulación del tono vascular en un momento dado depende fuertemente del tamaño del vaso sanguíneo sobre el que ejerce su acción. En

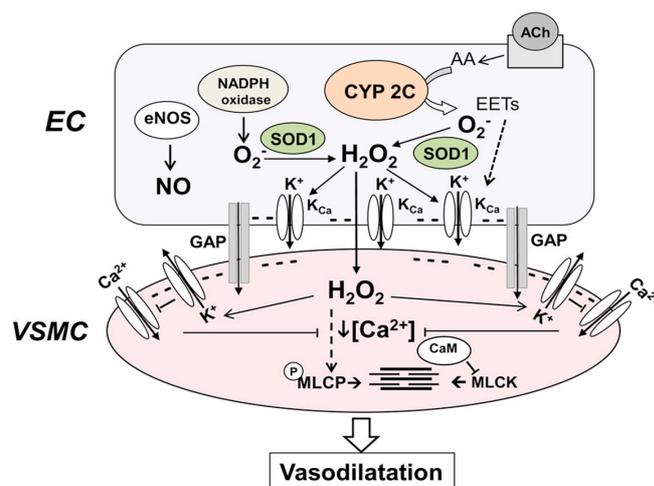


Figura 2: vasodilatación mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Recuperado de: Muñoz M, López-Oliva ME, Pinilla E, Martínez MP, Sánchez A, Rodríguez C, et al. 2017.

efecto se ha demostrado que el NO es el principal vasodilatador dependiente del endotelio en los vasos de conducción mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene un efecto predominante sobre los vasos de resistencia. Ejerce un potente efecto vasodilatador sobre los vasos de resistencia coronarios particularmente. Tanto es así que la alteración de las respuestas mediadas por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede conducir a la aparición de disfunción microvascular coronaria. La respuesta vasodilatadora mediada por las EDH comienza con la hiperpolarización de las células endoteliales que seguidamente se propaga a las células musculares lisas. Así

pues, al igual que ocurre con el NO, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede difundir desde el endotelio hasta el músculo liso vascular concomitante. La hiperpolarización de las células endoteliales sobreviene tras la apertura de los canales de potasio dependientes de calcio (canales K<sub>Ca</sub>) por parte del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En las células del músculo liso vascular, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca la dimerización de la proteína quinasa G<sub>1α</sub> (PKG<sub>1α</sub>). La PKG<sub>1α</sub> activada favorece la activación de los canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia (canales BK). La apertura de los canales BK induce la hiperpolarización de la membrana y, por consiguiente, el cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje y la disminución de los niveles intracelulares de calcio. El conjunto de estos acontecimientos conduce a la vasodilatación [3,9].

#### 4.1.4. Prostanoides

Las enzimas ciclooxigenasas (COX) sintetizan prostanoides tanto vasodilatadores como vasoconstrictores a partir del ácido araquidónico. Los prostanoides que ejercen un efecto vasodilatador son la prostaciclina o prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) y la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), y los que tienen un efecto vasoconstrictor son el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). El desequilibrio entre la producción de prostanoides vasodilatadores y vasoconstrictores a favor de estos últimos contribuye al desarrollo de la disfunción endotelial. La mayor parte de los prostanoides son sintetizados por la isoforma COX-1 por tratarse de una enzima que se expresa de forma constitutiva en el endotelio. La COX-2 por su parte es una isoforma inductible que tiende a activarse cuando detecta estímulos de naturaleza inflamatoria, mitogénica o mecánica. Su expresión es inducida por citoquinas, factores de crecimiento y promotores tumorales. En condiciones fisiológicas su expresión es prácticamente indetectable. Sin embargo, en situaciones de inflamación de bajo grado en la pared vascular, en estados de resistencia a la insulina (como son por ejemplo la diabetes mellitus o la obesidad) y en la hipertensión, la COX-2 se encuentra sobreexpresada y genera principalmente prostanoides vasoconstrictores, de modo que contribuye significativamente a la potenciación del estrés oxidativo vascular y, por ende, al desarrollo de disfunción endotelial [1,3,9].

#### 4.1.5. ET-1 y vasoconstricción dependiente del endotelio

Como ya se mencionó brevemente en la introducción, el endotelio vascular es capaz de regular el tono del músculo liso vascular subyacente mediante la síntesis y liberación de diversas moléculas tróficas y vasoactivas que ejercen efectos bien vasodilatadores o bien vasoconstrictores. El mantenimiento de la homeostasis vascular depende del delicado balance existente entre las relajaciones y las contracciones dependientes del endotelio. Uno de los principales factores contráctiles derivados del endotelio (*endothelium-derived contracting factors* o EDCFs en inglés) responsables del incremento del tono vascular es el péptido vasoconstrictor endotelina 1 (ET-1). La ET-1 ejerce su acción vasoconstrictora, proliferativa e hipertrófica por medio de su unión a dos receptores acoplados a proteínas G situados en la superficie de las células del músculo liso vascular: ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. El receptor ET<sub>B</sub> se encuentra también en las células del endotelio vascular y en el túbulo colector renal, donde participa activamente en la regulación de la excreción de sodio y, por lo tanto, en el control de la tensión arterial. La estimulación del receptor ET<sub>B</sub> endotelial provoca la liberación de NO y PGI<sub>2</sub>. En condiciones fisiológicas, los efectos derivados de la estimulación del receptor ET<sub>B</sub> endotelial contrarrestan aquellos derivados de la estimulación de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>.

musculares. La ET-1 se comporta como un mediador autocrino y paracrino puesto que experimenta un rápido aclaramiento tanto a nivel local por parte de endopeptidasas neutras (NEP), de desaminasas y del propio receptor ET<sub>B</sub> como a nivel de la circulación pulmonar, renal y esplénica. Del mismo modo que el NO modula la síntesis, la liberación y la actividad de diversos mediadores derivados del endotelio (entre otros los prostanoides vasoconstrictores y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), también regula la producción y la acción de la ET-1. La activación de la síntesis de NO (ya sea por medio de la estimulación del receptor ET<sub>B</sub> o por la participación de algún otro potenciador de la actividad de la eNOS) interfiere en la producción de la ET-1 y contrarresta los efectos vasoconstrictores de la ET-1. Por lo general bajo circunstancias fisiológicas la sobreproducción de ET-1 puede ser contrarrestada por el incremento de la liberación de NO que ella misma induce, hecho que a su vez interfiere con su propia síntesis [3].

