



Artículo de revisión

Disfunción endotelial y estrés oxidativo

Guillermo Ceballos Reyes,* Israel Ramírez Sánchez,*
Claudia C Calzada-Mendoza,* Ivonne M Olivares-Corichi*

* Laboratorio Multidisciplinario de Bioquímica, Sección de Estudios de Postgrado e Investigación. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

Abreviaturas

PKC: Proteína cinasa C
ET-1: Endotelina-1
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
RL: Radical libre
ER: Especie reactiva
RMEE: Resonancia magnética de espín electrónico
TBA: Ácido tiobarbitúrico
MDA: Malondialdehído
4-HNE: 4 hidroxinonenal
SOD: Dismutasa de superóxido
CAT: Catalasa
GSHPOx: Peroxidasa de glutatión

Correspondencia:

Dr. Guillermo Ceballos Reyes
Escuela Superior de Medicina SEP.
Edificio 3, 3er piso. Plan de San Luis y
Díaz Mirón s/n Col. Casco de Santo
Tomás, Delegación Miguel Hidalgo, 11340
México, D.F. Tel: 5729-6300 ext 628-20
Fax: 5729-6300 ext 62794
E-mail: gceballosr@ipn.mx

Fecha de recepción: 16-Mayo-2006

Fecha de aceptación: 10-Diciembre-2006

Resumen

El endotelio vascular permite el paso de moléculas hacia los órganos y tejidos, la coagulación sanguínea, la liberación de agentes vasoactivos y la angiogénesis. Estas funciones se realizan con la participación de moléculas que llegan a la célula endotelial o por las que son producidas por esta misma. Recientemente se ha encontrado que los radicales libres pueden modular la actividad del endotelio y no se sabe con exactitud si son causa o consecuencia de patologías relacionadas con el sistema vascular. En enfermedades como la aterosclerosis, diabetes e hipertensión arterial participan la disfunción del endotelio vascular, los radicales libres, las especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y cloro. Dichas moléculas provienen de varias fuentes de oxidación como son las enzimas NAD(P)H-oxidasa, xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa, mieloperoxidasa, lipooxigenasa. La determinación de las especies reactivas se puede realizar mediante varios métodos que han adquirido gran importancia como herramientas en el seguimiento de las enfermedades crónico-degenerativas.

Palabras clave: Disfunción endotelial, estrés oxidativo.

Revista de Endocrinología y Nutrición 2006; 14(4): 233-236.

Abstract

In the vascular endothelium to cross molecules, the blood coagulation is carried out, the production of vasoactive agents and angiogenic process. These functions are realized with the participation of substances circulating or in situ synthesized. Recently, has been found that free radicals can modulate the activity of endothelium and it is unclear if these are cause or consequence of pathologies related with vascular system. In diseases such as atherosclerosis, diabetes and hypertension include vascular endothelium dysfunction, which is related with free radical and reactive oxygen, nitrogen and chlorine species. The source of those species can be NAD(P)H-oxidase, xantine oxidase, nitric oxide synthase, mieloperoxidase, lipooxygenase, mitochondrial metabolism and transition metals. To determinate of reactive species can be through direct identification of free radical using electron paramagnetic resonance, assessing damage produced and measuring antioxidant capacity. All of these tests have acquired importance like tools in chronic degenerative diseases assessment.

Key words: Oxidant stress, endothelial dysfunction.

Revista de Endocrinología y Nutrición 2006; 14(4): 233-236.

El endotelio vascular es una estructura que reviste el interior de los vasos sanguíneos y posee diversas funciones, tales como: permitir el paso de moléculas hacia los órganos y tejidos, la coagulación sanguínea, la liberación de agentes vasoactivos y la angiogénesis. Estas funciones se realizan con la participación de moléculas, entre las que se

encuentran receptores acoplados a proteínas G (que tienen diversos efectos), la prostaciclina (inhibe la agregación plaquetaria), la endotelina (acción vasoconstrictora); el óxido nítrico (vasodilatador), entre otras moléculas.^{1,2}

