

ENDOTELIO VASCULAR E HIPERTENSIÓN

Dra. Leticia Vittone,

Dra. Cecilia Mundiña-Weilenmann

Introducción

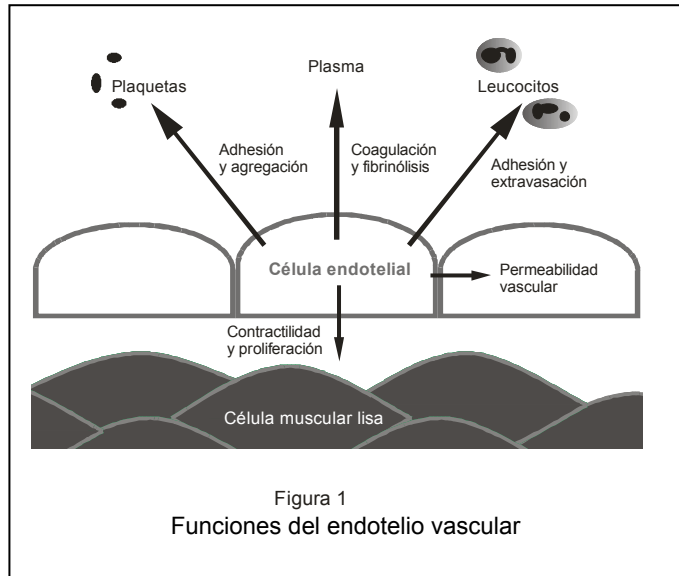
El endotelio vascular, un órgano estructuralmente simple y funcionalmente complejo, es una capa unicelular que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y conforma la pared de los capilares. Lejos de ser sólo una barrera mecánica entre la sangre y los tejidos, es un órgano activamente comprometido en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Debido a su ubicación estratégica detecta cambios en las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre la pared vascular, así como señales químicas transportadas por la sangre y responde a ellas liberando sustancias vasoactivas, algunas de las cuales tienen funciones antagónicas como vasodilatadores y vasoconstrictores o hemostáticos y antihemostáticos (Ver tabla 1).

Tabla 1. Principios activos del endotelio vascular	
Antihemostáticos	Trombomodulina Proteína C Proteína S Activador tisular de plasminógeno Prostaciclina (PGI ₂) Óxido nítrico Heparansulfatos
Hemostáticos	Factor de von Willebrand Factor V Factor III (tisular) Inhibidor del activador de plasminógeno Tromboxano A ₂
Vasodilatadores	Óxido nítrico Prostaciclina (PGI ₂) EDHF CNP
Vasoconstrictores	Endotelina Angiotensina II Tromboxano A ₂ Anión superóxido
Promotores de crecimiento	Endotelina Angiotensina II VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) PDGF (Platelet Derived GF) bFGF (Fibroblast GF Basic) Anión superóxido
Inhibidores del crecimiento	Óxido nítrico Heparansulfatos TGF-β (Transforming GF-β)
Inmunológicos	E selectina. P selectina ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1) Interleuquinas 1, 6, 18 TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)

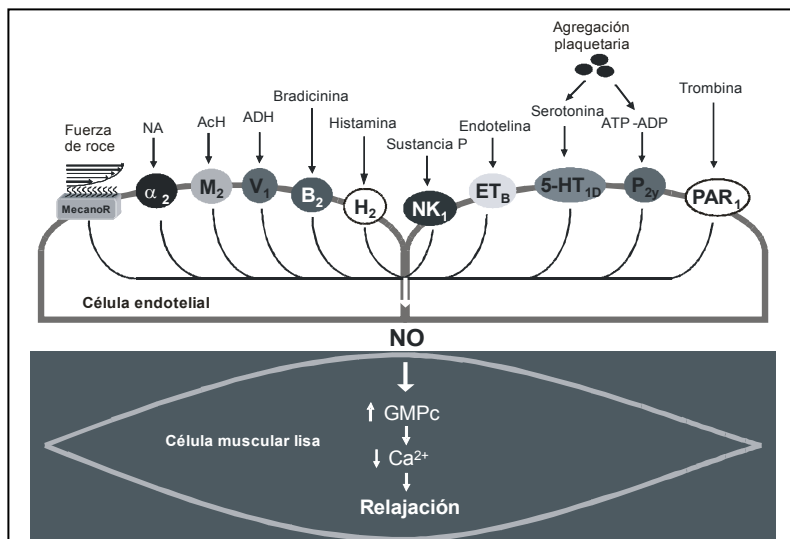
Las sustancias liberadas, a través de efectos autocrinos (sobre la misma célula que las produjo) o paracrinos (sobre diversas células vecinas), determinan la participación activa del endotelio en la homeostasis vascular. Fisiológicamente, las diversas funciones que cumple el endotelio no son más

que la expresión del balance de las acciones de los distintos principios activos que produce. El resultado neto de ese balance muestra que el endotelio disminuye el tono vascular, debido a que relaja el músculo liso de la pared del vaso, y es inhibidor de la proliferación de ese tejido, inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, deprime la activación del sistema de coagulación, estimula la fibrinólisis, disminuye la permeabilidad capilar e inhibe la adhesión y migración de neutrófilos y macrófagos generadores de inflamación (Figura 1). El término *disfunción endotelial* indica que, ya sea en condiciones basales o luego de estimulación, el endotelio no cumple apropiadamente estas funciones.

Una menor biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), una alteración en la producción de prostanoideos (incluyendo prostaciclina, tromboxano-A2 y/o isoprostanos), un deterioro de la hiperpolarización dependiente de endotelio, así como una mayor liberación de endotelina-1, pueden individualmente o asociados contribuir a la disfunción endotelial. Sin embargo, la menor biodisponibilidad de NO, causada



por una disminución en su síntesis o un aumento de la velocidad con que se degrada, constituye el fenómeno más temprano y la característica más importante de disfunción endotelial. Por tal motivo, este capítulo describirá fundamentalmente, las alteraciones en la síntesis y/o degradación del NO asociadas al desarrollo de hipertensión arterial.



Estímulos y receptores específicos que promueven la síntesis y liberación de óxido nítrico, la síntesis del segundo mensajero GMPc y la relajación del músculo liso vascular. NA:noradrenalina, ACh: acetilcolina, ADH: vasopresina

Óxido nítrico (NO)

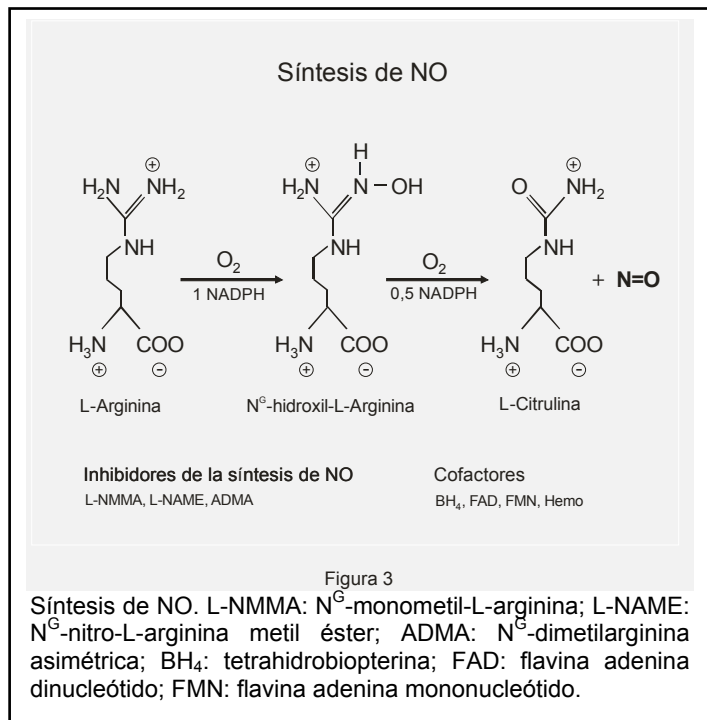
Furchgott y Zawadski (1) descubrieron en 1980 el papel fundamental del endotelio como regulador de la vasodilatación, al describir el fenómeno de la

relajación del músculo liso vascular dependiente de endotelio. Ellos demostraron que anillos arteriales previamente contracturados se podían relajar en respuesta a la acetilcolina sólo si las células endoteliales estaban intactas. Eliminando el endotelio anulaban la vasorelajación producida por acetilcolina, lo cual sugería que estaba mediada por alguna sustancia derivada de endotelio que se

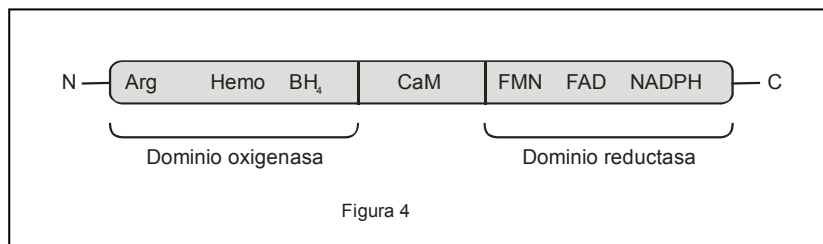
denominó EDRF (endothelium-derived relaxing factor). Posteriormente se demostró que el EDRF era el NO (2). El NO difunde al músculo liso vecino, activa la enzima guanilato-ciclasa soluble, por lo cual aumentan los niveles celulares del segundo mensajero GMPc, que a su vez relaja a la célula muscular por disminuir el calcio citosólico necesario para la interacción de las proteínas contráctiles (Figura 2). La mayoría de los estímulos vasodilatadores, como el flujo sanguíneo y numerosos agonistas de receptores de membrana acoplados a proteína G, relajan indirectamente al músculo liso vascular a través de la liberación endotelial de NO (Figura 2). Es importante destacar que muchos de estos agonistas actuando directamente sobre receptores de la célula muscular lisa, de las plaquetas, o sobre proteínas sanguíneas producen vasoconstricción, agregación plaquetaria y/o coagulación. De manera que la respuesta simultánea de un endotelio sano amortigua las consecuencias vasculares de cualquiera de estos efectos.

