



## COMUNICACIÓN BREVE

# *Expresión vascular de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en la hipertensión arterial esencial*

**P. Gómez-Fernández, V. Sánchez-Margalet\*, A. Ruiz\*\*, F. García-Molina\*\*\*, J. Medina\*\*\* y M. Almaraz**

Unidad de HTA. Sección de Nefrología. Hospital del SAS. Jerez. \*Servicio de Bioquímica. Hospital del SAS, Virgen Macarena. Sevilla. \*\*Servicio de Análisis Clínicos \*\*\*Servicio de Cirugía. Hospital del SAS. Jerez.

### INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico (ON) procede de la oxidación de la L-arginina por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS). Dos de las isoformas de esta enzima, neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS), se expresan constantemente en diversos tejidos. La NOS inducible (iNOS) se expresa en varios tipos de células en respuesta a diferentes estímulos<sup>1,2</sup>.

La abundancia del ON depende del balance entre su producción y su destrucción. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), reaccionando con el ON, pueden disminuir su bioactividad<sup>3,4</sup>.

El ON participa en múltiples mecanismos que intervienen en la génesis y mantenimiento de la hipertensión arterial (HTA)<sup>2</sup>. En un estudio previo comprobamos que en la HTA esencial sal sensible existe una incapacidad para aumentar la excreción urinaria de metabolitos de ON tras la ingesta de sodio<sup>5</sup>.

Con el objetivo de estudiar la participación de la síntesis de ON en la HTA, en este trabajo determinamos la expresión de la eNOS en la arteria cística de sujetos con HTA esencial.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Estudiamos 11 sujetos (9 mujeres, 2 hombres), de una edad de  $55 \pm 3$  años, diagnosticados de HTA

esencial. Ninguno tenía diabetes mellitus ni otras enfermedades sistémicas. Todos recibían terapia antihipertensiva con diuréticos (8 enfermos) y/o betabloqueantes (3 enfermos). No recibían ningún otro tipo de medicación. No se incluyeron enfermos en terapia con calcioantagonistas, bloqueantes del sistema renina-angiotensina ni inhibidores de la HMGCoA reductasa. Todas las mujeres eran postmenopáusicas. Ningún enfermo fumaba desde al menos 1 año antes.

Los enfermos eran ingresados para colecistectomía laparoscópica programada por coledocistitis. El día del ingreso se extraía sangre para determinaciones analíticas. Durante la intervención se tomaba una muestra de la arteria cística que era mantenida en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Como grupo control se estudiaron 16 sujetos normotensos, de una edad de  $50 \pm 0,9$  años, 12 mujeres postmenopáusicas y 4 hombres, no fumadores sometidos a colecistectomía laparoscópica por coledocistitis que no recibían ningún tipo de medicación. Todos los sujetos fueron sometidos a la misma técnica anestésica.

Para la determinación de la expresión de la NOS, tras la homogenización de la muestra se centrifuga y se determina la concentración de proteínas. Tras separación electroforética, las proteínas se electrotransfieren a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea con leche descremada y se incuba con el anticuerpo monoclonal específico para cada isoforma de NOS (Transducción laboratorios, BD Biosciences, San José, CA, USA). Tras lavar la membrana se incuba con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. Finalmente se incuba con un sustrato quimioluminiscente y se expone una película radiográfica. Las bandas se escanean y se analizan las densidades ópticas por el programa PCBAS.

Para el análisis estadístico se usó el Mann Whitney para las diferencias entre las variables cuantitativas, y el Chi cuadrado para las cualitativas. La relación entre las variables se hizo por regresión simple y se

Recibido: 16-I-2004.

En versión definitiva: 31-V-2004.

Aceptado: 31-V-2004.

**Correspondencia:** Dr. Pablo Gómez Fernández  
Servicio de Nefrología  
Hospital General del SAS  
Ctra. Circunvalación, s/n  
11407 Jerez (Cádiz)

usó el análisis de la covarianza para ajustes a variables no controladas. Los resultados se expresan como  $X \pm ES$ . Valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativos.

## RESULTADOS

No existieron diferencias en la edad, sexo ni índice de masa corporal entre los dos grupos. Los valores de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) y los parámetros analíticos se expresan en la tabla I. Los valores de ácido úrico, colesterol y triglicéridos fueron significativamente más elevados en el grupo con HTA. No existieron diferencias significativas en la expresión de la eNOS ( $594 \pm 7$  vs  $597 \pm 12$ ). La expresión vascular de la eNOS fue, sin embargo, más baja en el grupo con HTA ( $337 \pm 15$  vs  $409 \pm 5$  u,  $p < 0,01$ ) (fig. 1). Se objetivó una correlación inversa entre la expresión de eNOS y los niveles de triglicéridos ( $r: -0,27$ ,  $p < 0,01$ ). Tras el ajuste a la trigliceridemia, persistieron las diferencias de la eNOS entre los dos grupos. No existió correlación entre los valores eNOS y los de la presión arterial y otros parámetros bioquímicos.

## DISCUSIÓN

El ON ejerce múltiples efectos vasculoprotectores. Además de ser un agente antiateroscleroso, por sus acciones vasodilatadores y natriuréticas interviene en el control de la PA<sup>1,2</sup>. En la HTA hay disfunción endotelial y, como ocurre en animales de experimentación, los sujetos con HTA sensible pueden tener una disminución de la bioactividad de ON<sup>5,6</sup>.

