

El estrés oxidativo en la pared vascular y su potencialidad de manipulación terapéutica

Presence of oxidative stress in the vascular wall and its potential therapeutical management

María Jacqueline Romero Elías^I, Héctor Figueroa Marin^{II}, Miguel Ángel Morales Segura^{III}, Armando Rojas Rubio^{IV}

I Licenciado en Bioquímica. Laboratorio de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^{II}Profesor Titular, Doctor en Ciencias. Laboratorio de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^{III}Profesor Adjunto. Laboratorio de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^{IV}Profesor Adjunto, Doctor en Ciencias. Laboratorio de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

Durante el proceso de producción de energía en la respiración aeróbica, las células vasculares producen Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). En su conjunto, la función vascular depende de un fino balance entre mecanismos oxidantes y antioxidantes, los cuales determinan varias funciones endoteliales. Numerosas evidencias experimentales y clínicas indican que el entorno intracelular oxidante también está involucrado en varias vías de señalización celular sensibles a cambios en el estado redox, tales como canales iónicos, fosforilación de proteínas, control de la expresión génica, y por ende juega un papel importante como modulador de varias funciones celulares tales como el crecimiento celular, apoptosis, migración, angiogénesis y adhesión celular. La sobreproducción de ROS constituye un elemento clave en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares. Este hecho ha promovido una intensa búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas para mejorar la hemostasis vascular, particularmente para disminuir el estrés oxidativo o aumentar los mecanismos de defensa antioxidantes.

Palabras clave: estrés oxidativo, función vascular, células endoteliales, células musculares lisas, aterosclerosis, farmacología.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el endotelio es reconocido no solo como una barrera física entre la sangre y la pared vascular sino también como un importante órgano localizado estratégicamente con múltiples funciones endocrinas y paracrinas. Adicionalmente, es capaz de detectar cambios en fuerzas hemodinámicas y señales transportadas por la sangre y responder mediante la liberación de sustancias vasoactivas. Bajo condiciones fisiológicas, el endotelio vascular actúa como un regulador inhibitorio de la contracción vascular, adhesión leucocitaria, crecimiento de células musculares lisas (VSMC) y agregación plaquetaria a través de la producción de una serie de moléculas biológicamente activas.¹

Numerosas evidencias indican que el estrés oxidativo se refiere a una condición en la cual las células son sometidas a excesivos niveles de oxígeno molecular o sus derivados químicos llamados Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).² La sobreproducción de ROS bajo condiciones fisiopatológicas se ha convertido en un elemento de pivote en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En este contexto, es importante destacar el término sobreproducción, ya que una amplia gama de evidencias indican que el entorno oxidante intracelular está también involucrado en la señalización celular y juega también un importante papel como modulador de la función celular vascular.³ El aumento de estrés oxidativo daña las funciones endoteliales, y es considerado como un serio factor causal de la disfunción vascular, la cual es importante en la fisiopatología de varias enfermedades vasculares incluyendo la arteriosclerosis, diabetes mellitus, así como en los procesos de daño inducido por isquemia/ reperfusión.⁴

Además, toda la función vascular es dependiente del balance entre mecanismos oxidantes y antioxidantes, los cuales determinan la función endotelial.

En la presente revisión pretendemos resumir las principales fuentes de ROS en la pared vascular, la capacidad de interactuar de ROS con algunos procesos sensibles a estados redox involucrados en procesos fisiológicos y fisiopatológicos como la principal acción de ROS en el endotelio y en las células musculares lisas.

Finalmente, algunas aproximaciones farmacológicas para evitar los efectos de ROS en la pared vascular, también son discutidas.

Estrés oxidante vascular

Las células vasculares producen energía mediante la reducción del oxígeno molecular a agua durante la respiración aeróbica. Durante este proceso, se generan especies reactivas, tales como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($OONO^-$), ácido hipocloroso ($HOCl$) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$), entre otros.⁵

Fuentes de ROS

En la pared vascular, existen varios sistemas enzimáticos que producen O_2^- y sus derivados, incluyendo NAD(P)H oxidasa, xantina oxidasa (XO), óxido nítrico sintasa (NOS) y mieloperoxidasa (MPO).

NAD(P)H oxidasa

Existen evidencias que sugieren que NAD(P)H oxidasa, también conocida como enzimas NOX(s), constituye la principal fuente enzimática de O₂⁻. endotelial y vascular. Las proteínas Nox representan las subunidades catalíticas de esta enzima y varían en términos de su modo de activación y necesidad de cofactores.⁶ Los niveles de proteína Nox1 son bastante bajos en células vasculares pero pueden ser inducidos por estímulos como el Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF) y angiotensina II (Ang II). Nox2, previamente conocida como gp91phox, es expresada en el endotelio, en células adventicias de grandes vasos y en células musculares lisas de vasos más pequeños.⁷ Nox4 es expresada constitutivamente en células musculares lisas y células endoteliales (EC).⁸ Todas las enzimas Nox requieren p22phox, la cual sirve como una proteína "puerto" para otras subunidades y para estabilizar las proteínas Nox.