Síntesis de NO

El NO es producido a partir del aminoácido básico L-arginina por tres diferentes isoformas de la NO-sintetasa [NOS I o neuronal (NOSn), NOS II o inducible (NOSi), NOS III o endotelial (NOSe)] expresadas en prácticamente todos los tipos de células vasculares, pero es la isoforma endotelial la principal responsable de la síntesis de NO en las células endoteliales. Mientras que NOSe y NOSn son proteínas constitutivamente expresadas, la expresión de NOSi requiere la interacción de la célula con estímulos que generen señales nucleares apropiadas.



Las tres isoformas de NOS comparten un ciclo catalítico similar, que consiste en la oxidación de L-arginina para formar NO y L-citrulina en una compleja reacción que utiliza como co-sustratos O₂ y nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) y



Esquema de la estructura de NOSe.

N: extremo amino terminal; C: extremo carboxilo terminal; Arg: L-arginina; Hemo: grupo hemo; BH₄: tetrahidrobiopterina; CaM: calmodulina; FMN: flavina adenina mononucleótido; FAD: flavina adenina dinucleótido.

requiere varios cofactores redox como tetrahidrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina adenina mononucleótido (FMN) y el grupo Hemo (Figura 3). El monómero de la NOS consiste en un dominio oxigenasa N-terminal, asociado al grupo Hemo y un dominio reductasa C-terminal,

asociado a las flavinas, unidos por una región reguladora que contiene el motivo de interacción con calmodulina (Figura 4). La dimerización de la NOS es esencial para su actividad, porque permite que ocurra la transferencia de electrones desde el dominio reductasa de un monómero al dominio oxigenasa del otro. La dimerización ocurre por interacción de los dominios oxigenasa a través del cofactor BH_4 . Tanto L-arginina como BH_4 promueven la formación del dímero y lo estabilizan, por lo tanto bajas concentraciones de alguno de ellos desacopla la enzima y en esas condiciones se produce radical superóxido (O_2^-) (3, 4). La síntesis de NO depende de la unión de la NOS a la proteína calmodulina. Para unir calmodulina y en consecuencia activarse, NOS ϵ y NOS η requieren aumentos del Ca^{+2} intracelular. En contraste, NOS ι , que tiene una afinidad alta con calmodulina, puede unirse a esta proteína a concentraciones muy bajas de Ca^{+2} . Así, la actividad de NOS ϵ y NOS η está críticamente regulada por los cambios transitorios del Ca^{+2} intracelular en respuesta a estímulos diversos, mientras que la actividad de las NOS ι es independiente de Ca^{+2} y puede mantenerse tónicamente activa durante varios días (5) (Figura 5).

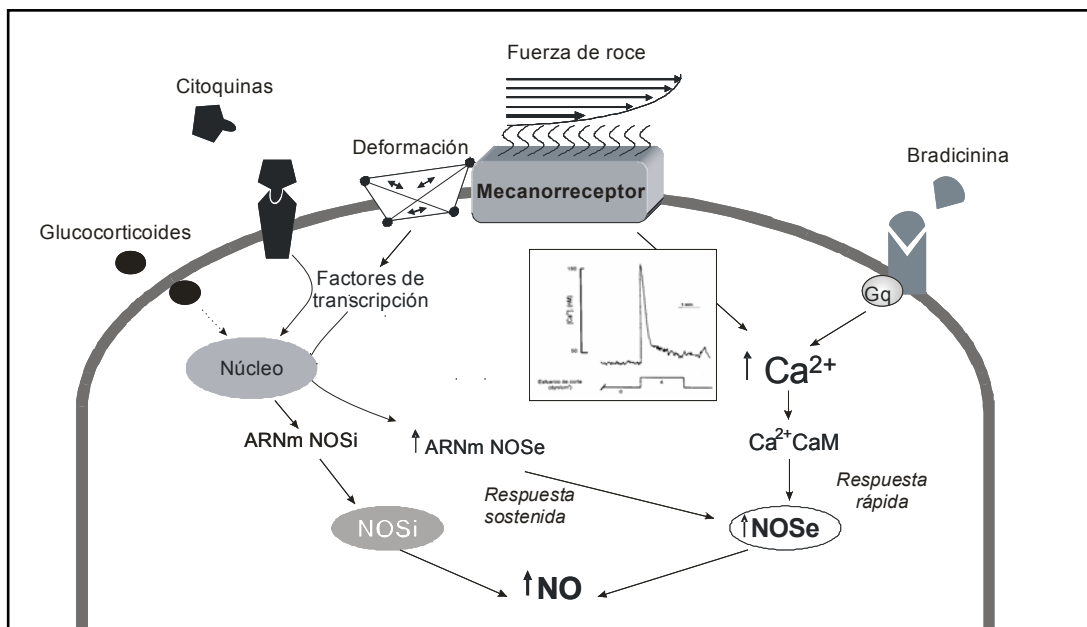


Figura 5

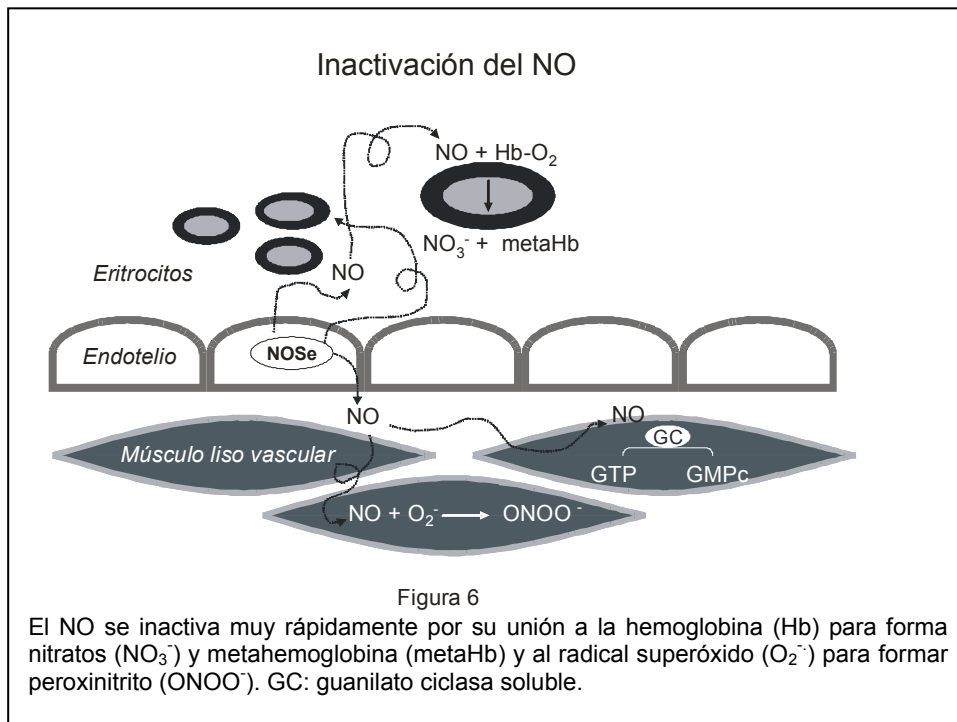
Regulación de la actividad de NOS ϵ y NOS ι .: El aumento de Ca^{+2} intracelular aumenta la actividad de NOS ϵ en forma rápida y transitoria; la activación de factores de transcripción nucleares aumenta la expresión de NOS ϵ y sostiene en el tiempo la producción de NO. La expresión de NOS ι es regulada a nivel nuclear por citoquinas (la aumentan) y glucocorticoides (la inhiben).

Uno de los mecanismos fisiológicos más importantes de regulación de la producción y liberación tónica de NO es la fuerza de roce que ejerce el flujo sanguíneo laminar al circular por los vasos (*shear stress*). Con el ejercicio, el aumento del volumen minuto se traduce en un incremento de la perfusión tisular regional debido a la mayor actividad de NOS ϵ inducida por el aumento de la fuerza de roce. Se produce una respuesta inmediata de liberación de NO mediada por el aumento del Ca^{+2} intracelular y la fosforilación de la enzima (Ver más adelante) (6). La fuerza de roce puede además, sostener en el tiempo la mayor producción de NO dado que genera cambios nucleares (regulación del

promotor) que se manifiestan en el aumento del número de copias de ARNm para las NOSe (7) y además aumenta la estabilidad el ARNm (8) (Figura 5).

Inactivación de NO

El NO es rápidamente inactivado por sustancias reactivas del oxígeno (ROS) y proteínas de la sangre como la hemoglobina y la albúmina (Figura 6). Su unión al O_2^- forma peroxinitrito ($ONOO^-$) y convierte al NO en un poderoso antioxidante, por lo cual su síntesis en el endotelio es esencial para mantener la salud vascular. Sin embargo en circunstancias patológicas el NO



puede convertirse en una molécula prooxidante. En procesos inflamatorios de la pared vascular que cursan con altas concentraciones tanto de ROS como de NO (activación de la NOSi en respuesta a citoquinas, Figura 2), originados no sólo en las células endoteliales sino también en los macrófagos reclutados, aumenta la formación del altamente reactivo radical peroxinitrito que modifica la estructura y función de distintas proteínas y contribuye a la disfunción vascular presente en patologías como la hipertensión y la aterosclerosis.