La ET-1 está involucrada en diversos procesos patogénicos. Se ha observado que su síntesis se encuentra marcadamente favorecida en situaciones de hipoxia y de hiperglicemia. La ET-1 parece intervenir en la patogénesis de la hipertensión arterial. El péptido vasoconstrictor no sólo modula la reabsorción de sodio y agua a la altura del túbulo contorneado sino que también influye en el tono de las arteriolas glomerulares aferentes y eferentes. La vasoconstricción prolongada de las mismas como consecuencia principalmente de la estimulación del receptor ET<sub>A</sub> puede resultar en una reabsorción de sodio y agua excesiva. El incremento de la presión arterial que resulta de este fenómeno produce daños en el endotelio que conducen a un aumento de la expresión de la ET-1. Paralelamente, la ET-1 favorece la síntesis de ROS en el endotelio vascular, ejerce una acción proinflamatoria y profibrótica y promueve el remodelado vascular. Todo esto tiene un impacto innegable sobre el desarrollo de la hipertensión y de la disfunción endotelial. También se ha demostrado el importante papel que desempeña la ET-1 en la patogénesis de la arterioesclerosis y de toda una serie de trastornos de las arterias coronarias, entre los que cabe destacar la disfunción endotelial coronaria, el espasmo coronario, el infarto de miocardio y la lesión por reperfusión miocárdica. La ET-1 aumenta la mitogénesis y, a nivel de la pared vascular, promueve la formación de matriz extracelular y participa en el desarrollo de procesos inflamatorios mediante la estimulación de la expresión de las moléculas de adhesión celular ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en las células endoteliales. Favorece la instauración de la disfunción endotelial pues interfiere con el metabolismo de glúcidos y lípidos, acrecienta el estrés oxidativo y altera las vías de señalización del NO [3,4].

## ***4.2. Especies reactivas del oxígeno, estrés oxidativo, inflamación y disfunción endotelial en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares***

### *4.2.1. Especies reactivas del oxígeno y sus fuentes en la pared vascular*

Las ROS son moléculas inestables que contienen oxígeno (O<sub>2</sub>) y tienen un electrón desapareado, o bien son intermediarios que pueden generar moléculas reactivas. En su conjunto se trata de especies químicas con una alta reactividad que están implicadas en procesos de señalización fisiológicos así como en el desarrollo de las patologías asociadas al estrés oxidativo. Comprenden dos grupos principales de sustancias: por una parte los radicales libres del O<sub>2</sub> –entre los que se encuentran el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>) y el óxido nítrico (NO<sup>·</sup>)– que tienen electrones desapareados, son altamente inestables y poseen una semivida corta; y por otra las especies derivadas del O<sub>2</sub> no

radicalarias –como son por ejemplo el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ), el ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y los hidroperóxidos lipídicos ( $\text{LOOH}$ )– que son algo más estables, menos reactivas y poseen una semivida más larga. Las principales fuentes de ROS en el organismo son las NADPH oxidasas, la xantina oxidasa (XO), la lipooxigenasa (Lox), la mieloperoxidasa (MPO), la NOS y la cadena respiratoria mitocondrial. Todas estas enzimas interactúan entre sí continuamente. El  $\text{O}_2^-$  es producido biológicamente a partir de la reducción del  $\text{O}_2$  en su estado fundamental por captación de un electrón gracias a la intervención de toda una serie de enzimas, entre otras las NADPH oxidasas, la XO, la Lox, la MPO, la eNOS desacoplada y los complejos enzimáticos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial. El  $\text{O}_2^-$  puede transformarse en  $\text{H}_2\text{O}_2$  espontáneamente o bien con ayuda de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Pese a que gran parte del  $\text{O}_2^-$  acaba siendo convertido en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , algunas modificaciones celulares le son atribuibles (como por ejemplo la oxidación de los grupos hemo). La mayor parte del  $\text{H}_2\text{O}_2$  encontrado en el organismo proviene de la dismutación del  $\text{O}_2^-$  anteriormente descrita. Esta molécula presenta una estabilidad significativamente superior a la de las ROS radicalarias y es capaz de atravesar membranas biológicas. Puede producir modificaciones celulares generalmente reversibles tanto sobre dianas adyacentes a su lugar de producción como en regiones algo más distanciadas. Es por ello que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  llega a ejercer una función paracrina entre las células endoteliales y el músculo liso vascular para regular el tono vascular, tal y como se ha indicado con anterioridad. El  $\text{OH}^\cdot$  se origina por la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Debido a su reactividad no selectiva y por lo general irreversible, el  $\text{OH}^\cdot$  puede generar daños importantes en numerosas moléculas biológicas. Desempeña un papel significativo en los daños asociados al estrés oxidativo [9,11].

