



Estrés oxidativo en la hipertensión: de los SNPs al fenotipo clínico

G. Zalba¹, A. Fortuño¹, G. San José¹, M. U. Moreno¹, S. Oliván¹, O. Beloqui² y J. Díez^{1,3}

¹Departamento de Fisiopatología Cardiovascular. Facultad de Medicina. Fundación para la Investigación Médica Aplicada. ²Departamento de Medicina Interna y ³Departamento de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona. España.

El metabolismo oxidativo de las células vasculares es capaz de generar, a partir del oxígeno molecular, diferentes especies reactivas del oxígeno. Una mayor producción de especies reactivas del oxígeno, entre las que cabe destacar el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), favorece un estrés oxidativo en la pared vascular en el contexto de las patologías cardiovasculares, incluida la hipertensión¹. Entre otros efectos, el $\cdot\text{O}_2^-$ disminuye la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), un gas críticamente implicado en la regulación del tono vascular y en la inhibición de la agregación plaquetaria, la formación de trombos, la adhesión leucocitaria y la proliferación vascular. Además, la reacción entre el $\cdot\text{O}_2^-$ y el NO genera peroxinitrito, una sustancia muy oxidante capaz de ocasionar un daño celular importante como consecuencia de la oxidación de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos².

SISTEMA DE LA NAD(P)H OXIDASA

De entre las fuentes enzimáticas implicadas en la fisiopatología de la hipertensión destaca la NAD(P)H oxidasa, una enzima presente en las células endoteliales, las células de músculo liso vascular y en los fibroblastos, como la principal fuente de $\cdot\text{O}_2^-$ en la pared del vaso³. Esta oxidasa es una enzima unida a membrana, muy similar a la NADPH oxidasa de las células fagocíticas, que cataliza la reducción de un único electrón desde el oxígeno molecular para generar el $\cdot\text{O}_2^-$. La estructura de este complejo enzimático consiste en un citocromo b_{558} asociado a membrana, dos componentes citosólicos $p47^{\text{phox}}$ y $p67^{\text{phox}}$, y una pequeña proteína G. El citocromo b_{558} , que es el transportador final del electrón del NAD(P)H al oxígeno molecular, consiste en dos su-

bunidades, una grande y la otra pequeña, denominadas $gp91^{\text{phox}}$ y $p22^{\text{phox}}$ respectivamente⁴. Mediante el empleo de aproximaciones experimentales con tecnología antisentido y de *knockout* se ha demostrado el papel esencial que las subunidades $p22^{\text{phox}}$, $gp91^{\text{phox}}$ y $p47^{\text{phox}}$ desempeñan en la funcionalidad de la NAD(P)H oxidasa.

La NAD(P)H oxidasa vascular es una enzima constitutiva que puede ser regulada por factores humorales, como la angiotensina II, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento tumoral α y los glucocorticoides, y por factores hemodinámicos que incluyen la tensión longitudinal y oscilatoria⁵. Además, el propio condicionamiento genético puede desempeñar un papel crítico en la regulación de la expresión de la NAD(P)H oxidasa³.

LA NAD(P)H OXIDASA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN GENÉTICA: LA RATA SHR

Un aumento en la generación de $\cdot\text{O}_2^-$ dirigido por la NAD(P)H oxidasa se ha asociado con una hiperexpresión del ARNm de $p22^{\text{phox}}$ en diversos modelos experimentales de hipertensión, incluido el modelo genético de la rata espontáneamente hipertensa (SHR)³. En la rata SHR, la expresión del ARN mensajero de $p22^{\text{phox}}$ y la actividad NAD(P)H oxidasa se normalizan cuando las ratas son tratadas con un antagonista de los receptores AT_1 ⁶, lo que sugiere que la angiotensina II desempeña un papel central en la activación de esta oxidasa.

Por otra parte, cambios en la secuencia del gen $p22^{\text{phox}}$ pueden modular el control de la expresión de dicho gen. Nuestro grupo ha caracterizado recientemente la estructura completa del gen $p22^{\text{phox}}$ en rata. De hecho, en el mismo trabajo identificamos cinco polimorfismos funcionales en la rata SHR⁷, que confieren una mayor actividad transcripcional al promotor del gen $p22^{\text{phox}}$, y que por tanto pueden estar implicados en la mayor expresión de $p22^{\text{phox}}$ observada en la aorta de la rata SHR (fig. 1).