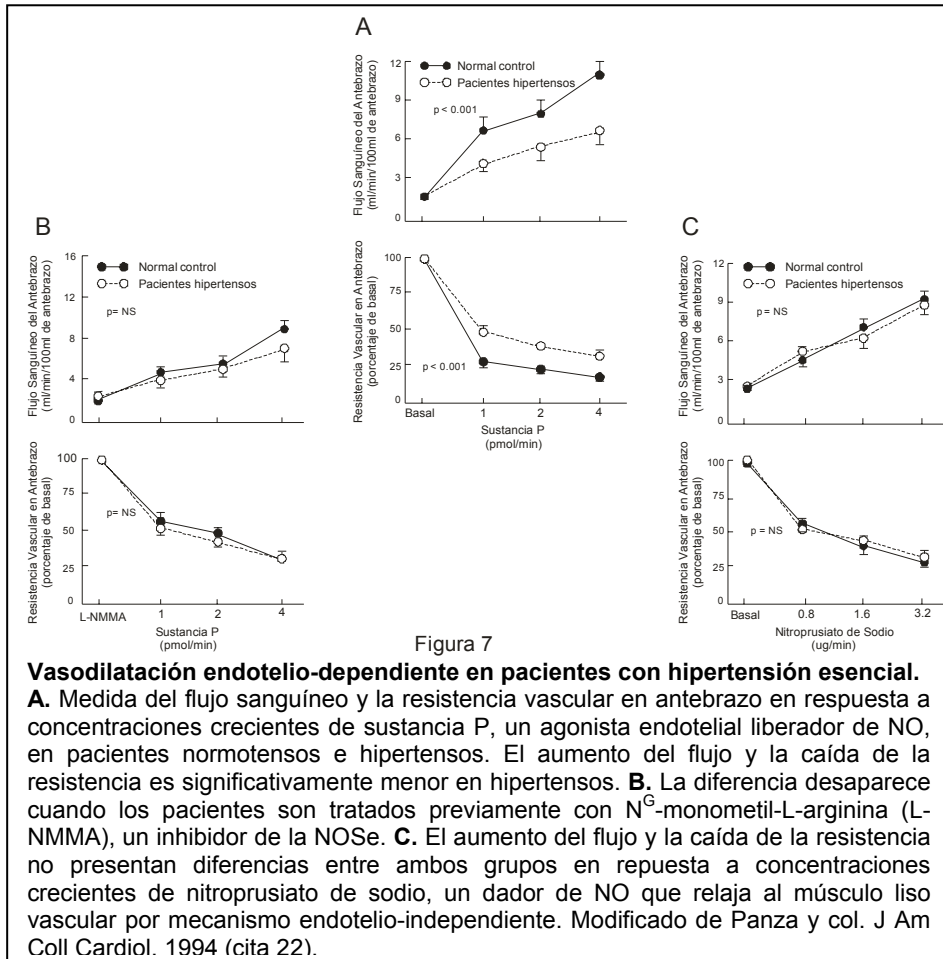
Los efectos biológicos del NO están mediados en gran parte por la S-nitrosilación (unión a grupos sulfuro o tioles de residuos de cisteína) de péptidos y proteínas para producir grupos S-nitrosotioles bioactivos (SNO) (9). En la sangre, S-nitrosoalbúmina (SNO-albúmina) y S-nitrosohemoglobina (SNO-Hb) constituyen los transportadores más importantes del NO bioactivo circulante. Defectos en la síntesis y/o catabolismo de estos productos pueden afectar la presión arterial. Por ejemplo, altas concentraciones de SNO-albúmina y de SON-Hb (excesivo secuestro de NO) se detectaron en pacientes con preeclampsia y diabetes mellitus tipo 1, respectivamente (10, 11).

Disfunción endotelial en la hipertensión arterial

La alteración de la función endotelial, que se manifiesta por el desorden del control del tono vasomotor, está presente, tanto en grandes arterias y venas como en la microvasculatura, en diversas enfermedades cardiovasculares como hipertensión sistémica, hipertensión pulmonar, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca. Además, muchos de los factores de riesgo asociados con enfermedad cardiovascular como tabaquismo, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipoestrogenismo, hiperhomocisteinemia también están asociadas con disfunción endotelial (12-19). Estas asociaciones sugieren que podrían existir mecanismos comunes a través de los cuales la función endotelial se perturba. El grado de deterioro de la función endotelial se considera un predictor de futuros accidentes cardiovasculares (20, 21). Esta observación indica que la disfunción endotelial no sólo es un marcador de enfermedad vascular sino que además contribuye a la progresión de la misma. En este contexto se ha demostrado que intervenciones terapéuticas que disminuyen el número de accidentes cardiovasculares también mejoran la función vasomotora endotelial. Más aún, el grado de mejoría del tono vasomotor en respuesta a intervenciones terapéuticas, aparece como una medida potencial de la eficiencia del tratamiento.

En la hipertensión arterial el endotelio vascular está deteriorado y promueve cambios funcionales de la pared vascular. Los pacientes hipertensos tienen deprimida la relajación dependiente de endotelio y este trastorno está asociado a una menor bioactividad del NO. Numerosos trabajos de Panza y col. (13, 22-24) muestran que el aumento de flujo sanguíneo en el antebrazo en respuesta a distintos agonistas que estimulan la producción de NO, como acetilcolina, sustancia P y bradicinina, es significativamente menor en pacientes hipertensos que en normotensos (Figura 7). Como también muestra la figura esta diferencia desaparece cuando ambos grupos son previamente tratados con N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), un inhibidor de la NOS y además, los hipertensos presentan una respuesta vasodilatadora conservada al nitroprusiato de sodio, dador de NO que actúa directamente sobre el músculo liso vascular. Estos resultados confirman que en la hipertensión la disfunción endotelial efectivamente está asociada a una menor biodisponibilidad de NO. Más aún, Plavnik y col. obtuvieron resultados similares en una población sana, sin factores de riesgo, con presión sistólica normal-alta (25), y Taddei y col. lo detectaron en personas normotensas con antecedentes familiares de hipertensión (26). Estas observaciones indican que la disfunción endotelial representa un cambio temprano en aquellos sujetos que desarrollarán hipertensión en el futuro y que por lo tanto puede ser el disparador del desarrollo de hipertensión, hallazgo que permite acentuar la atención en esta población y prevenir complicaciones futuras. Si la disfunción endotelial es promotora de hipertensión, esto podría explicar la asociación entre hipertensión y otras patologías que alteran la función endotelial como diabetes, obesidad, hipercolesterolemia (27). La ausencia de la respuesta relajante mediada por NO, se manifiesta también en un aumento de la contracción del músculo liso vascular en respuesta a diversos vasoconstrictores como, endotelina a través de sus receptores ET_A y ET_B, serotonina estimulando su receptor 5-HT_{2A} y noradrenalina interactuando con el receptor α_1 -adrenérgico (28). Más aún, en pacientes hipertensos se encontraron aumentos de los niveles circulantes de vasoconstrictores como endotelina y tromboxano-A₂ (29). Si bien el deterioro de la relajación vascular dependiente de endotelio es un marcador de disfunción, la menor disponibilidad

de NO también genera un endotelio con efectos pro-inflamatorios, pro-trombóticos y pro-coagulantes. Esto hace que la disminución de la vasodilatación mediada por flujo o por acetilcolina se encuentre asociada con el aumento de marcadores plasmáticos de disfunción endotelial, como el factor de von Willebrand y moléculas endoteliales de adhesión celular. El incremento de células endoteliales circulantes parece ser una manifestación de severo daño endotelial (30-32).



EI

deterioro de la relajación dependiente de endotelio en pacientes hipertensos, como mencionamos previamente, puede estar causada por menor síntesis o mayor velocidad de degradación de NO, a lo que pueden sumarse alteraciones en la arquitectura vascular. En relación a este trastorno existe evidencia experimental que asocia la menor biodisponibilidad de NO con aumentos de rigidez de la pared vascular.