Aunque las oxidasas endoteliales y vasculares parecen estar constantemente activas, generando bajos niveles de ROS, ellas son reguladas por factores humorales como se ha demostrado para citocinas, factores de crecimiento, y agentes vasoactivos así como factores físicos, incluyendo tensión, tensión pulsátil, y estrés inducido por fuerzas de cizalla. Interesantemente, el peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos, pueden estimular la actividad de NAD(P)H oxidasa en células musculares lisas, generando una retroalimentación en la producción de ROS a nivel de la pared vascular.⁹

El papel protagónico de este sistema enzimático en enfermedades cardiovasculares, ha sido evidenciado por varios reportes que mostraron que los aumentos en los niveles de p22phox, p47phox, p67phox y de subunidades Nox, están presentes tanto en sujetos portadores de arterosclerosis coronaria como en vasos de pacientes diabéticos, en asociación con el aumento en la producción de superóxido.^{10,11}

Esto sugiere que la sobrerregulación de la expresión del gen y/o el aumento postranscripcional en los niveles de proteína son importantes en mediar el aumento de la actividad NAD(P)H oxidasa en enfermedades vasculares. Por ejemplo, la Angiotensina II aumenta la actividad NAD(P)H oxidasa por sobrerregulación de la expresión de sus subunidades. Sin embargo, es claro que las proteínas citosólicas regulatorias p47phox, p67phox y la pequeña proteína G Rac-1, también juega un importante papel en la regulación de la actividad NAD(P)H oxidasa en enfermedades cardiovasculares mediante la activación aguda del complejo enzimático, a través de fosforilación y translocación de p47phox.¹²

Ciclooxigenasas (COX)

Las Ciclooxigenasas son otra fuente de producción de O₂⁻, particularmente en la circulación cerebral. La Prostaglandina H sintasa y la lipooxigenasa son capaces de co-oxidizar sustancias tales como el NAD(P)H.¹³

Sistema enzimático xantina oxidoreductasa (X/XO)

Otra fuente de ROS vascular es el sistema enzimático xantina oxidoreductasa. La actividad xantina deshidrogenasa (XDH) presente en el endotelio vascular es rápidamente convertida en xantina oxidasa (XO) por procesos que incluyen la oxidación de grupos tioles y/o proteólisis.¹⁴ La proporción de XO y XDH en las células es por consiguiente crítico para determinar la cantidad de ROS producido por estas enzimas. La xantina oxidasa metaboliza hipoxantina, xantina, y NADH para formar O₂⁻ y H₂O₂ y parece ser una importante fuente de producción de ROS

durante el proceso de isquemia/reperfusión así como en la hipercolesterolemia. De esta forma, la xantina oxidasa es una importante fuente de producción de ROS bajo ciertas condiciones fisiopatológicas.

Un punto controversial, es la expresión de XDH en la pared vascular, porque diferentes estudios inmunohistoquímicos han fracasado en demostrar la presencia de XDH en células endoteliales u otros tejidos cardiovasculares. Se ha sugerido que la XO en células endoteliales es originada desde otros órganos y que la enzima es probablemente captada por las células endoteliales a través de sitios de unión a heparina.¹⁵

Mitocondria

La contribución de las mitocondrias a la producción de ROS en la pared vascular es comprendida en menor extensión, aunque un número significativo de reportes que destacan su papel se han realizado en los últimos años.¹⁶

Evidencias recientes, sugieren que el aumento de la generación de O_2^- mitocondrial en células endoteliales es particularmente prominente en algunos ambientes patológicos. La hiperglicemia induce la producción de O_2^- mitocondrial, lo cual está involucrada en la patogénesis de complicaciones diabéticas. Similarmente, la leptina, también induce la producción de O_2^- mitocondrial por aumento en la oxidación de los ácidos grasos. En el proceso de hipoxia-reoxigenación e isquemia-reperfusión, los radicales O_2^- derivados de la mitocondria aumentan, los cuales se cree que son responsables, al menos parcialmente, del aumento de la permeabilidad del endotelio.¹⁷

Oxido Nítrico Sintasa Endotelial (NOS III) disfuncional

La NOS III es un complejo homodimérico oxidoreductasa que transfiere electrones desde el dominio reductasa al dominio oxidasa el cual contiene el sitio hemo activo. Bajo algunas condiciones, la NOS genera superóxidos en lugar de NO,¹⁸ un fenómeno conocido como desacoplamiento de la NOS, lo cual significa que el flujo de electrones desde el dominio reductasa al dominio oxigenasa son desviados a oxígeno molecular en lugar de L-arginina. Uno de los cofactores de las NOS, tetrahidrobiopterina (BH4), parece jugar un papel clave en regular de la función de NOS mediante el "acoplamiento" de la reducción de oxígeno molecular a la oxidación de la L-arginina. La BH4 exógena, parcialmente reestablece la producción de NO dependiente de NOS III y reduce el desacoplamiento de la enzima en hipertensión, hipercolesterolemia, y en individuos fumadores. Por lo tanto, la biodisponibilidad de BH4 es un factor crucial en el balance entre la producción de O_2^- y NO por la NOS III.

Interacción de ROS con procesos sensibles a redox en la pared vascular

Sistema transportador de iones

Aunque los vínculos funcionales entre la producción de ROS y el sistema transportador de electrones no son aún entendidos, algunas evidencias sugieren esta relación. En la actualidad, se conoce que muchos canales de calcio son afectados por ROS. Los canales de potasio regulados por canales de calcio, parecen mediar la vasodilatación inducida por H_2O_2 . De hecho, elevados niveles de H_2O_2 han mostrado causar liberación de NO dependiente de Calcio desde el endotelio; y producir relajación dependiente de canales de potasio en células musculares lisas.¹⁹

Aumentos en el Ca^{+2} intracelular, han sido también detectados en VSMC como respuesta a tratamientos con H_2O_2 . Las células endoteliales tratadas con hipoxantina e hipoxantina oxidasa y H_2O_2 muestran una transitoria liberación de Ca^{+2} desde los sitios de almacenamiento intracelular.²⁰

La hiperpolarización de células musculares lisas, debido a la apertura de canales de potasio, juega un papel central en varios mecanismos de vasodilatación. Los efectos de ROS en mecanismos de dilatación por hiperpolarización involucran canales de potasio, y aunque el mecanismo no es aún completamente comprendido, si poseen un efecto relevante considerando que la dilatación mediada por hiperpolarización a menudo compensa la ausencia de otros mecanismos de dilatación.