Las células endoteliales responden a diferentes estímulos, como la presión sanguínea, la hipoxia y radicales

libres. Los radicales libres participan en diversas funciones biológicas, por ejemplo activan a las proteínas AP-1, AP-2 que modulan la proliferación celular y la morfogénesis; aunado a lo anterior se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son capaces de modular las PKC (proteína cinasa C), que influyen en el crecimiento celular, activación de citocinas y en la angiogénesis, procesos que cuando se intensifican dan origen a diferentes patologías relacionadas con el lecho vascular como son la aterogénesis e hipertensión. Esto se debe a que los radicales de oxígeno actúan aumentando la expresión de endotelina-1 (ET-1), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).³

Como ejemplo de patologías que están relacionadas con la disfunción endotelial y estrés oxidativo se encuentra el síndrome metabólico pre-diabético, esta es una patología que se caracteriza por presentar niveles elevados del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) teniendo como consecuencia el incremento de especies reactivas de oxígeno.⁴ En este mismo sentido se ha identificado que en las coronariopatías están elevados los niveles de NAD(P)H oxidasa, una fuente de especies reactivas de oxígeno.⁵

Con relación a la hipertensión se ha encontrado que ésta se eleva por la acción de radicales libres, debido a que inhiben la producción del óxido nítrico en el endotelio.^{6,7}

Es indudable que tanto las ROS como las de nitrógeno (RNS) están asociadas con el daño encontrado en las paredes vasculares,⁸ existiendo a la fecha controversia en si son origen o consecuencia de las patologías, ya que existen datos experimentales que soportan ambas teorías, independientemente de eso, las principales fuentes de producción de oxidantes en la pared vascular son (Figura 1):

- 1) NAD(P)H oxidasas (Nox). Neutrófilos, monocitos, macrófagos, fibroblastos de la adventicia, células de músculo liso vascular y células endoteliales contienen enzimas NAD(P)H oxidasas asociadas a la membrana plasmática, estas enzimas utilizan NADH o NAD(P)H como donadores de electrones para generar superóxido.⁹
- 2) Xantina oxidasa. Esta enzima utiliza xantina o hipoxantina para originar ácido úrico, existe en dos formas a) Deshidrogenada, que origina NADH y b) Oxidasa que genera superóxido.¹⁰
- 3) Sintasa de óxido nítrico (NOS). NOS endotelial es un homodímero, cada monómero está constituido por un dominio de reductasa (con sitios de enlace para NADPH, FAD y FMN) y por un dominio oxigenasa (conteniendo Zn, tetrahydrobiopterina, hemo y L-arginina) que están unidas por una región a la que se enlaza la calmodulina. En ausencia de cofactores, tales como la tetrahydrobiopterina eNOS puede desacoplarse y redu-