Correspondencia: Guillermo Zalba
Departamento de Fisiopatología Cardiovascular
Facultad de Medicina
Irunlarrea, 1
31008 Pamplona
E-mail: gzalba@unav.es

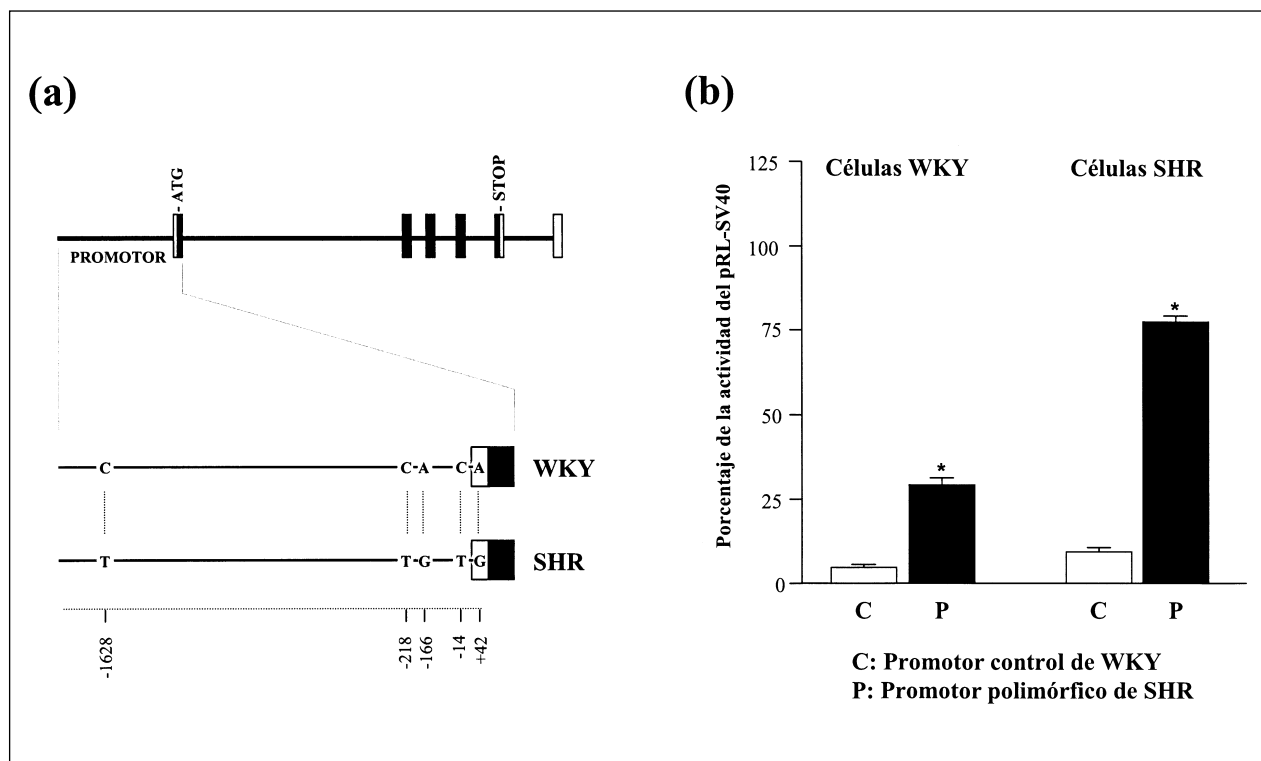


Fig. 1.—(a) Estructura genómica del gen p22^{phox} de rata e identificación de las diferencias alélicas existentes entre los promotores de la rata Wistar-Kyoto (WKY) y de la rata espontáneamente hipertensa (SHR). (b) Experimentos de transfección con el promotor control de WKY (C) y el promotor polimórfico de SHR (P) en células de músculo liso provenientes de ratas WKY y SHR. Los valores representan la media \pm EEM de diez determinaciones (*p < 0,05 comparado con el promotor control WKY) (adaptada de la referencia 7).

LA NAD(P)H OXIDASA EN LA HIPERTENSIÓN ESENCIAL HUMANA

Diversos estudios clínicos han descrito que en los pacientes con hipertensión esencial se producen incrementos considerables en la generación de $\cdot\text{O}_2^{-}$ ^{8,9}. Recientemente se ha descrito una mayor generación de especies reactivas del oxígeno en las CMLV provenientes de arterias periféricas asociada con un aumento en la actividad de la NAD(P)H oxidasa vascular en pacientes con hipertensión esencial¹⁰. Además, varios trabajos han descrito un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno en células fagocíticas provenientes de pacientes con hipertensión esencial^{11,12}. Más aún, un estudio reciente muestra que el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno en líneas celulares linfoblásticas obtenidas de pacientes con hipertensión esencial es consecuencia de una mayor expresión de la subunidad p22^{phox}¹³.