La disminución de la biodisponibilidad del ON puede ser el resultado de una menor producción,

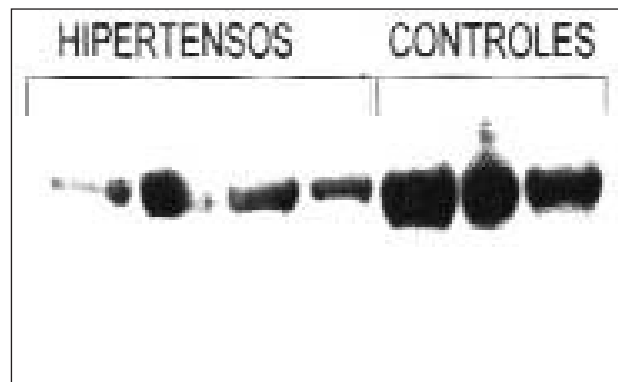


Fig. 1.—Ejemplos (immunoblot) representativos de eNOS en sujetos control e hipertensos.

de un aumento de su degradación o de ambos mecanismos. En la HTA puede haber un elevado estrés oxidativo<sup>3,4</sup>. El anión superóxido resultante puede reaccionar con el ON, inactivándolo. En el presente trabajo, comprobamos que una menor expresión de la eNOS también podría participar en la disminución de síntesis de ON en la HTA esencial. Dado que pueden existir diferencias en la expresión de la eNOS en los diversos territorios vasculares<sup>7</sup>, es posible que los hallazgos de la arteria cística no reflejen exactamente lo que ocurre a nivel sistémico. Se ha elegido esta arteria por la facilidad de obtención al aprovechar la cirugía programada. Por otra parte, los grupos estudiados tenían las mismas características (edad, sexo, índice de masa corporal y tabaquismo). Por ello consideramos que el análisis de los hallazgos de la arteria cística permite una comparación objetiva.

No está clara la causa de una disminución de la expresión de la eNOS en la HTA esencial. Teóricamente, podría ser debido a mecanismos pretranscripcionales, postranscripcionales o ambos. Diversas citocinas proinflamatorias como el factor de transcripción nuclear ( $TNF\alpha$ ) pueden disminuir la estabilidad de mRNA de la eNOS<sup>8</sup>. También las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox) ejercen una retroregulación negativa de la eNOS a nivel postranscripcional<sup>9</sup>. En la HTA pueden existir niveles elevados de citocinas y de LDL-ox<sup>10,11</sup>. En nuestro estudio existieron diferencias en diversos parámetros metabólicos lipídicos entre los sujetos hipertensos y el grupo control. Se objetivó una correlación negativa entre eNOS y triglicéridos. La diferencia de eNOS entre los grupos, sin embargo, persistió tras ajuste a los niveles de triglicéridos. Deben existir otros factores no definidos que contribuyen a la disminución de la expresión de eNOS.

Tabla I.

	HTA (n: 11)	Control (n: 15)	p
IMC ( $k/m^2$ )	$28 \pm 0,9$	$27 \pm 0,9$	ns
PAS	$154 \pm 2,6$	$121 \pm 2,4$	$< 0,001$
PAD	$94 \pm 1$	$73 \pm 2$	$< 0,001$
Hb (g/dl)	$13,2 \pm 0,1$	$13 \pm 0,1$	ns
Creatinina (mg/dl)	$1,1 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,04$	ns
Ácido úrico (mg/dl)	$5,9 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,2$	$< 0,05$
Colesterol (mg/dl)	$234 \pm 6$	$206 \pm 10$	$< 0,01$
Triglicéridos (mg/dl)	$148 \pm 3,5$	$115 \pm 3$	$< 0,01$
eNOS (u)	$330 \pm 12$	$409 \pm 5$	$< 0,001$

IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica. eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial.

En resumen, nuestros hallazgos sugieren que en la disminución de la biodisponibilidad de ON que se ha descrito en la HTA interviene, además de un aumento de la degradación de ON por ROS, un posible descenso de su síntesis secundario a una menor expresión de la eNOS.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Moncada S, Higs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993.
2. Cooke JP, Dzau VJ: Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 48: 489-509, 1997.
3. Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 5: C1424-1437, 1996.
4. Taniyama Y, Griendling KK: Reactive oxygen species in the vasculature. *Hypertension* 42: 1075-1081, 2003.
5. Gómez-Fernández P, Moreno VG, Cornejo M, Vargas JC, García-Barroso C, Velasco G, Almaraz M: Perfil hormonal y participación del óxido nítrico en la hipertensión arterial esencial «sal sensible» y «sal resistente». *Nefrología* 20: 415-423, 2000.
6. Jhon S, Schmieder RE: Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and difference. *J Hypertens* 18: 363-374, 2000.
7. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA: Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 11: 2479-2488, 1997.
8. Lai PF, Mohamed F, Monge JC, Stewart DJ: Downregulation and functional characterization of RNA-protein interaction in the 3'UTR. *Cardiovasc Res* 59: 160-168, 2003.
9. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL: Oxidized Low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270: 319-324, 1995.
10. Demirbas B, Guler S, Cakir B, Culha C, Aral Y: Plasma tumor necrosis factor-alpha levels and insulin resistance in nondiabetic hypertensive subjects. *Horm Res* 58: 283-286, 2002.
11. Frostegard J, Wu R, Lemne C, Thulin T, Witztum JL, De Faire U: Circulating oxidized low density lipoprotein is increased in hypertension. *Clin Sci* 105: 615-620, 2003.