La capacidad de detectar oxígeno y la reactividad a cambios en su concentración, es una propiedad fundamental de la fisiología celular. Así, canales iónicos vasculares son potencialmente controlados por múltiples mecanismos vinculados a estados redox, y así probablemente son responsables de la diversidad de observaciones acumuladas hasta el presente. El papel de ROS producido por las mitocondrias, ha sido promovido como un atractivo modelo en los mecanismos capaces de detectar niveles de oxígeno.²¹

Fosforilación de proteínas

La fosforilación reversible de proteínas es un tipo de evento bioquímico en las vías de señalización celular. Hasta ahora, se ha establecido que los procesos redox influyen notablemente en el balance de las actividades entre varias proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)²² De particular interés, la fosforilación de proteínas mediada por H_2O_2 está involucrada en varios eventos fisiológicos asociados a la pared vascular. El peróxido de hidrógeno sobregula la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial, vía CaMK II.²³ Por otro lado, el H_2O_2 también ha mostrado ser un inhibidor de fosfatasa, probablemente por la oxidación directa de cisteína en el sitio activo de estas enzimas. Aquí es evidente que los mecanismos oxidantes pueden inducir un aumento en la autofosforilación de receptores unidos a tirosinas cinasas que activan vías de las MAPK, y se ha observado que el H_2O_2 también estimula la fosforilación de los residuos de tirosina del receptor del factor de crecimiento epidérmico en VSMC, mientras que la nitrosación de un grupo tiol en p21ras estimula la activación de p42/p44 MAPK.²⁴ La existencia de reacciones de fosforilación mediada por una proteína cinasa dependiente de cGMP también es capaz de activar la vía MAPK p42/p44 en VSMC. En resumen, ROS tiene múltiples vías de interacción con procesos unidos a varios sistemas de fosforilación-desfosforilación.

La Akt cinasa, involucrada en vías de señalización "down-stream" de la fosfoinositol 3-cinasa (IP3-cinasa), es otro tipo de elemento sensible a redox en el control de varios procesos de la pared vascular.²⁵ Como se ha demostrado recientemente, la Akt está involucrada en una vía sensible a redox, en células endoteliales, durante la expresión de la subunidad p22phox de la NAD(P)H oxidasa. Similar a lo reportado en MAPK p38, el H_2O_2 y Ang II exógenos activan Akt en VSMC e inducen el crecimiento estimulado por VEGF y supervivencia en EC.²⁶

Varios de los efectos benéficos de los polifenoles del vino tinto han sido atribuibles a la activación, inducida por cambios redox de la vía IP3-cinasa/Akt en células endoteliales.

Expresión génica

ROS puede modificar varias funciones en la pared vascular, particularmente en EC y VSMC, mediante la modulación de genes y la expresión de proteínas a través de la regulación de algunos factores de transcripción sensibles a cambios redox, así como en la activación del factor nuclear- κ B, el activador de proteína-1, HIF-1 y el receptor del peroxisoma activador de la proliferación (PPAR), familia de activadores transcripcionales activantes de varias transcripciones.

Fosfolipasa A-1 (AP-1)

AP-1 es activado por estímulos pro-oxidantes en ECs y en VSMC tales como H_2O_2 , oxLDL y el producto de peroxidación lipídico 4-hidroxi-2-nonenal. Además, la regulación de genes proinflamatorios vasculares tales como MCP-1 e ICAM-1 por H_2O_2 está mediada por el factor AP-1.²⁷ AP-1 juega un importante papel en la expresión del gen ET-1 inducido por Ang II, así como en la producción de IL-8 por hiperglicemia. Interesantemente, la hormona cardiovascular, péptido natriurético atrial (ANP) ejerce efectos antiinflamatorios en células endoteliales mediante cambios de la proteína cinasa fosfatasa-1 activada por mitógenos (MKP-1), a través de la activación del factor de transcripción AP-1.²⁸

Factor de transcripción NF κ B

NF- κ B fue el primer factor de transcripción eucariótico que mostró responder directamente al estrés oxidativo. Una amplia cantidad de datos experimentales sustentan la activación del factor de transcripción NF- κ B como un tipo de evento sensible a redox asociado con disfunción vascular.²⁹ En las ECs, NF- κ B es el primer blanco para ROS, y su activación tanto por citocinas, hipercolesterolemias, isquemia-reperfusion, productos avanzados de la glicosilación (AGE), y el sistema renina-angiotensina han sido vinculados en el aumento de la expresión de moléculas de adhesión tales como E-selectina, ICAM-1, V-CAM-1. Interesantemente, el factor de crecimiento endotelial vascular media la inducción de la manganeso superóxido dismutasa, la cual también ocurre a través de regulación dependiente de redox de NF- κ B.³⁰ En VSMC, la activación de NF- κ B es esencial para la proliferación. Por otro lado, la transcripción mediada por NF- κ B también ha sido un punto importante en el mecanismo de supervivencia de las células.³¹

Factor-1 inducible por hipoxia (HIF-1)

ROS puede modular también la expresión génica a través de la activación, sensible al estado redox, del factor de transcripción HIF-1 (factor-1 inducible por hipoxia), el cual puede aumentar la expresión de genes involucrados en la angiogénesis, el metabolismo energético, la proliferación celular, y el remodelamiento vascular.³² Estudios recientes, han comenzado a dilucidar el camino mediante el cual ROS puede regular la transcripción de genes a través de HIF-1. La regulación redox de la actividad de HIF-1 parece estar mediada tanto por cambios dependientes de ROS en la estabilidad de HIF-1?, así como por la regulación posttranscripcional de la actividad de HIF-1. Sin embargo, el preciso mecanismo a través del cual la regulación ocurre permanece incierto, con evidencias mediadas por regulación a través de la activación de la vía fosfatidilinositol 3-cinasa/Akt o a través de un mecanismo sensible a la presencia de grupos tioles.³³