El gen humano que codifica la subunidad p22^{phox} posee diversas variantes alélicas, algunas de las cuales se han asociado recientemente con la enfermedad cardiovascular. En concreto, el polimorfismo C242T del gen p22^{phox} posee un efecto funcional en la producción vascular de $\cdot\text{O}_2^{-}$ dependiente de la NAD(P)H oxidasa de pacientes con aterosclerosis¹⁴. Otro grupo ha demostrado una asociación del polimorfismo A640G con la presencia y la extensión de la enfermedad coronaria, que es más acentuada en los pacientes hipertensos que en los individuos normotensos¹⁵. Estos trabajos sugieren un posible papel de los polimorfismos del gen p22^{phox} en el aumento de la producción de $\cdot\text{O}_2^{-}$ dependiente de la NAD(P)H oxidasa asociado con el desarrollo de la aterosclerosis en el contexto de la hipertensión arterial.

Recientemente, nuestro grupo ha caracterizado el promotor del gen humano p22^{phox}¹⁶. El análisis de la secuencia del gen p22^{phox} en un grupo de pacientes con hipertensión arterial nos ha permitido

identificar un nuevo polimorfismo localizado en el promotor de dicho gen, el polimorfismo $-930^{A/G}$, que se encuentra asociado con la hipertensión esencial¹⁷. En el mismo estudio, los resultados obtenidos en experimentos de mutagénesis dirigida sugieren que el alelo G de dicho polimorfismo se asocia con una mayor actividad transcripcional en presencia de un fenotipo hipertensivo (fig. 2). En concordancia con estos datos, una caracterización preliminar de dicho polimorfismo nos ha permitido confirmar como la presencia del genotipo GG se asocia con una mayor expresión del gen $p22^{phox}$ y una mayor actividad de la NAD(P)H oxidasa GG en los pacientes con hipertensión esencial¹⁷. Es interesante resaltar que los pacientes hipertensos GG se asocian también con fenotipos clínicos, y más concretamente con valores significativamente más altos del factor von Willebrand, un marcador de daño endotelial y de riesgo de accidente aterotrombótico, cuya secreción está regulada por numerosos mediadores de trombosis y de inflamación, incluido el propio $\cdot O_2^-$.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La hipertensión arterial se encuentra asociada con un aumento en la producción vascular de especies reactivas del oxígeno, principalmente el $\cdot O_2^-$. Una hiperactividad de la NAD(P)H oxidasa puede estar implicada en dicha patología de forma crítica, desempeñando un papel importante en la disfunción endotelial y en la hipertrofia vascular características de la hipertensión. Ciertos polimorfismos presentes en el promotor del gen de la $p22^{phox}$ pueden desempeñar un papel crítico en la regulación de la producción de $\cdot O_2^-$ dependiente de la NAD(P)H oxidasa, por lo que pueden ser empleados como marcadores de enfermedad cardiovascular mediada por el estrés oxidativo en los pacientes hipertensos.

AGRADECIMIENTOS

A Raquel Ros y Ana Montoya, por la asistencia técnica en el laboratorio.