Tanto en sujetos hipertensos como sanos se detectó una relación inversa entre función endotelial y distintos indicadores de rigidez arterial, como la asociación entre menor relajación dependiente de endotelio en respuesta a acetilcolina y mayor presión del pulso periférica (33-35). La NOSe es una enzima altamente regulada y es muy probable que disminuya su actividad en estados avanzados de enfermedad arterial. De hecho, la depresión de la síntesis de NO se ha descrito a todo lo largo del árbol vascular (19, 36). Por otra parte, Harrison y col. demostraron que la hipertensión está asociada a un aumento de la producción de ROS y que aún persistiendo la producción continua de NO la relajación vascular dependiente del endotelio está deprimida, por lo cual infirieron que en estas condiciones hay una mayor inactivación de NO (37). En su conjunto los resultados experimentales

indican que los mecanismos que conducen a una menor síntesis y/o biodisponibilidad del NO son variados y posiblemente multifactoriales (37, 38):

I) Disminución de la síntesis de NO debido a alteraciones en:

- 1) El metabolismo del sustrato de la NOSe
- 2) La expresión y/o estructura de la NOSe
- 3) Las vías de señales que regulan la actividad de la NOSe
- 4) La disponibilidad de cofactores requeridos por la NOSe

II) Aumento de la inactivación de NO

I) Disminución de la síntesis de NO

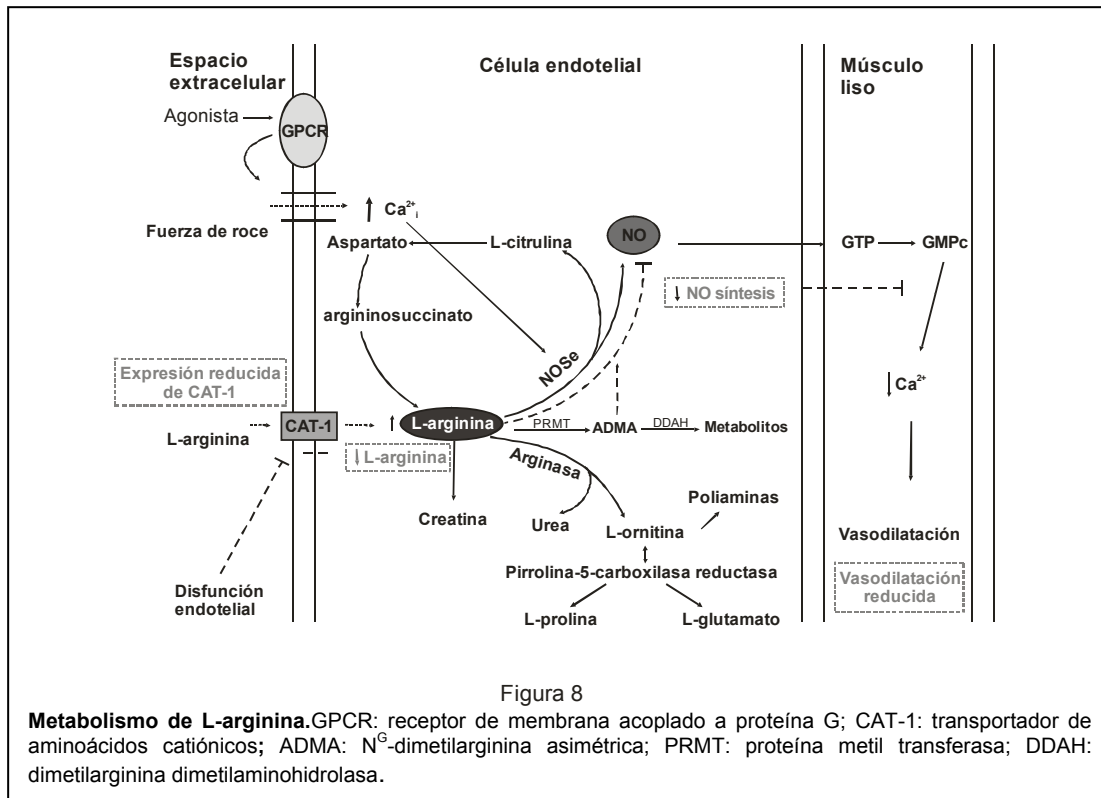
Alteraciones del metabolismo del sustrato de la NOS.

Como ya mencionamos el sustrato de la NOSe es el aminoácido básico L-arginina con una constante de afinidad (K_m) de aproximadamente 5 μ M. La L-arginina es sintetizada como un producto dentro del ciclo de la urea y su concentración en sangre es aproximadamente 100 μ M, alcanzando concentraciones varias veces mayores en las células endoteliales (39). Este aminoácido es transportado activamente desde la sangre hacia la célula endotelial por un transportador de aminoácidos catiónicos (CAT-1), proceso que es estimulado por bradicinina, acetilcolina y citoquinas tales como la interleuquina-1 β o TNF- α (39). El endotelio también puede resintetizar L-arginina a partir del aminoácido L-citrulina (Figura 8). Dada la alta concentración endotelial de L-arginina no parece probable que la administración exógena del aminoácido aumente la producción de NO. Sin embargo, la evidencia clínica y experimental de los últimos años indica que la administración oral o intravenosa de L-arginina mejora la síntesis de NO y la vasodilatación dependiente de endotelio en diversas patologías como hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, a pesar de la disponibilidad en exceso de L-arginina intracelular (39-42). Así, la concentración extracelular de L-arginina parece ser un factor limitante de la producción de NO. La expresión "*paradoja de arginina*" ha sido acuñada como referencia a esta situación contradictoria. Los mecanismos a través de los cuales la L-arginina exógena produce esta mejoría no se conocen aún con precisión y existen varias explicaciones potenciales:

1) Que L-arginina exógena actúe a través de mecanismos distintos a ser sustrato de NOS, como liberación de insulina (que como se describe más adelante, aumenta la actividad de la NOSe) o vasodilatación directa. Sin embargo luego de administrar L-arginina la concentración de nitrato en plasma y la excreción urinaria de GMPc aumentan indicando mayor producción de NO (43).

2) Que la concentración total de L-arginina en la célula no refleje la que se encuentra en microdominios tales como las caveolas, invaginaciones especializadas de la membrana plasmática caracterizadas por la presencia de la proteína caveolina-1, donde se ubica la NOSe. El aminoácido puede permanecer en compartimientos celulares poco accesibles a la NOSe y, en estas condiciones, la velocidad de transporte de L-arginina desde el extracelular por el CAT-1, que co-localiza con la NOSe en las caveolas (44), se transforma en un determinante mucho más crítico de la actividad de la NOSe, que la concentración celular total. Por lo tanto, alteraciones en la actividad del CAT-1 podrían conducir a la disfunción endotelial (Figura 8). De hecho, el deterioro de la actividad del transportador

ha sido observado en hipertensión esencial y más aún en individuos normotensos con antecedentes familiares de hipertensión (45). Estas observaciones sostienen la hipótesis de que defectos en el transporte de L-arginina pueden contribuir a la patogénesis de la hipertensión y no ser una consecuencia del aumento de presión *per se*. La disfunción endotelial que resulta de las alteraciones en el transporte puede ser compensada con el suplemento exógeno de L-arginina..



3) Que L-arginina exógena contrarreste los efectos de inhibidores endógenos de la NOSe como el aminoácido N^G-dimetilarginina asimétrica (ADMA), metabolito de la L-arginina cuyos niveles en plasma se encontraron aumentados en pacientes con patología cardiovascular (Figura 8) (46, 47). En las células endoteliales ADMA se forma a partir de la hidrólisis de proteínas metiladas en L-arginina. La metilación en L-arginina es un mecanismo de modificación proteica post-traducción que ocurre en casi todos los tipos celulares por acción de la familia enzimática de las proteína metil transferasas (PRMT), de las cuales la PRMT-1 está presente en el endotelio (46). La actividad de esta enzima puede aumentar en respuesta a moléculas como LDL y citoquinas (48, 49). ADMA es degradado por la enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa, cuya isoforma 2 (DDAH-2) es la de mayor expresión en el endotelio (46). El aumento de estrés oxidativo que está asociado a múltiples factores de riesgo cardiovascular como hipercolesterolemia, hiperglucemia, hiperhomocisteinemia o citoquinas pro-inflamatorias, deprime la actividad de DDAH-2 y genera un significativo aumento de los niveles intracelulares de ADMA (50, 51). La concentración plasmática de ADMA es muy inferior a la de L-arginina endógena lo que indicaría que es poco probable que funcione como competidor de L-arginina por la NOSe o el transportador catiónico. Sin embargo, existen datos experimentales y clínicos que sugieren que pequeñas alteraciones en las concentraciones de ADMA provocan disminuciones

significativas en la producción de NO (39, 46). La detección de concentraciones elevadas de ADMA, en un paciente dado, puede garantizar la administración suplementaria de L-arginina, para mejorar la habilidad del endotelio de contrarrestar los efectos vasculares dañinos de vasoconstrictores y ROS. En los últimos años, el conocimiento de ADMA ha ganado importancia clínica porque numerosos estudios lo muestran como un factor de riesgo cardiovascular. Esta situación convierte a ADMA en un nuevo blanco para la terapéutica farmacológica.

4) Que otro camino metabólico regulador de la concentración de L-arginina en las células endoteliales, la enzima arginasa, esté exacerbado y en consecuencia disminuya la disponibilidad del aminoácido como sustrato de la NOSe y la producción de NO (Figura 8). La arginasa transforma L-arginina en L-ornitina y urea. Las células endoteliales contienen dos isoformas de arginasa: la I, constitutivamente presente y la II o inducible. La expresión de la I aumenta con el estrés oxidativo y el estiramiento (52) y la síntesis de la II es inducida por trombina, lipopolisacáridos y citoquinas (52). Esto indica que cambios hemodinámicos asociados con la hipertensión así como procesos inflamatorios crónicos podrían producir un aumento importante de los niveles de arginasa (53, 54). La arginasa puede inhibir la producción de NO a través de varios mecanismos potenciales que incluyen: competición con la NOSe por el sustrato; desacople de la NOSe con producción de O_2^- promovido por la menor disponibilidad de L-arginina; sensibilización de la NOSe a su inhibidor endógeno ADMA; inhibición de la actividad de la NOSi a través de la urea. Además la arginasa dirige el metabolismo de la L-arginina hacia la formación de L-ornitina y a partir de este aminoácido a la formación de poliaminas y L-prolina esenciales para el crecimiento de la célula muscular lisa y la síntesis de colágeno. Así el aumento de actividad de arginasa puede promover el remodelamiento vascular y la formación de neoíntima (55). Se ha demostrado que la inhibición de arginasa estimula la síntesis de NO (56) y que la sobre-expresión de la enzima deprime la generación de NO y está asociada a disminución del contenido intracelular de L-arginina (55). Estudios en diversos modelos experimentales de hipertensión han podido asociar aumentos de la actividad de arginasa con el desarrollo de disfunción endotelial y alta presión arterial (57, 58). Todos estos resultados indican que la expresión constitutiva de arginasa en las células endoteliales contrarresta la vasodilatación mediada por NO y sugieren una función tónica vasoconstrictora para la enzima, convirtiéndola en un prometedor blanco terapéutico en el tratamiento de la disfunción endotelial. Es interesante destacar que un intermediario formado durante la catálisis de L-arginina por la NOS, N^G -hidroxi-L-arginina (Figura 3), es un potente inhibidor de la arginasa, indicando que a través de la síntesis de NO, la actividad de la NOSe limita la actividad de arginasa en la célula endotelial (59).