Receptor activador de la proliferación del peroxisoma (PPAR)

Se ha mostrado que los activadores de PPAR inhiben la activación de la respuesta de genes proinflamatorios por interferencia negativa con las vías de señalización NF- κ B, STAT y AP-1 en las células de la pared vascular.³⁴ Varios estudios han

demostrado que los PPARs pueden ser vistos como factores de transcripción sensibles a cambios redox en la vasculatura por su capacidad para ser selectivamente activados por ácidos grasos oxidados.

Efectos de ROS y Pared Vascular

Células endoteliales

Vasorelajación. El papel de ROS en la vasorelajación ha sido demostrado en al menos dos vías: primero, en la interacción con NO y segundo, a través de los efectos directos del H₂O₂. Un número en crecimiento de evidencias experimentales animales y humanos sugieren que la inactivación oxidativa del NO juega un importante papel en varias condiciones patológicas. Está bien establecido que el NO derivado del endotelio sufre una muy rápida reacción con O₂⁻,³⁵ reduciendo así su biodisponibilidad. El aumento de la producción de superóxido por NAD(P)H oxidasa vascular y xantina oxidasa es responsable del déficit de NO observado en varios modelos de enfermedades vasculares, incluyendo hipercolesterolemia, arterosclerosis, hipertensión, y daño cardíaco. La actividad local de SOD en la pared de los vasos es por consiguiente un muy importante elemento en el balance de la regulación de NO/ O₂⁻.

Las evidencias indican que H₂O₂ liberado desde el endotelio (después de la conversión de O₂⁻.) puede ser utilizado en una actividad hiperpolarizante en arterias mesentéricas murinas y humanas, y en arteriolas coronarias humanas, donde está involucrado en el proceso de la dilatación inducida por flujo.³⁶ La CuZnSOD del endotelio controla la conversión de O₂⁻. (probablemente generado por la NO sintasa) a H₂O₂, a tal punto de que se ha sugerido que actúa como un EDHF sintasa (EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio).

Finalmente, la interacción de los productos avanzados de la glicosilación (AGEs) con su receptor en células endoteliales gatillan la generación de ROS, donde NADPH oxidasa juega un papel central.³⁷ Esta situación, en adición a las capacidades de AGEs para reducir la expresión de NOS III por disminución del tiempo de vida media de su mRNA,³⁸ lo cual resulta en una reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico en la pared vascular.

Apoptosis/Anoikis

Muchas evidencias indican que la exposición endotelial de ROS induce apoptosis (muerte celular programada), la cual lleva a la pérdida de EC, resultando en la aterogénesis y un estado procoagulativo.³⁹ De forma importante, la apoptosis de EC estimulada por LDL oxidizada, Ang II, alta concentración de glucosa, y TNF- α es inhibida por SOD, catalasa, NAC, y vitaminas antioxidantes. Estos datos sugieren fuertemente que las ROS regulan mecanismos apoptóticos inducidos por una variedad de estímulos. Muy interesantemente, bajas dosis de ROS pueden también actuar como moléculas de señalización y ejercer funciones anti-apoptóticas en células endoteliales vía sobrerregulación del regulador redox Trx-1.⁴⁰

Se ha visto que ROS está involucrado en una forma de apoptosis llamada anoikis⁴¹ que resulta del desprendimiento de ECs desde la matriz extracelular. Anoikis es inducido por la pérdida de interacciones célula-matriz, pero su mecanismo exacto y papel fisiopatológico en enfermedades cardiovasculares no está aún completamente entendido. Este proceso está también asociado con un aumento intracelular de ROS probablemente desde la mitocondria y es inhibido por NAC y difenileno iodonium (DPI), un inhibidor de NAD(P)H oxidasa.⁴² El ácido eicosapentanoico, un ácido graso poliinsaturado contenido en el aceite de pescado, es capaz de proteger a las células

endoteliales de la anoikis, lo cual puede contribuir a efectos cardioprotectores y antiaterogénicos del aceite de pescado.

Moléculas de adhesión

En la actualidad, la expresión de varias moléculas de adhesión incluyendo la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), es un proceso dependiente de ROS.⁴³ Por otro lado, la síntesis endógena de óxido nítrico es responsable de la inhibición de la expresión inducida por citocinas de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, y la molécula de adhesión leucocito endotelio-1 (ELAM-1)⁴⁴, lo cual condiciona que los monocitos y neutrófilos están muy limitados en su capacidad para transmigrar. Ya que ROS reduce considerablemente la biodisponibilidad de NO en la pared vascular, es obvio que la expresión de moléculas de adhesión es suprimida por los antioxidantes, como se ha demostrado extensamente.⁴⁵ Factores adicionales que pueden modular la magnitud y/o naturaleza de las respuestas inflamatorias vasculares como el sistema de señalización de CD40L/CD40, están también relacionados con la activación de NADPH oxidasa.⁴⁶

Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y está presente en algunas entidades patológicas vasculares como retinopatías diabéticas y arterioesclerosis. La migración, proliferación y formación tubular por EC, son eventos esenciales en el proceso de angiogénesis. Recientes reportes sugieren que ROS juega un importante papel en la angiogénesis; sin embargo, su mecanismo molecular fundamental permanece incierto.⁴⁷ VEGF induce la angiogénesis estimulando la proliferación EC y la migración primariamente a través del receptor 2 (Flk1/KDR) de VEGF, que posee actividad tirosina cinasa. ROS derivados de NAD(P)H oxidasa son críticamente importantes para la señalización VEGF in vitro y la angiogénesis in vivo, como se ha demostrado recientemente. Además, la Ang II, que es un estímulo importante para la NAD(P)H oxidasa vascular, también juega un importante papel en la angiogénesis.