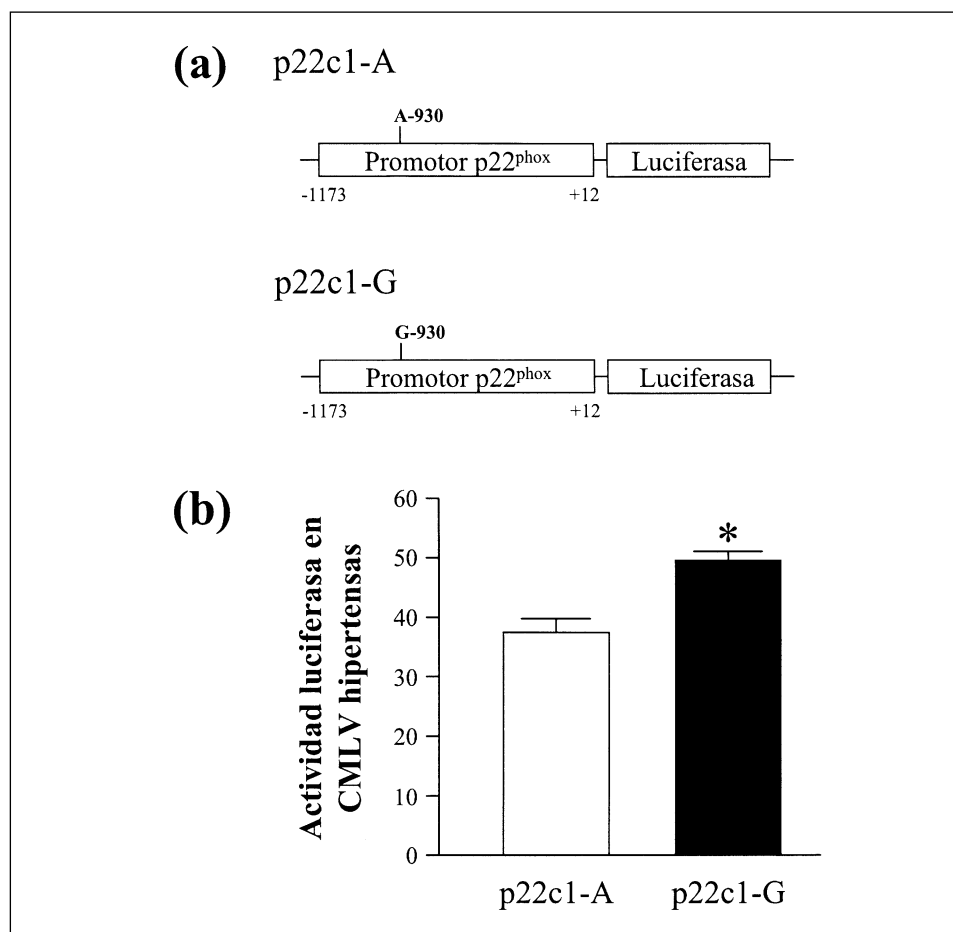


Fig. 2.—(a) Representación esquemática de las construcciones quiméricas de las dos variantes alélicas del polimorfismo $-930^{A/G}$ del promotor $p22^{phox}$ y el gen de la luciferasa. (b) Niveles de luciferasa en las células de músculo liso vascular de SHR transfectadas con las dos construcciones alélicas A (p22c1-A) o G (p22c1-G). Los datos muestran la media \pm EEM de seis experimentos (* $p < 0,05$ comparado con p22c1-A) (adaptada de la referencia 16).

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander RW: Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 25: 155-161, 1995.
2. Kojda G, Harrison DG: Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43: 562-571, 1999.
3. Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont FJ, Díez J: Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 38: 1395-1399, 2001.
4. Lassegue B, Clempus RE: Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R277-297, 2003.
5. Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501, 2000.
6. Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J: Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35: 1055-1061, 2000.
7. Zalba G, San José G, Beaumont FJ, Fortuño MA, Fortuño A, Díez J: Polymorphisms and promoter overactivity of the p22^{phox} gene in vascular smooth muscle cells from SHR. *Circ Res* 88: 217-222, 2001.
8. Mehta JL, López LM, Chen L, Cox OE: Alterations in nitric oxide synthase activity, superoxide anion generation, and platelet aggregation in systemic hypertension, and effects of celiprolol. *Am J Cardiol* 74: 901-905, 1994.
9. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW: Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 16: 291-303, 1998.
10. Touyz RM, Schiffrin EL: Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 19: 1245-1254, 2001.
11. Sagar S, Kallo IJ, Kaul N, Ganguly NK, Sharma BK: Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem* 111: 103-108, 1992.
12. Kumar KV, Das UN: Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun* 19: 59-66, 1993.
13. Pettit AI, Wong RKM, Lee V, Jennings S, Quinn PA, Ng LL: Increased free radical production in hypertension due to increased expression of the NADPH oxidase subunit p22^{phox} in lymphoblast cell lines. *J Hypertens* 20: 677-683, 2002.
14. Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Chanon KM: Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22^{phox} gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 102: 1744-1747, 2000.
15. Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W: The p22^{phox} A650G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 145: 315-323, 1999.
16. Moreno MU, San José G, Orbe J, Páramo JA, Beloqui O, Díez J, Zalba G: Preliminary characterisation of the promoter of the human p22^(phox) gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS Lett* 542: 27-31, 2003.
17. Moreno MU, Fortuño A, San José G, Ros R, Montoya A, Beloqui O, Díez J, Zalba G: Enhanced p22^{phox} expression is associated with a greater NADPH oxidase-dependent superoxide production in essential hypertension. *Hypertension* 42: 639 (Abstract), 2003.