Las células del organismo están dotadas de mecanismos antioxidantes cuya función es neutralizar las ROS generadas y asegurar el control del potencial *redox* intracelular. Estos mecanismos antioxidantes comprenden sistemas enzimáticos –entre los que se encuentran la SOD (que cataliza la dismutación del  $\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), la catalasa (que transforma el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ ) y la glutatión peroxidasa (que cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de los hidroperóxidos lipídicos a  $\text{H}_2\text{O}$  y a los alcoholes lipídicos respectivamente) y las peroxiredoxinas (o Prx, que eliminan el  $\text{H}_2\text{O}_2$  con ayuda del glutatión o de la tioredoxina)– y sistemas no enzimáticos –el glutatión, el ácido ascórbico, el  $\alpha$ -tocoferol y la tioredoxina–. La señalización *redox* es crucial para la mantenimiento de la homeostasis y de la supervivencia celular. Es por ello que a nivel subcelular existe una clara compartimentalización de las diversas vías de señalización oxidativas y que las enzimas productoras de ROS y los sistemas antioxidantes ocupan espacios claramente diferenciados [9,11].

En condiciones fisiológicas, las ROS son producidas en pequeñas cantidades. Bajo estas circunstancias actúan como segundos mensajeros. Intervienen en vías de señalización complejas que modulan multitud de fenómenos celulares, tales como la migración, la adhesión, la proliferación y la hipertrofia celular, el estrés del retículo endoplásmico, la autofagia, la senescencia, la apoptosis y la diferenciación del fenotipo del músculo liso vascular. A concentraciones fisiológicas activan factores de transcripción como el factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) que estimula la expresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes. Las ROS son moléculas de señalización esenciales para el normal funcionamiento del sistema cardiovascular. En efecto, el NO y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son ROS que contribuyen activamente a la regulación del tono vascular. Sin embargo, a pesar de ser cruciales para el correcto desarrollo de las funciones cardiovasculares, en ocasiones las ROS contribuyen al detrimento de las mismas [11,12]. En función de la fuente de ROS, del

tipo celular implicado en la síntesis y del tejido subyacente, la señalización de las ROS puede participar en la orquestación de procesos fisiológicos o tomar parte en el desarrollo de una respuesta inadecuada que conduzca a disfunción metabólica y señalización inflamatoria [15].

#### 4.2.2. Estrés oxidativo, inflamación y disfunción endotelial en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares

Determinadas situaciones fisiopatológicas (entre las que cabe destacar la hipertensión arterial, la obesidad y la diabetes, consideradas todas ellas estados de resistencia a la insulina) estimulan la producción de ROS. La síntesis excesiva de ROS termina por sobrepasar la capacidad de neutralización de los mecanismos antioxidantes, de manera que sobreviene una alteración en el equilibrio *redox* a favor de las especies oxidantes y, por consiguiente, una perturbación del funcionamiento natural de las vías de señalización oxidativas. La exposición celular a niveles de ROS superiores a la norma puede resultar en daños sobre el ADN, los lípidos y las proteínas, en alteraciones metabólicas y en muerte celular. Este estado de desequilibrio entre los niveles de especies oxidantes y los sistemas antioxidantes es lo que se conoce como estrés oxidativo. El estrés oxidativo hace alusión a un estado de alteración de la homeostasis *redox* caracterizado ante todo por el incremento de los niveles de las ROS. Es conveniente señalar que las publicaciones más recientes apuntan a que el estrés oxidativo implica realmente un desequilibrio del potencial *redox* localizado dentro de un compartimento celular, y no tanto un desorden masivo que afecta por completo a una célula o a un tejido. Considerar que la alteración afecta a la totalidad de una célula, de un tejido o incluso de un organismo sería una basta simplificación, pues no se estarían teniendo en cuenta la complejidad de los fenómenos moleculares que subyacen al desarrollo del estrés oxidativo y que transcurren en compartimentos celulares concretos. Esta visión es clave a la hora de orientar correctamente estrategias terapéuticas destinadas a corregir los trastornos responsables de la alteración de la homeostasis *redox*. Se ha demostrado que el estrés oxidativo es un estado patogénico común a enfermedades de distinta índole, como son entre otras las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson, el Alzheimer, la esquizofrenia o el trastorno bipolar [11,12].

Debido a su disposición en el organismo y a su implicación en la regulación de la perfusión tisular, el endotelio vascular se encuentra altamente expuesto a los efectos nocivos del estrés oxidativo [4]. La desregulación molecular del metabolismo de las ROS juega un papel crucial en la patogénesis de la inflamación vascular y de la disfunción endotelial que subyacen a la arterioesclerosis, a la hipertensión, a la enfermedad arterial coronaria y a las complicaciones vasculares de diabetes, obesidad y otras patologías que cursan con resistencia a la insulina [9,12]. Algunos acontecimientos desencadenantes de enfermedades cardiovasculares (como pueden ser el bloqueo del flujo sanguíneo o la ocurrencia de una lesión mecánica) resultan en una mayor producción de ROS por parte del endotelio vascular. En los últimos años se ha demostrado que esta sobreproducción de ROS es consecuencia de la disfunción de las enzimas encargadas de generarlas. La síntesis excesiva de ROS se acompaña además de una disminución de su aclaramiento dado que la capacidad de las células vasculares para degradarlas se ve comprometida y que, por lo general, la distribución de las mismas es limitada, de modo que se produce en última instancia una acumulación local de especies oxidativas. La alteración de la homeostasis *redox* resultante afecta al normal funcionamiento de las vías de señalización de las ROS, por lo que los fenómenos de

migración y proliferación celular, senescencia, apoptosis, estrés del retículo endoplásmico y autofagia se ven favorecidos [11].