Disfunción de la Barrera Endotelial

Hay importantes evidencias que el estrés oxidativo aumenta la permeabilidad vascular endotelial. Este concepto es además apoyado por estudios in vitro e in vivo en los cuales el tratamiento directo con ROS o sistemas que aumenten la generación de ROS, aumentan la permeabilidad trans-endotelial.⁴⁸ ROS causa la formación de gap intercelular, cambios de forma celular, y reorganización de filamentos de actina. Estas características morfológicas implican alteraciones en la adhesión célula-célula y consecuentemente, en las uniones intercelulares, con determinantes primarios en aumentar la permeabilidad paracelular.

En la actualidad, hay información limitada con respecto al efecto de estrés oxidativo en la función y organización de proteínas de adherencia y de unión.

Aumentos en la extravasación de complejos albúmina-FITC no han sido asociados con la distribución alterada de ZO-1 como se ha detectado por inmunolocalización en perfusión de pulmones de rata con H₂O₂.⁴⁹ Sin embargo, por otro lado se ha reportado que tratamientos en células endoteliales humanos y bovinos in vitro con H₂O₂ resultaron en la redistribución de occludina y en la disociación de ZO-1.

El tratamiento de células endoteliales con H₂O₂ promueve la internalización de VE-cadherina como un posible mecanismo que explica su reducida expresión⁵⁰.

Además se ha reportado que la exposición in vitro de células endoteliales a productos avanzados de la glicosilación, es capaz de inducir un marcado estrés oxidativo, inducir la disminución en los niveles de VE-cadherina, β - y γ -cateninas, con el aumento de la permeabilidad de la monocapa y la migración celular. Estos efectos fueron completamente revertidos por antioxidantes tales como NAC y PDTC.⁵¹

Células musculares lisas

Una de las funciones de VSMC más extensamente estudiadas, es el crecimiento celular, aunque también está involucrado tanto en la migración celular como en la contracción de VSMC, en la expresión de mediadores inflamatorios y en los componentes de la matriz.

Crecimiento celular vascular liso y migración

La producción de ROS está íntimamente involucrada en muchos de los procesos que llevan al crecimiento hipertrófico y al crecimiento proliferativo VSMC.

Ang II puede inducir hipertrofia en VSMC por un mecanismo sensible a cambios redox. La hipertrofia VSMC inducida por Ang II es inhibida por catalasa y p22phox antisentido,⁵² implicando así que ROS derivado de NAD(P)H oxidasa en la respuesta al crecimiento. Además, la proliferación VSMC por PDGF o trombina requiere de la generación de H₂O₂, ya que es inhibido por catalasa, NAC o DPI.⁵³

La migración VSMC es considerada uno de los eventos patogénicos más significativo a nivel vascular. Aunque el preciso mecanismo molecular de la migración de VSMC no está totalmente comprendido, se ha demostrado un papel activo de las ROS en el mismo. De esta forma, la quimiotaxis de VSMC inducida por PDGF, es inhibida por la sobreexpresión de catalasa. Además, la migración VSMC estimulada por PDGF es inhibida por el uso de moléculas antioxidantes tales como NAC, DPI, ebselen y además en un modelo animal Rac dominante-negativo, sugiriendo que la producción de O₂⁻ a través de NAD(P)H oxidasa es crítica para la migración VSMC estimulada por agonistas.⁵⁴

Regulación de la matriz

La degradación y reorganización de la matriz extracelular por metaloproteinasas (MMPs), son eventos claves en el remodelamiento vascular. Tanto la pro-MMP-2 como la pro-MMP-9 secretadas desde VSMC en humanos son activadas por ROS. Interesantemente, Ang II induce MMP-2 de manera dependiente de p47phox. Es razonable pensar que el sistema renina-angiotensina puede contribuir en la desestabilización de la placa, vía inducción de MMP-2 a través de un mecanismo dependiente de ROS.⁵⁵ La distensión mecánica, un evento clave en la fisiopatología de la hipertensión arterial, induce cambios en la expresión del mRNA y la liberación de la proenzima de MMP-2, a través de un mecanismo dependiente de la producción de especies reactivas de oxígeno generadas por la NAD(P)H oxidasa.

Acciones farmacológicas: realidad actual y esperanzas futuras

Varias aproximaciones farmacológicas han sido utilizadas para mejorar la homeostasis vascular y para disminuir el estrés oxidativo nivel de la vasculatura. Este enfoque incluye modalidades de tratamiento que aumenten mecanismos de defensa antioxidantes, aumentando la producción de NO e inhibición de enzimas generadoras de ROS.

Inhibición de NAD(P)H oxidasa

La NAD(P)H oxidasa es la mayor fuente de O_2^- en el tejido vascular, y representa un blanco atractivo para intervenciones farmacológicas. Sin embargo, existe una carencia de inhibidores efectivos del sistema NAD(P)H oxidasa.

El Difenileniodonio, el cual ha sido ampliamente usado como un inhibidor de NAD(P)H oxidasa, puede también inhibir varias enzimas dependientes de NAD(P) tales como la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, y lactato deshidrogenasa.⁵⁶

Las estatinas, agentes farmacológicos conocidos por tener amplias acciones cardiovasculares, mucho más allá de sus acciones sobre la vía de síntesis del colesterol, también poseen acción inhibitoria en la producción de O_2^- por parte de la NAD(P)H oxidasa,⁵⁷ a través de un mecanismo vinculado a la translocación de Rac dependiente de prenilación y la consecuente inhibición de la NAD(P)H oxidasa.