Alteraciones en la expresión y/o estructura de la NOSe.

Otro factor que puede afectar la producción endotelial de NO es el grado de expresión de NOSe. Aunque NOSe, como ya se mencionó, está constitutivamente expresada, numerosos resultados experimentales indican que diversos estímulos pueden regular esta expresión (37, 60). Así, la fuerza de roce del flujo, bajas concentraciones de LDL-oxidada y análogos de GMPc, aumentan su expresión. Es interesante destacar que la exposición transitoria de las células endoteliales a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ROS derivada del radical O_2^- , también incrementa la expresión de la enzima

(61). Por el contrario, la hipoxia, altas concentraciones de LDL-oxidada, citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), o lipopolisacáridos disminuyen su expresión. La menor expresión de NOSe fue asociada con desestabilización del ARNm (37, 60).

También se ha encontrado que los efectos vasculares beneficiosos de las drogas que disminuyen los niveles circulantes de colesterol (estatinas o inhibidores de HMG-CoA reductasa) se deben en parte a su habilidad para aumentar la expresión génica de la NOSe (62, 63). Sin embargo, el número de estudios clínicos que muestran que las estatinas mejoran la relajación dependiente de endotelio es equivalente a aquellos que muestran que las estatinas no mejoran la función endotelial. Esta discrepancia pudo ser resuelta recurriendo a la medición de los niveles plasmáticos de ADMA: estas drogas no corrigen la función endotelial en pacientes con altos niveles de ADMA que bloquea aún la NOSe sobre-expresada; la situación puede revertirse cuando la administración de estatinas se combina con suplemento nutricional de L-arginina (64, 65).

No hay resultados consistentes que indiquen que la hipertensión es consecuencia de alteraciones génicas (polimorfismo) de NOSe. Algunos estudios han encontrado mayor prevalencia de mutaciones génicas específicas de NOSe en pacientes hipertensos respecto de normotensos (66, 67), mientras que otros laboratorios no pudieron asociar estos genotipos con hipertensión (68, 69). Estos polimorfismos probablemente incidan poco en la síntesis de NO, sin embargo, pueden cobrar importancia en presencia de otros factores de riesgo. Estudios futuros que relacionen medidas funcionales con el análisis genético podrán proveer mejor información en este aspecto.

Alteraciones en las vías de señales que regulan la actividad de la NOSe.

Un mecanismo a considerar como inductor de disfunción endotelial es la alteración de los factores celulares que modulan la actividad de NOSe. Esta enzima está sujeta a varios tipos de modificaciones estructurales, muchas veces sobrepuestas, que ocurren luego que la proteína se ha sintetizado (post-traducción). Estas modificaciones ofrecen mecanismos dinámicos de activación o inhibición de la enzima en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos. Si bien el aumento transitorio de Ca⁺² provee el mecanismo más rápido de activación de NOSe a través de su unión a calmodulina, la actividad de NOSe depende además de su estado de fosforilación en residuos serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr), de su acilación y nitrosilación, de su interacción con otras proteínas y de su localización subcelular (5, 37, 70).

1) *Receptores acoplados a proteína G.* Como se describió previamente, el Ca⁺² aumenta en la célula endotelial en respuesta a agonistas cuyos receptores acoplan a proteína G (Figura 2). El estudio del deterioro de esta vía de señalización celular en la disfunción endotelial ha sido foco de interés de numerosos investigadores. En particular, en la hipertensión se encontró disminuida la expresión de un tipo de proteína G, la G α y en cultivos celulares se observó que la LDL-oxidada disminuye la expresión de esta proteína. Este tipo de defecto podría explicar la falta de relajación dependiente de endotelio en respuesta a ciertos agonistas como por ejemplo la acetilcolina (71, 72).

2) *Fosforilación.* La fosforilación de NOSe en residuos de Ser, Thr y Tyr, constituye un mecanismo fundamental en el control de su actividad en respuesta a numerosos estímulos humorales, mecánicos y farmacológicos (70, 73-83). Se han descrito varios sitios de fosforilación, localizados en los distintos

dominios de la enzima: Ser1177, en el dominio reductasa; Ser633 y Ser 615 en la zona de unión al cofactor FMN; Thr495 en la zona de unión al complejo Ca^{+2} -calmodulina y Ser114 en el dominio oxigenasa. La fosforilación de estos sitios puede provocar tanto la estimulación como la inhibición de la actividad enzimática de la NOSe. Así la fosforilación de los sitios Ser1177 y Ser633 estimula a NOSe por favorecer su unión con calmodulina, mientras que la fosforilación del sitio Thr495 es inhibitoria porque interfiere con dicha unión. La fosforilación del residuo Ser1177 promueve además la activación de la enzima por provocar su dimerización. Los efectos de la fosforilación de los residuos Ser615 y Ser114 así como la de los residuos de Tyr no se conocen aún con exactitud. Se sugiere que podrían regular la interacción de NOSe con otras proteínas, como por ejemplo su asociación a la proteína caveolina-1 en las caveolas de la membrana celular.

La mayoría de los agentes conocidos que estimulan a la NOSe: fuerza de roce del flujo sanguíneo, bradicinina, factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF), ATP, estatinas e inhibidores de fosfodiesterasa tipo III, provocan la fosforilación de los residuos Ser1177 y Ser633, mientras que la elevada fosforilación basal del residuo Thr495 disminuye en respuesta a agonistas como bradicinina y VEGF. Aumentos en la fosforilación de Thr495 se encontraron asociados a tabaquismo y a fármacos inmunosupresores como la rapamicina.

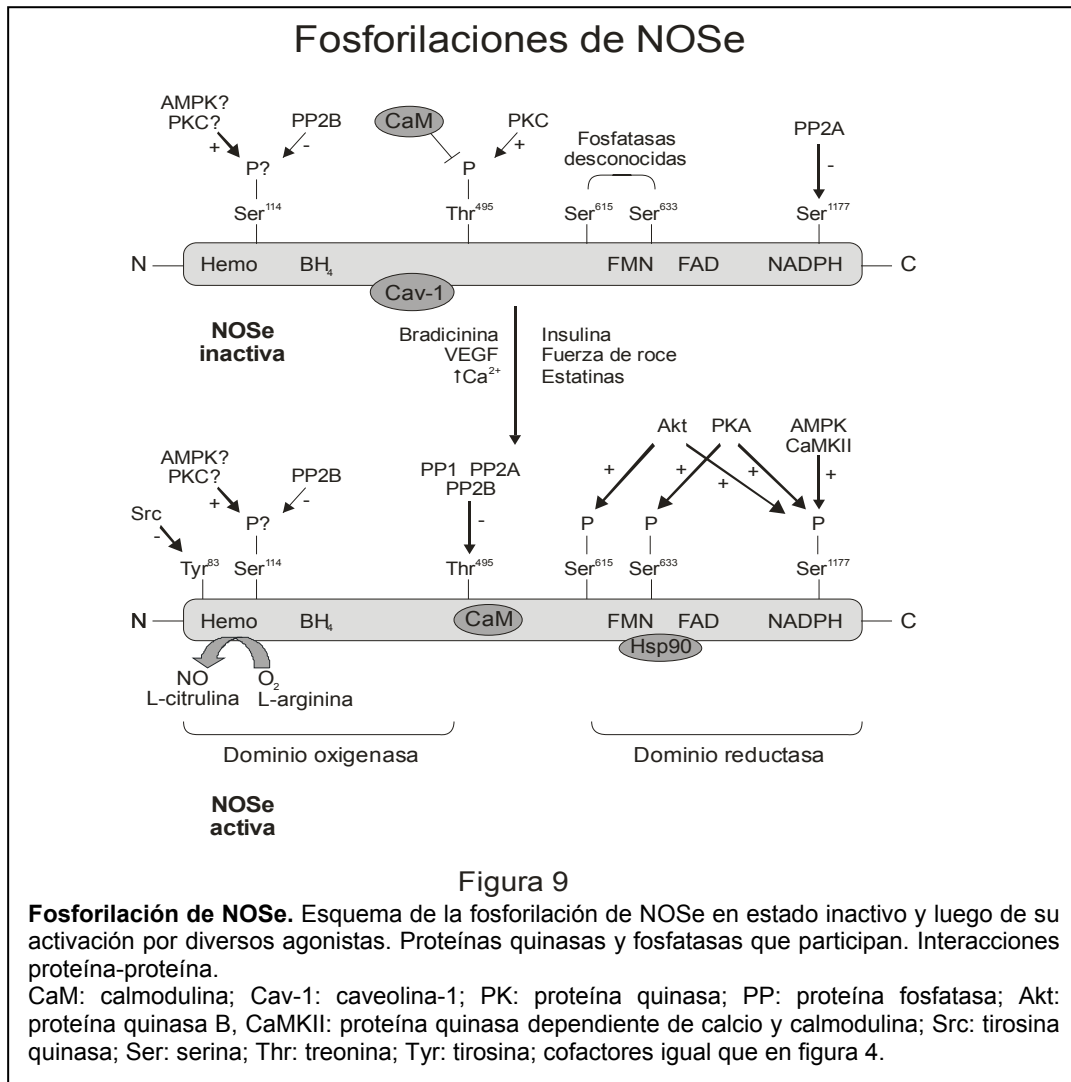
La figura 9 esquematiza la fosforilación de la NOSe en los distintos residuos antes y después de la intervención de diversos agonistas.