Hay tres enzimas productoras de ROS que contribuyen significativamente al progreso del estrés oxidativo a nivel vascular y, por consiguiente, al desarrollo de enfermedades cardiovasculares: las NADPH oxidasas, la XO y la eNOS desacoplada. Las NADPH oxidasas ejercen un papel protagonista en el proceso general puesto que son responsables de la disfunción de la eNOS y de la XO. Las ROS producidas por las NADPH oxidasas en cantidades excesivas alteran la función de las demás enzimas oxidasas, de tal manera que éstas terminan también generando ROS a niveles superiores a los fisiológicos. A este fenómeno bioquímico de retroalimentación se le conoce como “ciclo vicioso del estrés oxidativo” [11]. Las NADPH oxidasas son complejos multisubunidad que catalizan la reducción del  $O_2$  a  $O_2^{\cdot-}$  o a  $H_2O_2$  empleando el NADPH como donante de electrones. Generan estas ROS de forma primaria y no como subproductos de otras reacciones. Las NADPH oxidasas localizadas en células no fagocíticas conforman la familia NOX. Esta familia está integrada por siete isoformas de las que solo la Nox1, la Nox2, la Nox4 y la Nox5 se localizan en la membrana plasmática y en compartimentos subcelulares como la mitocondria, el retículo endoplásmico, el núcleo y los lisosomas de las células endoteliales, de las células musculares lisas y de los fibroblastos. Constituyen una fuente importante de ROS en el sistema vascular y participan significativamente tanto en procesos fisiológicos como patológicos vasculares. En situaciones fisiológicas normales, las Nox producen niveles no citotóxicos de ROS que intervienen en la señalización *redox*. La actividad de las Nox es estimulada principalmente por la angiotensina II, por la ET-1, por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y por las fuerzas de cizallamiento. La exposición crónica de las Nox a estos estímulos y a la presencia de citoquinas inflamatorias, de LDL oxidadas, de hiperglucemia y de metabolitos del tabaco produce daños en su función enzimática que conducen a la sobreproducción de  $O_2^{\cdot-}$ .

Como se ha mencionado anteriormente, la síntesis excesiva de ROS por parte de las Nox provoca la disfunción de la XO y de la eNOS, lo cual contribuye al progreso del estrés oxidativo y de la disfunción endotelial [12]. Bajo condiciones fisiológicas, la eNOS produce NO en presencia de L-arginina y  $BH_4$ . La  $BH_4$  es un cofactor esencial para la enzima pues regula su actividad a

múltiples niveles: promueve la unión del sustrato L-arginina al grupo prostético hemo, participa en la transferencia electrónica y estabiliza la formación del homodímero. Cuando la disponibilidad de  $BH_4$  se ve comprometida, la estructura dimérica se torna inestable y la actividad catalítica disfuncional. La reducción enzimática

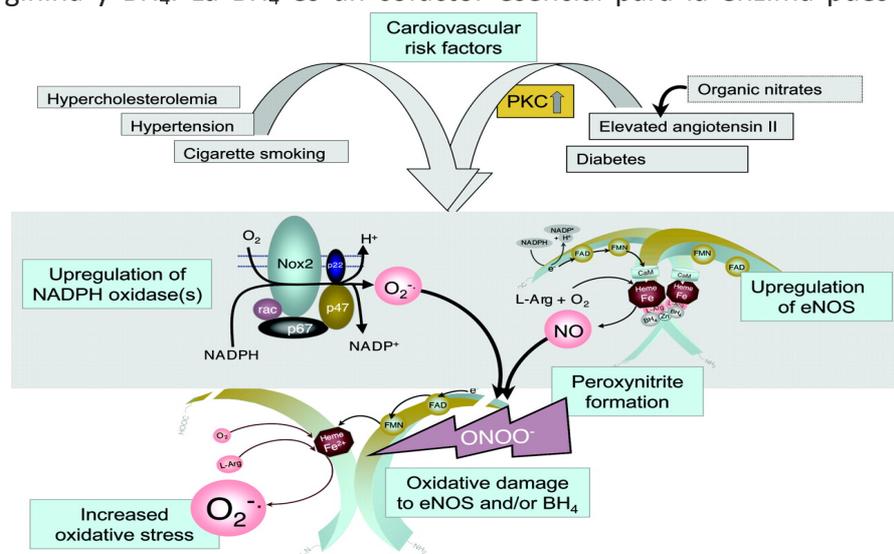


Figura 3: Mecanismos por los que los factores de riesgo cardiovascular provocan estrés oxidativo y disfunción endotelial. Recuperado de: Förstermann U, Münzel T, 2006.

de la molécula de  $O_2$  deja de estar acoplada a la oxidación de la L-arginina. El complejo establecido entre el hemo-ferroso y el  $O_2$  en el dominio oxigenasa se disocia y en lugar de producir NO, la eNOS desacoplada pasa a generar radicales  $O_2^{\cdot-}$ . El NO presente en el medio reacciona con el  $O_2^{\cdot-}$  para producir peroxinitrito ( $OONO^-$ ). El cofactor  $BH_4$  es altamente sensible a la oxidación por parte del  $OONO^-$ . Como resultado de la oxidación de la  $BH_4$  se generan dos formas biológicamente inactivas: el radical  $BH_3^{\cdot}$  o la 6,7-[8H]- $H_2$ -biopterina ( $BH_2$ ). Además de inactivar las moléculas de  $BH_4$ , el  $OONO^-$  favorece la degradación mediada por el proteasoma de la enzima limitante de la reacción de síntesis del cofactor en cuestión: la GTP-ciclohidrolasa. Por añadidura, el  $OONO^-$  oxida el residuo Cys99 del grupo zinc-tiolato de la eNOS, lugar de unión de la  $BH_4$  a la enzima. También estimula la fosforilación del residuo Ser1179 de la eNOS por parte de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Esta modificación postraducciona de la enzima aumenta el flujo electrónico y, por consiguiente, favorece la actividad catalítica [1,7,13]. El desacoplamiento de la eNOS incrementa los niveles de ROS y disminuye la presencia protectora de NO, contribuyendo así al desarrollo de disfunción endotelial. Este paso de la eNOS de ser una enzima protectora a participar activamente en la potenciación del estrés oxidativo ha sido descrita en pacientes con hipertensión esencial, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, patologías renales crónicas, arterioesclerosis, lesión por reperfusión miocárdica, insuficiencia cardiaca sistólica, arteriopatía coronaria o hipertensión pulmonar así como en fumadores crónicos y en pacientes tratados con nitroglicerina [7,13]. En un principio se pensó que el déficit de relajaciones dependientes del endotelio vascular característico de la disfunción endotelial provocada por factores de riesgo cardiovascular podía ser debido en parte a la infraexpresión de la eNOS. Sin embargo se ha observado que los factores de riesgo cardiovascular se asocian más bien a una sobreexpresión de la enzima en cuestión. Esto puede ser debido a la presencia excesiva de  $H_2O_2$ . El  $H_2O_2$  puede incrementar la expresión de eNOS por medio de mecanismos traduccionales y postraduccionales [7].