Una muy atractiva aproximación ha sido recientemente reportada basada en la disrupción del complejo activo NAD(P)H oxidasa por medio de un péptido quimérico diseñado para atravesar la membrana celular, y de esta forma inhibir la asociación de p47phox con gp91phox,⁵⁸ dando como resultado un complejo no funcional.

La apocinina, un catecol metoxi-sustituido usado por los tribus indias del Perú como un agente anti-inflamatorio, es un producto natural que actúa como un inhibidor vascular de NAD(P)H oxidasa. Actúa bloqueando el ensamblaje de p47phox en el complejo de membrana.⁵⁹ La administración in vivo de apocinina en ratas hipertensas produce una disminución tanto en la producción de O_2^- , como en la presión sanguínea.

Los receptores activadores de la proliferación del peroxisoma (PPARs), son factores de transcripción activados por ligandos, los cuales han mostrado mediar acciones anti-inflamatorias en células vasculares. Activadores de PPAR α (derivados de fibratos) y PPAR γ (tiazolidinedionas) reducen la expresión de p22phox y p47phox, disminuyendo la actividad NAD(P)H oxidasa y la producción de ROS, y aumentando además las concentraciones de CuZnSOD, la expresión de catalasa y la liberación de NO en EC.⁶⁰

Inhibición del sistema renina-angiotensina

La AngII es también un importante inductor de la producción de O_2^- en la pared vascular a través del aumento de la actividad NAD(P)H oxidasa y por consiguiente la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y el antagonismo de la Ang-II juegan importantes papeles en la reducción de los niveles de estrés oxidativo. Los inhibidores de ACE poseen marcados efectos benéficos al disminuir la presión sanguínea y reducir el estrés oxidativo en la pared vascular.⁶¹ Los antagonistas del receptor AT1 tiene marcados efectos protectores en la pared vascular, además de disminuir la presión sanguínea, producen una disminución significativa de la expresión de la NAD(P)H oxidasa.⁶²

Beta-Bloqueadores

Nebivolol y carvedilol, β -bloqueadores de tercera generación, además de aumentar la activación de NO sintasa III, tienen efectos antioxidantes.⁶³ Esta combinación de actividades resulta en aumentos sustanciales en la biodisponibilidad del NO.

Inhibición de Xantina Oxidasa

El Alopurinol, ha mostrado mejorar la función endotelial a través de la reducción del estrés oxidativo en la diabetes tipo II, la insuficiencia cardíaca y en individuos fumadores.⁶⁴

El oxipurinol, el metabolito activo de alopurinol, ha sido también evaluado a través de varios estudios clínicos.⁶⁵

Vitaminas y Antioxidantes de la dieta

Importantes evidencias derivadas de estudios epidemiológicos, sugieren que un elevado consumo de vitaminas antioxidantes como la vitamina E, vitamina C y β -caroteno está asociado con una reducción en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. La Vitamina C y la Vitamina E mejoran la actividad NOS y atenúan la actividad NAD(P)H oxidasa en aortas de ratas. Además, tratamientos con vitamina C resultan en la baja oxidación de BH4. La oxidación de BH4 por superóxido es un elemento crítico en generar una NOS III disfuncional.⁶⁶

No obstante, fuertes evidencias de los efectos antioxidantes demuestran que las vitaminas C y E en animales y humanos, diferentes estudios clínicos prospectivos y aleatorios han producido resultados contrastantes. Varios elementos pueden explicar la ausencia de beneficios adscritos al consumo de vitaminas antioxidantes observados en experimentos clínicos aleatorios así como estados de estrés oxidante de los participantes durante el estudio, así como las dosis y combinación de las vitaminas administradas. Recientemente, los efectos benéficos de polifenoles, particularmente aquellos asociados al vino tinto, se han basado en sus propiedades antioxidantes y en el mejoramiento de los efectos antioxidantes demostrados, para la síntesis y liberación de óxido nítrico por células endoteliales.

Administración de L-arginina y BH4

La disponibilidad de BH4 es un factor crucial en el balance entre la generación de NO y O₂⁻. por NOS III. La administración tanto de L-arginina como de BH4 pueden mejorar notablemente la biodisponibilidad de NO en humanos. Desde el reporte de Creager y cols. En 1992,⁶⁷ varios estudios han confirmado que la administración aguda y crónica de Arg mejora la función vascular en diferentes condiciones clínicas.⁶⁸

Moléculas miméticas de SOD

En general, diversos estudios enfocados en la reducción del estrés oxidativo por la Cu/Zn SOD han producido resultados negativos, principalmente debido a la corta vida media en la circulación del enzima, la incapacidad de penetrar la barrera hematoencefálica y su potencial antigenicidad, lo cual ha limitado su acceso a los compartimentos celulares. Sin embargo, un número de moléculas miméticas SOD, las cuales pueden atravesar fácilmente la membrana celular, han demostrado su capacidad en disminuir el estrés oxidativo y mejorar la función endotelial.⁶⁹ Sin embargo, se hace necesario realizar estudios clínicos extensivos para poder dimensionar su potencial terapéutico.