3) *Acilación*. La NOSe no contiene dominios hidrofóbicos de transmembrana y su asociación a la membrana plasmática está mediada por acilación de la enzima. La NOSe está doblemente acilada por los ácidos grasos saturados mirístico y palmítico. La miristilación es un paso irreversible y le permite a la enzima anclarse en las caveolas de la membrana plasmática. La palmitolación es un proceso reversible que estabiliza la asociación de NOSe con la membrana. La estimulación prolongada de agonistas como bradicinina induce de-palmitolación de NOSe y su translocación al citosol. Esto podría funcionar como un mecanismo de retroalimentación negativa que desactiva a la NOSe (70).

Nitrosilación. El proceso de nitrosilación de la NOSe, unión de NO a residuos de cisteína, es reversible y requiere que la enzima esté anclada en la membrana. La nitrosilación inhibe la actividad de NOSe porque promueve la disociación de la estructura dimerica en monómeros inactivos (84). La nitrosilación podría funcionar entonces como un mecanismo de retroalimentación negativo que evita la formación de NO en grandes cantidades.

5) *Interacción con proteínas*. La primer interacción alostérica proteína-proteína que se conoció para la NOSe fue con calmodulina. Como ya mencionamos la NOSe requiere calmodulina para la síntesis de NO y esta unión es dependiente del aumento del Ca^{+2} intracelular. La asociación de NOSe a otras proteínas también modifica su actividad. En la célula endotelial no estimulada, NOSe está asociada en las caveolas a la proteína caveolina-1, interacción que inhibe tónicamente a la enzima. La estimulación de la célula endotelial por distintos agonistas y la consecuente unión de la enzima al complejo Ca^{+2} -calmodulina, promueve la disociación del complejo NOSe-caveolina-1 (Figura 9). Así, los cambios transitorios del Ca^{+2} intracelular que ocurren en la célula endotelial luego de su activación

se acompañan de cambios cíclicos en la interacción de NOSe con caveolina-1 versus calmodulina, resultado de una regulación proteína-proteína competitiva (5, 70). Niveles elevados de LDL-oxidada



4)

promueven la translocación del complejo NOSe-caveolina-1 al interior de la célula y por lo tanto NOSe permanece tónicamente inactiva (85). Estudios realizados en ratones que no expresan caveolina sugieren que esta proteína está involucrada en la patogénesis de diversas enfermedades en el hombre, entre ellas afecciones del sistema cardiovascular. En lo que respecta a los vasos, la ausencia de caveolina promueve la proliferación del músculo liso con hiperplasia de la intima (86). Otra proteína reguladora de la actividad de NOSe es la chaperona hsp90. La unión de hsp90 a NOSe incrementa la síntesis de NO tanto a bajas como altas concentraciones de Ca^{+2} , porque aumenta la afinidad de la enzima por calmodulina y también su actividad reductasa (87). La asociación NOSe-hsp90 requiere que hsp90 esté fosforilada en residuos Tyr y esta fosforilación es inducida por numerosos activadores de NOSe como la fuerza de roce, bradicinina, histamina, VEGF (70). Hsp90 también aumenta la actividad de NOSe facilitando su fosforilación (88). Hsp90 podría entonces funcionar como el factor celular que asegura la secuencia temporal de eventos que mantienen activada a NOSe: una fase inicial dependiente de Ca^{+2} y una posterior dependiente de fosforilación.

Experimentos de Brouet y col. (89) mostraron que el VEGF primero produce la unión de NOSe a Ca^{+2} -calmodulina y en consecuencia la disociación del complejo NOSe-caveolina-1 y promueve la interacción NOSe-hsp90. Esta asociación proteica recluta la quinasa Akt activada por el agonista, formando un complejo ternario, y Akt fosforila a NOSe (Figura 9). Finalmente el NO puede impedir la interacción NOSe-hsp90 por nitrosilación de esta última proteína. Como mencionamos para NOSe, la nitrosilación podría funcionar como una retroalimentación negativa que limita la síntesis excesiva de NO (90).

Estudios de diferentes laboratorios indican que NOSe también puede asociarse con proteínas del citoesqueleto y la actina parece ser la proteína del citoesqueleto particularmente involucrada. Esta asociación puede ofrecer un acople mecano-químico necesario para la activación de la NOSe en respuesta a la fuerza de roce del flujo sanguíneo (Figura 5) como también un medio de translocación de NOSe desde la caveolas a compartimientos intracelulares (5, 70).

Disponibilidad de cofactores requeridos por la NOSe

Como ya se mencionó, en ausencia de L-arginina o BH_4 , la NOSe transfiere electrones al O_2 molecular y produce O_2^- en lugar de NO. Este proceso se conoce como desacople de NOSe. Existe evidencia experimental que indica que el desacople de NOSe ocurre en diversas condiciones patológicas y es la consecuencia de la oxidación de BH_4 por efecto del peroxinitrito (38, 91). En estas condiciones la producción de O_2^- disminuye por el tratamiento con L-NAME, un inhibidor de NOSe. La oxidación de BH_4 puede representar una alteración importante en la hipertensión como lo muestran Landmesser y col. en ratones DOCA-sal hipertensos (92). El ácido ascórbico (vitamina C) recupera BH_4 desde la forma oxidada, por lo tanto provee un mecanismo protector de la síntesis de NO (91).

La síntesis de BH_4 ocurre a partir de la enzima guanosina trifosfato ciclohidrolasa I (GTPCH-I). Niveles reducidos de GTPCH-I se detectaron asociados a hipercolesterolemia, insulino resistencia, prehipertensión y hábito tabáquico, todas situaciones en las que la administración aguda de BH_4 mejora la disfunción endotelial (93-97). La hipertensión provocada por glucocorticoides también está asociada a niveles disminuidos de BH_4 por depresión de su síntesis (98). Las estatinas aumentan la transcripción génica de GTPCH-I y por lo tanto los niveles de BH_4 en la célula endotelial (99). La fuerza de roce también aumenta la formación de BH_4 por aumentar la actividad de GTPCH-I a través de la fosforilación de esta enzima (100). La mayor biodisponibilidad de NO provocada por el ejercicio resulta entonces, no sólo de la mayor expresión de NOSe sino también del aumento de la síntesis de BH_4 ambas generadas por el incremento de la fuerza de roce (97).

Los resultados emergentes de todos estos estudios preclínicos y clínicos en situaciones de riesgo y enfermedad cardiovascular avalan un papel primordial de la disponibilidad de BH_4 en la patogenia de la disfunción endotelial y llevan a considerar la administración de BH_4 como una herramienta farmacológica posible (97).

II) Aumento de la destrucción de NO

NO y O_2^- sufren una reacción radical-radical con una velocidad tres veces mayor que la velocidad de reacción de las superóxido dismutasas (SODs), enzimas que transforman el O_2^- en H_2O_2 (37). En un

compartimiento en el que estén presentes tanto NO como SODs, la reacción preferencial del $O_2^{\cdot-}$ es con el NO para formar peroxinitrito (Figura 6). Dada esta rápida velocidad de reacción, siempre hay $O_2^{\cdot-}$ inactivando NO tanto en las células como en el espacio extracelular. En condiciones fisiológicas las defensas antioxidantes minimizan esta interacción y mantienen un adecuado balance NO- $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, toda situación que provoque aumento de la concentración de $O_2^{\cdot-}$, aún con síntesis normal de NO, provocará disminución de la biodisponibilidad de NO. La degradación aumentada de NO por ROS se vincula a distintas patologías en modelos animales: hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, tabaquismo, insuficiencia cardíaca. Las mismas conclusiones se extendieron al hombre (38).

$O_2^{\cdot-}$ no es probablemente el único radical que puede reaccionar con NO, radicales derivados de lípidos también pueden hacerlo. Al respecto, se ha sugerido que radicales alcoxi e hidropoxi del ácido linoleico generados por LDL-oxidada inactivan al NO (38).