La tercera enzima que participa activamente en el progreso del estrés oxidativo es la XO. La XO es una xantina oxidoreductasa (XOR) que cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y de la xantina a ácido úrico. La forma funcional de las enzimas XOR es homodimérica. Cada una de las subunidades que conforman el homodímero alberga una fracción de molibdeno, dos centros  $Fe_2-S_2$  y una FAD. Existen dos formas funcionales de XOR en el organismo: la xantina deshidrogenasa (XDH) y la XO. Mientras que la primera emplea el  $NAD^+$  como aceptor de electrones, la segunda utiliza  $O_2$ . La acción catalítica de la XO implica la producción de ROS, especialmente  $O_2^{\cdot-}$ . El  $O_2^{\cdot-}$  producido por las Nox es responsable de la transformación de la XDH en XO por medio de la oxidación de los grupos tiol del centro activo y la posterior modificación proteolítica irreversible. La presencia incrementada de XO trae consigo un aumento de los niveles circulantes de  $O_2^{\cdot-}$ . Junto con las Nox y la eNOS desacoplada, la XO contribuye al agravamiento del estrés oxidativo y al desarrollo de la disfunción endotelial [12,14].

La inflamación y el metabolismo son dos entidades que se encuentran íntimamente interrelacionadas. Tanto es así que multitud de enfermedades metabólicas (como por ejemplo el síndrome metabólico, la diabetes mellitus o la obesidad) y cardiovasculares (entre otras la arterioesclerosis) cursan con un cuadro de inflamación crónica de bajo grado. Algunos agonistas inflamatorios –como son el  $TNF\alpha$ , la  $IL-1\beta$  y la trombina entre otros– emplean las ROS como parte de sus cascadas de señalización. Generalmente las ROS activan el factor de transcripción  $NF-\kappa\beta$ . La activación de las rutas de señalización de  $NF-\kappa\beta$  desemboca en la expresión de agentes proinflamatorios (entre los que cabe destacar las

moléculas de adhesión celular VCAM, ICAM-1 y E-selectina por tratarse de receptores que regulan la afluencia de monocitos y otras células inflamatorias a la pared arterial), en la activación del proteasoma, en la transcripción de genes antioxidantes, en la activación del inflammasoma y en la estimulación de la secreción de citoquinas. Se ha asociado la actividad de las vías de señalización del NF- $\kappa$ B con estados de resistencia a la insulina, con la obesidad y con la arterioesclerosis. Al igual que ocurre con los agonistas inflamatorios, las fuerzas de cizallamiento oscilatorias también pueden conducir a la activación de NF- $\kappa$ B mediante la intervención de las ROS. El O<sub>2</sub><sup>-</sup> generado por las Nox endoteliales activa al factor NF- $\kappa$ B, lo cual contribuye al agravamiento del estrés oxidativo y del daño endotelial. Las ROS producidas por los complejos I,II y III mitocondriales juegan un papel determinante en los procesos inflamatorios. La exposición de las mitocondrias a determinadas situaciones de estrés celular puede conducir a un aumento de la producción de las ROS mitocondriales debido a un exceso de la actividad de los sistemas liberadores de sustancias oxidantes o a una pérdida de la actividad antioxidante. Un subgrupo de enzimas tipo Nox4 se localizan en las mitocondrias y regulan la producción de estas ROS. Por otro lado se ha demostrado que los productos secundarios de las ROS (como por ejemplo los productos de la peroxidación lipídica) también son mediadores de la señalización metabólica e inflamatoria. Los fosfolípidos oxidados (productos de la peroxidación lipídica) participan en la patogénesis de la arterioesclerosis [2,15].

Para comprender el estrecho vínculo existente entre el estrés oxidativo, la disfunción endotelial y la inflamación y los efectos patogénicos que ejercen en el organismo, es interesante tomar como referencia la obesidad. La obesidad es un desorden metabólico y un agente clave en el desarrollo de resistencia a la