Bloqueadores de canales de calcio

Existe una serie de antagonistas de Calcio de tipo dihidropiridina de reciente desarrollo, los cuales además de poseer un efecto hipotensor prolongado, son

capaces de inhibir señales derivadas por la Ang II que promueven el crecimiento de las células musculares lisas. La azelnipidina es capaz de reducir también la peroxidación de lípidos, la expresión de IL-8 inducida por TNF- α en HUVECs, el bloqueo de la generación de ROS mediada por NAD(P)H oxidasa y subsecuentemente la activación de AP-1.⁷⁰

Estrategias de transferencia génica

Dos estrategias han sido principalmente enfocadas en el control del estrés oxidativo en la pared vascular, ambas por el mejoramiento de la síntesis de óxido nítrico o por la disminución en la producción de superóxido. La primera involucra los genes de óxido nítrico sintasa como potenciales candidatos para terapia génica cardiovascular por los papeles cruciales de NO en el sistema cardiovascular.

De particular interés resultan los resultados obtenidos por la transferencia de genes NOS(s), la cual inhibe la hiperplasia de la íntima en varios modelos de daño vascular.⁷¹ Por otro lado, la transferencia génica de NOS III ex vivo usando vectores adenovirales inhibe la hiperplasia intimal en cultivo de venas safenas humanas.⁷² Muy recientemente, una elegante estrategia para mejorar la síntesis de óxido nítrico se ha logrado a través de la transferencia génica mediada por adenovirus de la GTP ciclohidrolasa I (GTPCH-I), la enzima limitante para la síntesis de novo del enzima BH4.⁷³

La segunda estrategia está centrada en la transferencia mediada por adenovirus del gen de la SOD con el objetivo de reducir la liberación de superóxido por las células endoteliales. A la fecha, aunque los resultados han sido bastante promisorios, aún deben de realizarse considerables esfuerzos para mejorar los vectores disponibles así como tecnologías de transferencia génica in vivo antes de proceder a aplicaciones en la clínica. Finalmente, y en la misma línea de experimentos, la transferencia génica perivascular de un péptido inhibidor de la NAD(P)H oxidasa ha logrado reducir considerablemente toda la formación de O₂⁻ vascular y la formación de la neoíntima.⁷⁴

CONCLUSIONES

Esta revisión resume cuán complejos son los efectos fisiológicos y patofisiológicos de los ROS en la pared vascular. Muchas de las funciones vasculares son procesos sensibles al estado redox y las bases de la salud vascular están condicionadas por el balance entre los sistemas de producción de ROS e inactivación de ROS. Un amplio número de datos experimentales tanto en humanos como en animales han originado diversas aproximaciones farmacológicas y moleculares para reducir el estrés oxidativo. Fármacos ya conocidos con nuevos mecanismos de acción y nuevas aproximaciones a problemas no resueltos armonizan el objetivo de mejorar los resultados clínicos basados en aproximaciones farmacológicas para disminuir el estrés oxidativo, el cual es un proceso que hoy en día se reconoce como crítico en la fisiopatología de las enfermedades vasculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Verma S, Szmitko PE, Anderson TJ. Endothelial function: ready for prime time?. *Can J Cardiol* 2004;20:1335-9.

2. Loscalzo J. Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1059-61.
3. Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:1013-28.
4. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003;108:1912-6.
5. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 2004;11:1163-82.
6. Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 2004;90:491-3.
7. Gorlach A, Brandes R, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 2000;87:26-32.
8. Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 2004;109:227-33.
9. Li WG, Stoll LL, Rice JB, Xu SP, Miller FJ Jr, Chatterjee P, et al. Activation of NAD(P)H oxidase by lipid hydroperoxides: mechanism of oxidant-mediated smooth muscle cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2003;34:937-46.
10. Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu D, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1429-35.
11. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002;105:1656-62.
12. Touyz RM, Chen X, Tabet F. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 2002;90:1205-13.
13. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthetase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986;59:612-9.
14. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1988;255:H1269-75.
15. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, et al. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem* 1999;274:4985-94.
16. Genova ML, Pich MM, Bernacchia A, Bianchi C, Biondi A, Bovina C, et al. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1011:86-100.

17. Zhang D, Gutterman D. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H2023-H2031.
18. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9220-5.
19. Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats: evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke* 1997;28:2290-5.
20. Brakemeier S, Eichler I, Knorr A, Fassheber T, Kohler R, Hoyer J. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. *Kidney Int* 2003;64:199-207.
21. Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* 2005;98:404-14.
22. Torres M. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front Biosci* 2003;8:369-91.
23. Cai H, McNally JS, Weber M, Harrison DG. Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:121-5.
24. Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, et al. A molecular redox switch on p21ras: structural basis for the nitric oxide-p21ras interaction. *J Biol Chem* 1997;272:4323-6.
25. Kawasaki K, Smith RS Jr, Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23(16):5726-37.
26. Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Baerwald MR, Jaffe EA, et al. Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 2000;275:5096-5103.
27. Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH, et al. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia. *Am J Pathol* 2001;159:1301-11.
28. Furst R, Brueckl C, Kuebler WM, Zahler S, Krotz F, Gorlach A, et al. Atrial natriuretic peptide induces mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human endothelial cells via Rac1 and NAD(P)H oxidase/Nox2-activation. *Circ Res* 2005;96:43-53.
29. Sarada S, Himadri P, Mishra C, Geetali P, Ram MS, Ilavazhagan G. Role of oxidative stress and NFκB in hypoxia-induced pulmonary edema. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233(9):1088-98.