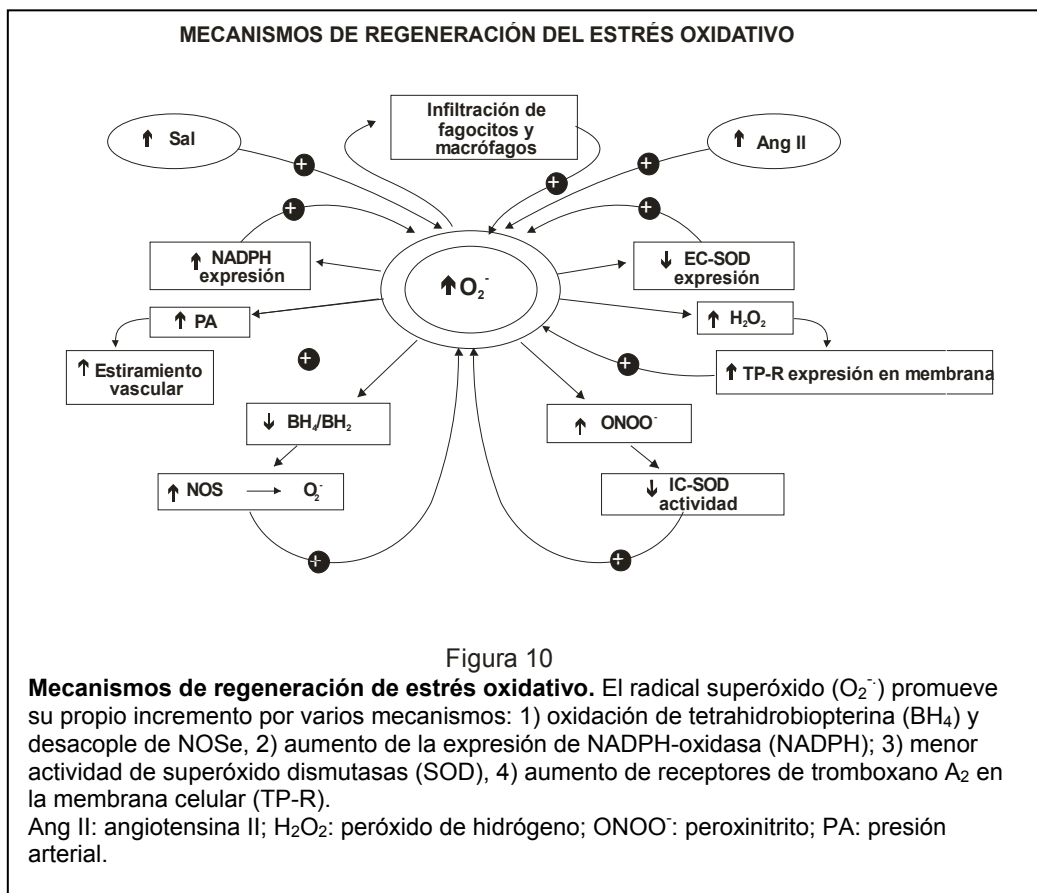
Origen de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las células vasculares

Uno de los mayores logros de la biología vascular de los últimos 15 años ha sido comprender la importancia de los mecanismos oxidativos como mediadores de respuestas fisiológicas y especialmente fisiopatológicas en los vasos sanguíneos. Las ROS son importantes moléculas de señalización intracelular en los vasos. Sin embargo, cuando existe un desbalance entre su formación y los mecanismos antioxidantes de defensa, estas moléculas promueven desórdenes que pueden conducir a la hipertensión. El estrés oxidativo vascular ha sido propuesto como el mecanismo intracelular involucrado en la patogenia de la disfunción endotelial, que dispara y sostiene varias de las alteraciones endoteliales descritas más arriba, que culminan en menor biodisponibilidad de NO y conducen a la hipertensión (27).

La evidencia acumulada en la última década indica que la formación de ROS en los vasos resulta principalmente de la activación de la enzima NADPH-oxidasa. En las células endoteliales el estiramiento mecánico activa la NADPH-oxidasa (101, 102), por lo tanto es posible que el estiramiento causado por la hipertensión incremente la formación de $O_2^{\cdot-}$. La angiotensina II (Ang II) podría ser la señal química de enlace entre el estiramiento vascular y la producción de $O_2^{\cdot-}$. En apoyo a esta hipótesis, se ha demostrado que el estiramiento vascular aumenta la producción local de Ang II (103) y que la Ang II es un potente activador de NADPH-oxidasa endotelial (104, 105). De hecho, el aumento de actividad de NADPH-oxidasa se ha detectado en los vasos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en la hipertensión inducida por infusión de Ang II (38).

La producción de $O_2^{\cdot-}$ dependiente de NADPH-oxidasa puede a su vez provocar la oxidación de BH_4 y el desacople de la NOSe a través de la formación de peroxinitrito, como se describió más arriba (38, 91) y además, activar la enzima xantina-oxidasa (106, 107), aumentar la expresión de NADPH-oxidasa (108) y deprimir la actividad de las SODs (109), incrementando aún más los niveles de $O_2^{\cdot-}$, la síntesis de peroxinitrito y el daño tisular. Esta cadena de reacciones produce y sostiene un ciclo de regeneración o mecanismo de retroalimentación positiva de ROS en el endotelio del hipertenso (Figura 10). Este proceso puede potenciarse por los efectos del H_2O_2 que se forma a partir de a partir de $O_2^{\cdot-}$. Boulden y col. (110) demostraron en células endoteliales de aorta bovina que la exposición a

H_2O_2 causa inicialmente un aumento en la producción de NO pero con el tiempo, la exposición sostenida o repetida a H_2O_2 disminuye los niveles de NO. Esta disminución puede prevenirse con inhibidores de la NADPH-oxidasa, atrapadores de ROS y administración de BH_4 , lo cual sugiere que la disfunción endotelial resulta de la oxidación de BH_4 por peroxinitrito cuando el H_2O_2 activa simultáneamente a NOSe y NADPH-oxidasa. El aumento de los niveles celulares de $O_2^{\cdot-}$ no sólo disminuye la síntesis y acelera la degradación del NO, sino que además deprime la actividad de la enzima guanilato-ciclasa soluble disminuyendo así la biodisponibilidad de GMPc, segundo mensajero del NO (105).



El endotelio vascular surge entonces como un atractivo blanco terapéutico en la hipertensión arterial y reducir la concentración de ROS se convierte en un mecanismo potencial de enfrentar la disfunción endotelial.

Bibliografía

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376, 1980.
2. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 145:201-227, 1992.
3. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9220-9225, 1998.
4. Panda K, Rosenfeld RJ, Ghosh S, Meade AL, Getzoff ED, Stuehr DJ. Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J Biol Chem* 277:31020-31030, 2002.

5. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100:2146-2152, 1997.
6. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79:984-991, 1996.
7. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90:2092-2096, 1992.
8. Weber M, Hagedorn CH, Harrison DG, Searles CD. Laminar shear stress and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. *Circ Res* 96:1161-1168, 2005.
9. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* 9:160-168, 2003.
10. Gandley RE, Tyruin VA, Huang W, Arroyo A. S-nitroso-albumin-mediated relaxation is enhanced by ascorbate and copper: implications for impaired vascular function in preeclampsia. *Hypertension* 45:21-27, 2005.
11. James PE, Lang D, Tufnell-Barret T, Milsom AB, Frenneaux MP. Vasorelaxation by red blood cells and impairment in diabetes: reduced nitric oxide and oxygen delivery by glycated hemoglobin. *Circ Res* 94:976-983, 2004.
12. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 81:491-497, 1990.
13. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323:22-27, 1990.
14. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 88:2149-2155, 1993.
15. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 88:2510-2516, 1993.
16. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA. Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 95:1119-1121, 1997.
17. Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M, Donald AE, Palacios M, Griffin GE, Deanfield JE, MacAllister RJ, Vallance P. Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. *Circulation* 102:994-999, 2000.
18. Thuillez C, Richard V. Targeting endothelial dysfunction in hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 19 Suppl 1:S21-25, 2005.
19. Rubira MC, Consolim-Colombo FM, Rabelo ER, Yugar-Toledo JC, Casarini D, Coimbra SR, Martins LC, Moreno H Jr, Krieger EM, Irigoyen MC. Venous or arterial endothelium evaluation for early cardiovascular dysfunction in hypertensive patients? *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9:859-865, 2007.
20. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101:1899-1906, 2000.
21. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberoberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 104:191-196, 2001.
22. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension: evidence that the abnormality is not at the muscarinic receptor level. *J Am Coll Cardiol* 23:1610-1616, 1994.
23. Panza JA, García CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO 3rd. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* 91:1732-1738, 1995.
24. Cardillo C, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO 3rd, Panza JA. Selective defect in nitric oxide synthesis may explain the impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *Circulation* 97:851-856, 1998.
25. Plavnik FL, Ajzen SA, Christofalo DM, Barbosa CS, Kohlmann O Jr. Endothelial function in normotensive and high-normal hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 21:467-472, 2007.
26. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation* 94:1298-1303, 1996.
27. Landmesser U, Drexler H. Endothelial function and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 22:316-320, 2007.
28. Li J, Cao YX, Liu H, Xu CB. Enhanced G-protein coupled receptors-mediated contraction and reduced endothelium-dependent relaxation in hypertension. *Eur J Pharmacol* 557:186-194, 2007.