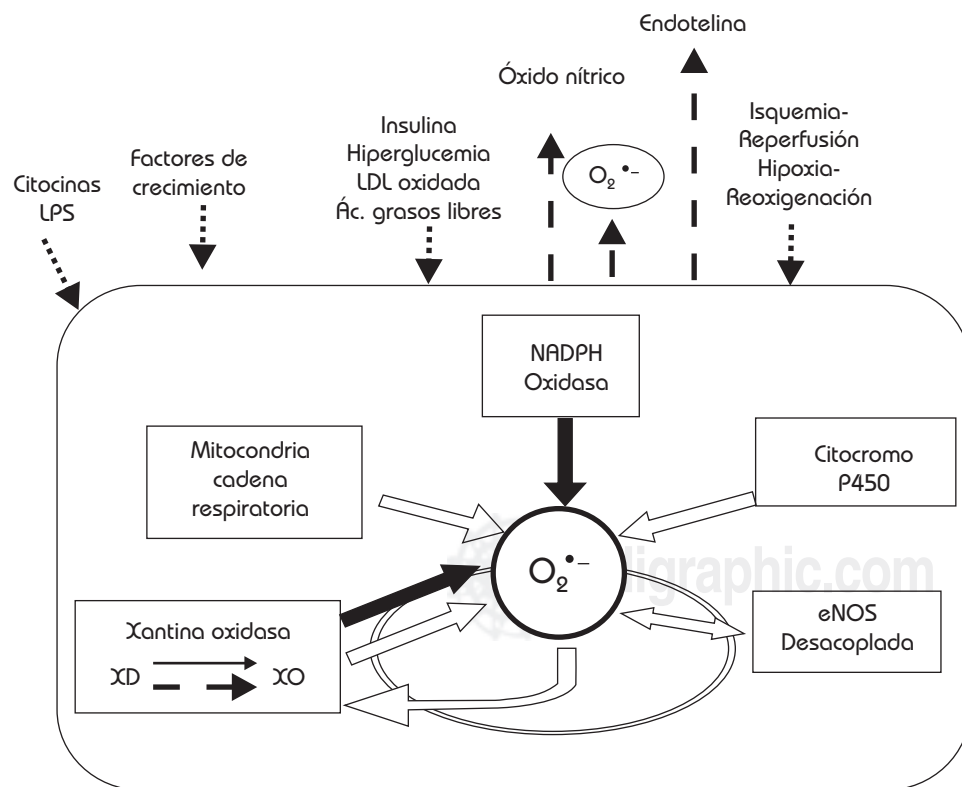


Figura 1. Fuentes endoteliales de radicales libres.

cir oxígeno molecular en lugar de transferir electrones a la arginina y por esta razón generando superóxido.¹¹

- 4) Mieloperoxidasa. Esta es una hemoenzima que cataliza la conversión de Cl⁻ a ácido hipocloroso (HOCl), el sistema puede originar 3 clorotirosina, clorohidrinas de colesterol y ácidos grasos y radicales tirosilos que pueden participar en la oxidación secundaria de LDL.
- 5) Lipooxigenasas. Son enzimas dioxigenasas que catalizan la inserción estereoespecífica de oxígeno molecular en ácidos grasos poliinsaturados. Doce y 15 lipooxigenasa oxigena ácidos grasos esterificados con colesterol y fosfolípidos, *in vitro* 15-lipooxigenasa puede oxidar LDL a través de mecanismos enzimáticos directos y de reacciones no enzimáticas indirectas.¹²
- 6) Respiración mitocondrial. Como producto lateral del flujo de electrones a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, 1-2% del oxígeno molecular puede ser convertido a superóxido, esto sucede primariamente a nivel complejo I (NADH deshidrogenasa) y del complejo III (ubiquinona-citocromo bc1).¹⁰
- 7) Metales de transición. Metales como fierro y cobre son catalizadores fuertes para reacciones de oxidación en la presencia de hidroperóxidos.
- 8) Otros oxidantes. A los radicales lipoperoxilo se les propone como los principales mediadores de lipoperoxidación.

El establecer la participación precisa de las especies reactivas requiere de la habilidad para medirlos, ya sea directamente o mediante la evaluación del daño que causan.

Para estudiar su función, es necesaria la medición de sus concentraciones en líquidos biológicos o en muestras de tejidos, pudiendo emplearse al menos 3 grandes abordajes:

Atraparlos y medir la concentración de las moléculas resultantes. La única técnica que puede evaluar directamente la presencia del radical libre (RL) o especie reactiva (ER) es la resonancia magnética de espín electrónico (RMEE).¹³ Con esta técnica se pueden detectar directamente radicales libres que no han reaccionado, sin embargo, dada su corta vida media esto es impráctico. Para resolver esta problemática se ha implementado el uso de sondas o barredores de radicales.

Cuantificar la magnitud del daño producido por las especies reactivas. Las principales biomoléculas (ADN, lípidos y proteínas) son blanco del ataque de los radicales libres.¹⁴ El análisis del daño oxidativo del ADN es de alta relevancia biológica y se le ha relacionado con el desarrollo de neoplasias y otras patologías asociadas.¹⁵

La lipoperoxidación da como resultado formación de hidroperóxidos de lípidos altamente reactivos.¹⁶

Una de las técnicas más utilizada para la cuantificación del daño oxidativo en lípidos es la evaluación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA),¹⁷ sin embargo, dada su inespecificidad, está casi en desuso. Las

variaciones más comúnmente utilizadas son la cuantificación del malondialdehído (MDA) y del 4 hidroxinonanal (4-HNE), en la actualidad la cuantificación de los isoprostanos, familia de eicosanoides de origen no enzimático producidos por la oxidación de fosfolípidos por RL de oxígeno, ha adquirido relevancia.¹⁶

Por otro lado, el ataque oxidante a los aminoácidos constituyentes de las proteínas es un proceso altamente complejo que puede generar a su vez, radicales de aminoácidos, que pueden reaccionar entre sí o con oxígeno para originar radicales peroxilo que a través de la formación de peróxidos dan reacciones en cadena perpetuando el daño. La cuantificación de ditirosinas y 3-nitrotirosina,¹⁷ ha adquirido recientemente gran relevancia. La cuantificación de carbonilos se emplea también para evaluar daño oxidante en proteínas.¹⁸

Cuantificar la actividad antioxidante. Otro abordaje para la evaluación de estrés/daño oxidante emplea métodos indirectos, basados en la capacidad alterada del organismo para modular la concentración incrementada de RL o ER.