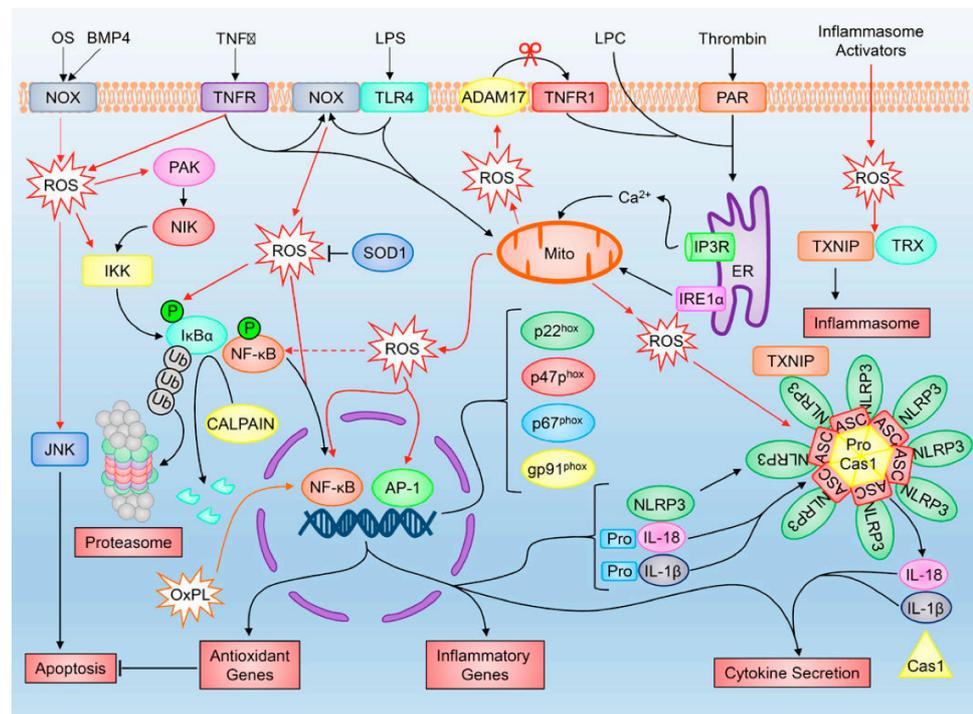


Figura 4: las ROS y la inflamación. Recuperado de: Forrester SJ, Kikuchi DS, 2018.

insulina, de síndrome metabólico y de diabetes mellitus tipo 2, siendo todas estas patologías factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Tanto el estrés oxidativo vascular como la inflamación vascular juegan un papel determinante en el desarrollo de la disfunción endotelial en los estadios tempranos de la obesidad. El principal factor causal de la disfunción endotelial en la obesidad es la pérdida de la biodisponibilidad del NO. Como consecuencia de las alteraciones que afectan a la regulación del metabolismo de los nutrientes en la obesidad resultantes de la falta prolongada de balance entre el

ingreso y el gasto energético, los adipocitos experimentan una hipertrofia significativa. El perfil secretor del tejido adiposo depende íntimamente de la masa tisular. Debido al incremento del tamaño y del número de los adipocitos, el tejido adiposo hipertrofiado en la obesidad desarrolla un fenotipo proinflamatorio que se caracteriza ante todo por la sobreproducción de ROS, por la secreción excesiva de ácidos grasos libres (*free fatty acids* o FFAs en inglés) y por presentar un perfil de liberación de adipoquinas inusual. Los niveles tanto circulantes como tisulares de leptina, de resistina, de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ , de plasminógeno, de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) se encuentran aumentados. La expresión de la adipoquina antiinflamatoria adiponectina sin embargo está reducida, de modo que se pierde su efecto vasoprotector mediado por el NO. En general los adipocitos experimentan un incremento de su gasto metabólico como consecuencia del estado de hipertrofia al que se ven expuestos. Dado que la irrigación sanguínea que recibe el tejido adiposo no alcanza a suplir su elevada demanda metabólica, acaba sobreviniendo un estado de hipoxia. La hipoxia es una causa subyacente de los procesos inflamatorios que sobrevienen en el tejido adiposo en la obesidad. Estimula la infiltración de los macrófagos y de los linfocitos T CD4+ y CD8+, aumenta la liberación de citoquinas inflamatorias y potencia el desarrollo del estrés oxidativo. El fenotipo proinflamatorio que adopta el tejido adiposo en la obesidad es responsable de la inflamación de bajo grado que conduce al desarrollo de resistencia a la insulina en las células endoteliales, en el músculo esquelético y en el hígado. Recientemente se ha descrito el impacto crucial que el estrés oxidativo del tejido adiposo perivascular (TAPV) parece tener sobre la patogénesis de la disfunción endotelial y de la inflamación vascular asociada a la obesidad. Las propiedades protectoras del TAPV frente a la vasoconstricción se pierden como consecuencia de la producción excesiva de ROS resultante de la hipertrofia y de la infiltración de células inflamatorias a las que se ve expuesto este tejido. El TAPV también adquiere un fenotipo proinflamatorio y experimenta una alteración en su perfil secretor de adipoquinas y demás citoquinas. Los niveles patológicos de FFAs ejercen efectos nocivos sobre la función endotelial normal que se engloban bajo el término “lipotoxicidad”. Por medio de la activación de las NADPH oxidasas y de la inhibición tanto de la expresión como de la actividad de la eNOS, los FFAs inducen cuadros de estrés oxidativo, promueven la proliferación de las células endoteliales y favorecen la inflamación vascular. El estrés oxidativo generado por la lipotoxicidad activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo cual no hace sino agravar aún más la disfunción endotelial puesto que el NF- $\kappa$ B regula a la alza la actividad de las NADPH oxidasas en las células endoteliales y estimula la expresión de genes que codifican para moléculas de adhesión, para la enzima COX-2 y para las citoquinas proinflamatorias IL-6, TNF $\alpha$  y proteína C reactiva (CRP). Por otro lado, el estrés oxidativo en la obesidad altera la vasodilatación mediada por los prostanoideos. Se ha visto que el OONO<sup>-</sup> es capaz de inactivar a la PGI<sub>2</sub> sintasa y que la COX-2 se encuentra sobreexpresada [1,2,4].