30. Abid MR, Schoots IG, Spokes KC, Wu SQ, Mawhinney C, Aird WC. Vascular endothelial growth factor-mediated induction of manganese superoxide dismutase occurs through redox-dependent regulation of forkhead and I κ B/NF- κ B. *J Biol Chem* 2004;279:44030-8.
31. Lee RT, Collins T. Nuclear factor- κ B and cell survival. *Circ Res* 2001;88:262-64.
32. Föhling M. Cellular oxygen sensing, signalling and how to survive translational arrest in hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 2008 [Epub ahead of print] doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01894.x
33. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002;16:1151-62.
34. Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1037-43.
35. Muller G, Morawietz H. NAD(P)H oxidase and endothelial dysfunction. *Horm Metab Res* 2008 [Epub ahead of print] doi: 10.1055/s-0028-1086023
36. Edwards D, Li Y, Griffith T. Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca²⁺ mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1774-81.
37. Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: A link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci* 2004;76:715-30.
38. Rojas A, Romay C, Gonzalez D, Herrera B, Delgado R, Otero K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end-products. *Circ Res* 2000;86:50-4.
39. Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept* 2000;90:19-25.
40. Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Low doses of reactive oxygen species protects endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett* 2004;577:427-33.
41. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature. *Hypertension* 2003;42:1075-81.
42. Li AE, Ito H, Rovira II, Kim KS, Takeda K, Yu ZY, et al. A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ Res* 1999;85:304-10.
43. Cooper D, Stokes KY, Taylor A, Granger DN. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol* 2002;2:165-80.
44. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr., et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-8.

45. Rojas A, Morales MA. Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: Far beyond vessel tone control. *Arch Med Res* 2004;35:1-11.
46. Sanguigni V, Ferro D, Pignatelli P, Del Ben M, Nadia T, Saliola M, et al. CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:35-42.
47. Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell. Biochem* 2004;264:85-97.
48. Usatyuk PV, Vepa S, Watkins T, He D, Parinandi NL, Natarajan V. Redox regulation of reactive oxygen species-induced p38 MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:723-30.
49. Pietra, GG, Johns LW. Confocal- and electron-microscopic localization of FITC-albumin in H₂O₂-induced pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1996;80:182-190.
50. Kevil CG, Ohno N, Gute DC, Okayama N, Robinson SA, Chaney E, et al. Role of cadherin internalization in hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1015-22.
51. Otero K, Martinez F, Beltran A, Gonzalez D, Herrera B, Quintero G, et al. Albumin-derived advanced glycation end-products trigger the disruption of the vascular endothelial cadherin complex in cultured human and murine endothelial cells. *Biochem J* 2001;359:567-74.
52. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 1998;32:488-95.
53. Wang Z, Castresana MR, Newman WH. Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:49-56.
54. Weber DS, Seshiah P, Taniyama Y, Griending KK. Src-dependent migration of vascular smooth muscle cells by PDGF is reactive oxygen species dependent. *Circulation* 2002;106:II260. Abstract.
55. Luchtefeld M, Grote K, Grothusen C, Bley S, Bandlow N, Selle T, et al. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:183-8.
56. Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J Biol Chem* 2004;279:47726-31.
57. Rugale C, Delbosc S, Mimran A, Jover B. Simvastatin reverses target organ damage and oxidative stress in Angiotensin II hypertension: comparison with apocynin, tempol, and hydralazine. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50(3):293-8.

58. Rey FE, Kiarash CA, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂- and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 2001;89:408-14.
59. Riganti C, Costamagna C, Doublier S, Miraglia E, Polimeni M, Bosia A, Ghigo D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;228(3):277-85.
60. Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:52-7.
61. Bommer WJ. Use of angiotensin-converting enzyme inhibitor/angiotensin II receptor blocker therapy to reduce cardiovascular events in high-risk patients: Part 1. *Prev Cardiol* 2008;11(3):148-54.
62. Rueckschloss U, Quinn MT, Hotz J, Morawietz H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells. Protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1845-51.
63. Pasini AF, Garbin U, Nava MC, Stranieri C, Davoli A, Sawamura T, et al. Nebivolol decreases oxidative stress in essential hypertensive patients and increases nitric oxide by reducing its oxidative inactivation. *J Hypertens* 2005;23:589-96.
64. Farquharson CA, Butler R, Hill A, Belch JJ, Struthers AD. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation* 2002;106:221-6.
65. Hare J, Mangal B, Brown J, Fisher C, Freudenberger R, Colucci W, et al. Impact of Oxypurinol in patients with symptomatic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(24):2301-9.
66. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res* 2003;37:121-7.
67. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1992;90:1248-53.
68. Nyström T, Nygren A, Sjöholm A. Tetrahydrobiopterin increases insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E919-E925.
69. Muscoli C, Cuzzocrea S, Riley D, Zweier J, Thiemermann C, Wang Z, et al. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *Br J Pharmacol* 2003;140:445-460.
70. Yamagishi S, Inagaki Y, Nakamura K, Imaizumi T. Azelnidipine, a newly developed long-acting calcium antagonist, inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 expression in endothelial cells through its anti-oxidative properties. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;43:724-30.

71. Kibbe M, Tzeng E, Gleixner S, Watkins S, Kovesdi I, Lizonova A, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of human inducible nitric oxide synthase in porcine vein grafts inhibits intimal hyperplasia. *J Vasc Surg* 2001;34(1):156-65.
72. Cable DG, Caccitolo JA, Caplice N, O'Brien T, Simari RD, Daly RC, et al. The role of gene therapy for intimal hyperplasia of bypass grafts. *Circulation* 1999;100(19):II392-6.
73. Cai S, Khoo J, Channon KM. Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2005;65:823-31.
74. Dourron H, Jacobson G, Park J, Liu J, Reddy DJ, Scheel ML, et al. Perivascular gene transfer of NADPH oxidase inhibitor suppresses angioplasty-induced neointimal proliferation of rat carotid artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H946-53.

Aprobado: 20 de junio de 2009

Dr. Armando Rojas Rubio. Escuela de Medicina. Universidad Católica del Maule. Ave San Miguel 3605, Casilla 167, Talca, Chile. Email: arojasr@ucm.cl