Un enfoque para dicha evaluación compara la actividad de un antioxidante de referencia (trolox) con la actividad antioxidante encontrada en plasma u orina, con esta metodología se evalúan como un todo, las actividades de las enzimas dismutasa de superóxido (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa de glutatión (GSH-Pox), de proteínas como: albúmina, ceruloplasmina y ferritina, y de moléculas con capacidad antioxidante tales como ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, glutatión reducido, ácido úrico y bilirrubina. Un enfoque alternativo analiza por separado la actividad de las enzimas mencionadas y la concentración de glutatión.¹⁹

La evaluación del daño oxidante está adquiriendo gran relevancia y en un futuro cercano seguramente podrá ser utilizada para el seguimiento de las enfermedades crónico-degenerativas como por ejemplo el síndrome metabólico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function from health to coronary disease. *Circ J* 2003; 67: 572-575.
2. Hammarstro AKM, Parkington HC. Endothelium-dependent hyperpolarization in resting and depolarized mammary and coronary arteries of guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 421-428.
3. Pavlovic D, Dordevic V, Kocic G. A "Cross-Talk" between oxidative stress and redox cell signaling. *Facta Universitatis* 2002; 9(2): 131-137.
4. Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, Zhang C. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res* 2006; 99(1): 69-77.

5. Guzik TJ, Sadowski J, Guzik B, Jopeck A, Kapelak B, Przybylowski P, Wierzbicki K, Korbut R, Harrison DG, Channon KM. Coronary artery superoxide production and Nox isoform expression in human coronary artery disease. *Atherosclerosis and Lipoproteins* 2006; 26(2): 333-339.
6. Lenda D, Boegehold M. Effect of a high salt diet on microvascular antioxidant enzymes. *Journal of Vascular Research* 2002; 39(1): 41-50.
7. Yang D, Felétou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent. *British Journal Pharmacol* 2002; 136: 104-110.
8. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British J Pharmacol* 2004; 142: 231-255.
9. Sumimoto H, Miyano K, Takeya A. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 9: 677-686.
10. Olivera PJ, Rolo AP, Monteiro P, Goncalves L, Palmeira CM, Moreno AJ. Impact of carvedilol on the mitochondrial damage induced by hypoxanthine and xantine oxidase what role in myocardial ischemia and reperfusion? *Rev Port Cardiol* 2002; 21: 1447-1455.
11. Suzuki YJ, Jain V, Park AM, Day RM. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2006; 15: 1683-1692.
12. Gaddi A, Cicero AF, Pedro EJ. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipooxygenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Arch Gerontol Geriatr* 2004; 38: 201-212.
13. Utsumi H, Yamada K. *In vivo* spin resonance-computed tomography/nitroxyl probe technique for non-invasive analysis of oxidative injuries. *Arch Biochem Biophys* 2003; 416: 1-8.
14. Haur H, Halliwell B. Detection of hydroxyl radicals by aromatic hydroxylation. *Methods Enzymol* 1994; 233: 67-82.
15. Mikami T, Kita K, Tomita S, Qu GJ, Tasaki Y, Ito A. Is allantoin in serum and urine a useful indicator of exercise-induced oxidative stress in humans? *Free Rad Res* 2000; 32: 235-244.
16. Roberts U, Morrow JD. Products of the isoprostane pathways: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell Moll Life Sci* 2002; 59: 808-820.
17. Frost MT, Halliwell B, Moore KP. Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/mass spectrometry method that avoids nitration artifacts. *Biochem J* 2000; 345: 453-458.
18. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Rad Res* 2000; 33: S99-S108.
19. Haur H, Halliwell B. Action of biological-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem Biol Interact* 1990; 73: 235-247.