#### **4.3. Resistencia a la insulina y disfunción endotelial**

La insulina ejerce sus acciones metabólicas por medio de su unión a receptores tipo tirosina quinasa. La unión de la hormona anabólica a su receptor provoca la activación simultánea de dos vías de señalización: la vía PI3K/Akt y la vía Ras-Raf-MAPK. La primera es responsable de los efectos anabólicos de la insulina, de su papel en la regulación de la homeostasis glucídica y de su acción vasodilatadora. La activación de esta ruta favorece la captación de la glucosa

circulante por parte de los músculos esqueléticos y del tejido adiposo mediante la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana celular. Por medio de esta misma vía de señalización se controla el transporte trans-endotelial de la propia insulina necesario para asegurar el aporte de la hormona a sus tejidos diana y la captación de glucosa. En las células endoteliales, la Akt fosforila el residuo Ser1178 de la eNOS provocando su activación y la consiguiente producción de NO. Por su parte, la ruta Ras-Raf-MAPK favorece la producción del péptido vasoconstrictor ET-1 y la expresión de moléculas de adhesión y estimula la proliferación de las células del músculo liso vascular, la vasoconstricción y la inflamación vascular. Presenta toda ella un carácter proaterogénico. Bajo condiciones fisiológicas, los efectos nocivos de la ET-1 sobre el sistema vascular son perfectamente contrarrestados por la producción de NO inducida no solo por la propia insulina, sino también por la unión de la ET-1 al receptor ET<sub>B</sub> [3,16,17].

La resistencia a la insulina es un estado caracterizado por la pérdida de la sensibilidad a los efectos metabólicos de la insulina y por la disminución de la captación tisular de glucosa. Se trata de una alteración comúnmente presente en desórdenes metabólicos como la diabetes mellitus tipo 2, el síndrome metabólico, la obesidad, la intolerancia a la glucosa y las dislipidemias además de en enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión, la arteriopatía coronaria y la arterioesclerosis. La falta de sensibilidad de los vasos sanguíneos a la acción de la insulina, que se conoce como “resistencia vascular a la insulina”, compromete gravemente el suministro de los nutrientes vehiculizados por la sangre a los tejidos. Se ha observado que las vasodilataciones dependientes del endotelio y el reclutamiento capilar inducidos por la insulina se encuentran perjudicados en estados de resistencia a la insulina tales como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. Los mecanismos de transporte trans-endotelial de la insulina también se ven dañados como consecuencia de la resistencia vascular a la insulina. La perturbación del suministro de insulina y glucosa a los tejidos diana contribuye al desarrollo de resistencia metabólica a la insulina. En la resistencia vascular a la insulina, la vía de señalización PI3K/Akt sufre una disfunción selectiva mientras que la vía Ras-Raf-MAPK permanece inalterada o experimenta incluso cierta intensificación. Este desequilibrio entre las vías de señalización implica la pérdida de los efectos vasodilatadores de la insulina mediados por el NO y el dominio de sus acciones proaterogénicas y mitogénicas por acción del péptido vasoconstrictor ET-1. La resistencia metabólica a la insulina genera una hiperinsulinemia compensatoria para asegurar el control de la glucemia. A nivel vascular, esta hiperinsulinemia acrecienta más aún el desequilibrio establecido entre los efectos vasoconstrictores y vasodilatadores de la insulina [3,17].

La obesidad visceral es uno de los principales agentes causales de resistencia a la insulina. La disfunción endotelial en los individuos obesos está altamente influenciada por el grado de resistencia a la insulina y depende en gran medida del descenso de la producción de NO dependiente de la insulina. El tejido adiposo inflamado es una fuente de ROS, FFAs y citoquinas inflamatorias que pueden afectar a los mecanismos de señalización de la insulina en las células endoteliales. La exposición prolongada a este tipo de sustancias propicia el desarrollo de resistencia a la insulina tanto metabólica –en aquellos tejidos cuya demanda metabólica es especialmente elevada, véase el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo– como vascular y el progreso de la disfunción endotelial. Los FFAs y los intermediarios lipídicos derivados del metabolismo de los FFAs tales como las ceramidas y el diacilglicerol (DAG) interfieren con la normal actividad de la insulina pues activan una serie de quinasas (entre otra la PKC $\beta$  y la IKK $\beta$ ) que bloquean la vía de señalización PI3K/Akt/eNOS. Favorecen además la producción de ROS y, por lo tanto, el progreso del

estrés oxidativo y de la inflamación. Por su parte, las citoquinas inflamatorias liberadas por el tejido adiposo hipertrófico (como por ejemplo el TNF $\alpha$ , la Il-6 y la CRP) se interponen en la activación de la eNOS dependiente de la insulina e inducen la actividad de las NADPH oxidasas. La compleja interrelación existente entre toda esta serie de acontecimientos determina la generación de disfunción endotelial y de resistencia a la insulina en la obesidad. Cabe resaltar particularmente el papel crucial que el TAPV parece desempeñar en la regulación de la vasorreactividad dependiente de la insulina y, por ende, en el desarrollo de la resistencia vascular a la insulina [3].