29. Sainani GS, Maru VG. Role of endothelial cell dysfunction in essential hypertension. *J Assoc Physicians India* 52:966-969, 2004.
30. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med* 32:293-304, 2000.
31. Blann AD. Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33:256-261, 2003-2004.
32. Schram MT, Stehouwer CD. Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 37 Suppl 1:49-55, 2005.
33. Ceravolo R, Maio R, Pujia A, Sciacqua A, Ventura G, Costa MC, Sesti G, Perticone F. Pulse pressure and endothelial dysfunction in never-treated hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 41:1753-1758, 2003.
34. Ichigi Y, Takano H, Umetani K, Kawabata K, Obata JE, Kitta Y, Kodama Y, Mende A, Nakamura T, Fujioka D, Saito Y, Kugiyama K. Increased ambulatory pulse pressure is a strong risk factor for coronary endothelial vasomotor dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 45:1461-1466, 2005.
35. McEnery CM, Wallace S, Mackenzie IS, McDonnell B, Yasmin, Newby DE, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Endothelial function is associated with pulse pressure, pulse wave velocity, and augmentation index in healthy humans. *Hypertension* 48:602-608, 2006.
36. Kelm M, Preik M, Hafner DJ, Strauer BE. Evidence for a multifactorial process involved in the impaired flow response to nitric oxide in hypertensive patients with endothelial dysfunction. *Hypertension* 27:346-353, 1996.
37. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100:2153-2157, 1997.
38. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844, 2000.
39. Chin-Dusting JP, Willems L, Kaye DM. L-Arginine transporters in cardiovascular disease: A novel therapeutic target. *Pharmacol Ther* 116:428-436, 2007.
40. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 90:1248-1253, 1992.
41. Chen PY, Sanders PW. Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *Hypertension* 22:812-818, 1993.
42. Pieper GM, Peltier BA. Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 25:397-403, 1995.
43. Kurz S, Harrison DG. Insulin and the arginine paradox. *J Clin Invest* 99:369-370, 1997.
44. Wyatt AW, Steinert JR, Mann GE. Modulation of the L-arginine/nitric oxide signalling pathway in vascular endothelial cells. *Biochem Soc Symp* 71:143-156, 2004.
45. Schlaich MP, Parnell MM, Ahlers BA, Finch S, Marshall T, Zhang WZ, Kaye DM. Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. *Circulation* 110:3680-3686, 2004.
46. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 134:2842S-2847S, 2004.
47. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Boger RH, Tripepi G, Sesti G, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 46:518-523, 2005.
48. Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 87:99-105, 2000.
49. Osanai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K. Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension* 42:985-990, 2003.
50. Okubo K, Hayashi K, Wakino S, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Tokuyama H, Yamamoto T, Kajiya F, Saruta T. Role of asymmetrical dimethylarginine in renal microvascular endothelial dysfunction in chronic renal failure with hypertension. *Hypertens Res* 28:181-189, 2005.
51. Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H3227-H3245, 2007.
52. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:906-911, 2007.
53. Zhang C, Hein TW, Wang W, Miller MW, Fossum TW, McDonald MM, Humphrey JD, Kuo L. Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension* 44:935-943, 2004.
54. Thengchaisri N, Hein TW, Wang W, Xu X, Li Z, Fossum TW, Kuo L. Upregulation of arginase by H₂O₂ impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2035-2042, 2006.

55. Li H, Meininger CJ, Hawker JR Jr, Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Morris SM Jr, Wu G. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E75-E82, 2001.
56. Chicoine LG, Paffett ML, Young TL, Nelin LD. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L60-L68, 2004.
57. Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A. Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 23:971-978, 2005.
58. Johnson FK, Johnson RA, Peyton KJ, Durante W. Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R1057-R1062, 2005.
59. Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol* 271:H1988-H1998, 1996.
60. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269:13725-13728, 1994.
61. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 86:347-354, 2000.
62. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97:1129-1135, 1998.
63. Kosmidou I, Moore JP, Weber M, Searles CD. Statin treatment and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2642-2649, 2007.
64. Janatuinen T, Laakso J, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimäki T, Raitakari OT, Knuuti J. Plasma asymmetric dimethylarginine modifies the effect of pravastatin on myocardial blood flow in young adults. *Vasc Med* 8:185-189, 2003.
65. Böger GI, Rudolph TK, Maas R, Schwedhelm E, Dumbadze E, Bierend A, Benndorf RA, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin: Effect of combination with oral L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 49:2274-2282, 2007.
66. Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Izumi Y, Kanmatsuse K, Esumi M. Association analysis of CA repeat polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *Clin Genet* 51:26-30, 1997.
67. Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S, Jones C, Lonn E, Charbonneau F, Anderson TJ. The T-786->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension* 39:919-922, 2002.
68. Lacolley P, Gautier S, Poirier O, Pannier B, Cambien F, Benetos A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens* 16:31-35, 1998.
69. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension* 33:933-936, 1999.
70. Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* 75:247-260, 2007.
71. Tsutsui M, Shimokawa H, Tanaka S, Kuwaoka I, Hase K, Nogami N, Nakanishi K, Okamoto S. Endothelial Gi protein in human coronary arteries. *Eur Heart J* 15:1261-1266, 1994.
72. Liao JK, Clark SL. Regulation of G-protein alpha i2 subunit expression by oxidized low-density lipoprotein. *J Clin Invest* 95:1457-1463, 1995.
73. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 42:271-279, 2007.
74. Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, Jo H. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1819-H1828, 2002.
75. Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H, Sessa WC. Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 278:14841-14849, 2003.
76. Long C, Cook LG, Hamilton SL, Wu GY, Mitchell BM. FK506 binding protein 12/12.6 depletion increases endothelial nitric oxide synthase threonine 495 phosphorylation and blood pressure. *Hypertension* 49:569-576, 2007.
77. Wagner L, Laczy B, Tamaskó M, Mazák I, Markó L, Molnár GA, Wagner Z, Mohás M, Cseh J, Fekete A, Wittmann I. Cigarette smoke-induced alterations in endothelial nitric oxide synthase phosphorylation: role of protein kinase C. *Endothelium* 14:245-255, 2007.
78. Michell BJ, Chen Zp, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276:17625-17628, 2001.

79. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88:68-75, 2001.
80. Li C, Ruan L, Sood SG, Papapetropoulos A, Fulton D, Venema RC. Role of eNOS phosphorylation at Ser-116 in regulation of eNOS activity in endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 47:257-264, 2007.
81. García-Cardeña G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 271:27237-27240, 1996.
82. Fulton D, Church JE, Ruan L, Li C, Sood SG, Kemp BE, Jennings IG, Venema RC. Src kinase activates endothelial nitric oxide synthase by phosphorylating Tyr-83. *J Biol Chem* 280:35943-35952, 2005.
83. Fulton D, Ruan L, Sood SG, Li C, Zhang Q, Venema RC. Agonist-Stimulated Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation and Vascular Relaxation. Role of eNOS Phosphorylation at Tyr83. *Circ Res* 102:497-504, 2008.
84. Ravi K, Brennan LA, Levic S, Ross PA, Black SM. S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2619-2624, 2004.
85. Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 274:32512-32519, 1999.
86. Williams TM, Lisanti MP. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med* 36:584-595, 2004.
87. Takahashi S, Mendelsohn ME. Calmodulin-dependent and -independent activation of endothelial nitric-oxide synthase by heat shock protein 90. *J Biol Chem* 278:9339-9344, 2003.
88. Takahashi S, Mendelsohn ME. Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem* 278:30821-30827, 2003.
89. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand JL, Feron O. Hsp90 ensures the transition from the early Ca^{2+} -dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem* 276:32663-32669, 2001.
90. Martínez-Ruiz A, Villanueva L, González de Orduña C, López-Ferrer D, Higuera MA, Tarín C, Rodríguez-Crespo I, Vázquez J, Lamas S. S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8525-8530, 2005.
91. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 278:22546-22554, 2003.
92. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111:1201-1209, 2003.
93. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Lüscher T, Rabelink T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 99:41-46, 1997.
94. Pieper GM. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. *J Cardiovasc Pharmacol* 29:8-15, 1997.
95. Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Lüscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* 101:1530-1537, 1998.
96. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, Münzel T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res* 86:36-41, 2000.
97. Ozkor MA, Quyyumi AA. Tetrahydrobiopterin. *Curr Hypertens Rep* 10:58-64, 2008.
98. Mitchell JA, Ventura HO, Mehra MR. Early recognition and treatment of hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol* 20:282-289, 2005.
99. Hattori Y, Nakanishi N, Akimoto K, Yoshida M, Kasai K. HMG-CoA reductase inhibitor increases GTP cyclohydrolase I mRNA and tetrahydrobiopterin in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:176-182, 2003.
100. Widder JD, Chen W, Li L, Dikalov S, Thöny B, Hatakeyama K, Harrison DG. Regulation of tetrahydrobiopterin biosynthesis by shear stress. *Circ Res* 101:830-838, 2007.
101. Howard AB, Alexander RW, Nerem RM, Griendling KK, Taylor WR. Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 272:C421-C427, 1997.
102. De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* 82:1094-1101, 1998.

- 103.** Bardy N, Merval R, Benessiano J, Samuel JL, Tedgui A. Pressure and angiotensin II synergistically induce aortic fibronectin expression in organ culture model of rabbit aorta. Evidence for a pressure-induced tissue renin-angiotensin system. *Circ Res* 79:70-78, 1996.
- 104.** Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 40:511-515, 2002.
- 105.** Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 90:58-65, 2002.
- 106.** McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H, Harrison DG. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2290-H2297, 2003.
- 107.** Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S, Fischer D, Manes C, Mueller M, Drexler H. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:943-948, 2007.
- 108.** Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba RS, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, Hess J, Görlach A. The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 38:616-630, 2005.
- 109.** Alvarez B, Demicheli V, Durán R, Trujillo M, Cerveñansky C, Freeman BA, Radi R. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. *Free Radic Biol Med* 37:813-822, 2004.
- 110.** Boulden BM, Widder JD, Allen JC, Smith DA, Al-Baldawi RN, Harrison DG, Dikalov SI, Jo H, Dudley SC Jr. Early determinants of H₂O₂-induced endothelial dysfunction. *Free Radic Biol Med* 41:810-817, 2006.