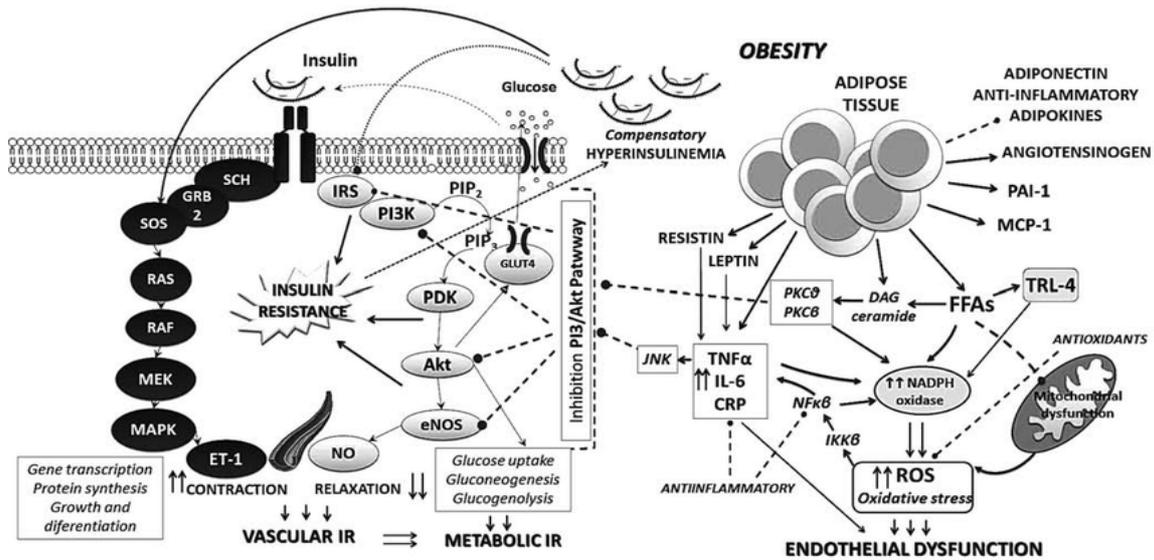


Figura 5: desarrollo de resistencia vascular a la insulina en la obesidad. Recuperado de: Prieto D, Contreras C, Sanchez A, 2014.

## CONCLUSIONES

Las células endoteliales sanas mantienen la homeostasis vascular a través de la regulación del balance establecido entre los factores vasodilatadores y los vasoconstrictores. El NO es un agente vasodilatador con efecto anticoagulante, antiagregante, antitrombótico y antiinflamatorio que protege frente a la ocurrencia de vasoespasmos y el desarrollo de arterioesclerosis. Los EDHF –entre los que destaca el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>– son también factores clave en la inducción de la relajación vascular mediada por las células endoteliales. El equilibrio fisiológico entre el NO y las EDH es de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis vascular. El deterioro de las funciones endoteliales generales conduce al desarrollo de disfunción endotelial. La disfunción endotelial subyace a la arterioesclerosis, a la hipertensión, a la enfermedad arterial coronaria y a las complicaciones vasculares de la obesidad y demás patologías que cursan con resistencia a la insulina. Constituye por lo tanto un signo distintivo e indicador de enfermedad cardiovascular. Las ROS, que en condiciones fisiológicas son producidas en cantidades mínimas, intervienen en vías metabólicas claves para el mantenimiento de la homeostasis y de la supervivencia celular. La desregulación de la actividad de las Nox, de la eNOS y de la XO sumada a la disminución del aclaramiento de las ROS es responsable de la alteración de la señalización *redox* que caracteriza al estrés oxidativo. Las ROS producidas a niveles elevados juegan un papel crucial en la patogénesis de la inflamación vascular. El estrés oxidativo y la inflamación contribuyen significativamente al descenso de la biodisponibilidad del NO, una de las principales causas de la disfunción

endotelial. La resistencia vascular a la insulina también induce disfunción endotelial puesto que provoca la pérdida de los efectos vasodilatadores de la insulina mediados por el NO y el dominio de sus acciones proaterogénicas y mitogénicas. En la obesidad, el estrés oxidativo, la infamación y la lipotoxicidad generados a raíz de la hipertrofia del tejido adiposo colaboran en la producción de disfunción endotelial. El fenotipo proinflamatorio del tejido adiposo es responsable de la inflamación de bajo grado que conduce al desarrollo de resistencia vascular y metabólica a la insulina.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Prieto D, Contreras C, Sánchez A. Endothelial Dysfunction, Obesity and Insulin Resistance. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2014; 12:412-426.
- [2] Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VWM. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res*, 2008 (335):article 165.
- [3] Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiol.* 2017; 219:22-96.
- [4] Hadi HAR, Carr CS, Suwaidi JA. Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors. Therapy, and Outcome. *Vasc Health Risk Manag.* 2005 (3):183-198.
- [5] Aleixandre MA, Ortega AI. Óxido nítrico. Función y disfunción endotelial. España: Editorial Complutense; 2000. p. 6-35.
- [6] Shu X, Stevenson TC, Begandt D, Butcher HT, Biber L, Keller AS *et al.* Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72(23):4561-4575.
- [7] Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease. *Circulation.* 2006 (113):1708-1714.
- [8] Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol Sci.* 2015; 129(2):83-94.
- [9] Prieto D. Reactive oxygen species: role in vascular function and in metabolic disease-associated endothelial dysfunction. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.* 2019; 85(4):288-300.
- [10] Godo S, Shimokawa H. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthase system in maintaining cardiovascular homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2017; 109:4-10.
- [11] Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2015 (116): 531-549.
- [12] Schramm A, Mausig P, Osmenda G, Guzik TJ. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul Pharmacol.* 2012 (56): 216-231.
- [13] Montezano AC, Touyz RM. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function – Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011 (110): 87-94.
- [14] Weseler AR, Bast A. Oxidative Stress and Vascular Functions: Implications for Pharmacologic Treatments. *Curr Hypertens Rep.* 2010; 12(3):154-161.
- [15] Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.* 2018; 122(6):877-902.
- [16] Grandl G, Wolfrum C. Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome. *Semin Immunopathol.* 2018;40(2):215-224.
- [17] Ormazabal V, Nair S, Elfeky O, Aguayo C, Salomon C, Zuñiga FA. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17:122.
- [18] Muñoz M, López-Oliva ME, Pinilla E, Martínez MP, Sánchez A, Rodríguez C, *et al.* CYP epoxygenase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is involved in the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and relaxation of intrarenal arteries. *Free Radical Bio Med.* 2017;106:168-183.