

Interacciones de las células del entorno vascular: regulación por el óxido nítrico

A. López-Farré*, T. De Frutos, L. Sánchez de Miguel, F. González-Fernández, M. Montón, M. García-Durán, J. A. Rodríguez, J. I. Guerra, I. Millás, T. Bellver, L. Rico, J. Gómez y S. Casado.

Laboratorio de Nefrología. Hipertensión e Investigación Cardiovascular. Fundación Jiménez Díaz.

La célula endotelial forma una monocapa que limita la interacción de las células de la sangre con las células musculares lisas subyacentes al endotelio. En estado fisiológico, la célula endotelial libera una serie de agentes vasoactivos capaces de regular la relación y función de estas células con el resto de las células que componen el microentorno vascular como son las células de la sangre y las células del músculo liso vascular. En los últimos años, entre los distintos agentes vasoactivos liberados por el endotelio ha adquirido una gran relevancia el óxido nítrico (NO). El NO es un gas que se le ha implicado como pieza clave en la relación multicelular de los componentes del «hábitat» vascular. Así, el NO participa en la regulación del flujo sanguíneo, la relajación y proliferación de las células de músculo liso vascular, la agregación y adhesión de plaquetas y leucocitos al vaso y más recientemente la modulación de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular¹⁻³. Es importante recordar que todos estos procesos están de una u otra forma activados en la mayoría de las patologías de origen vascular.

En esta revisión analizaremos en primer lugar el papel del NO en la interacción de las plaquetas con neutrófilos y células endoteliales. En la segunda parte de esta breve revisión analizaremos la implicación que tiene la célula de músculo liso vascular en la génesis de la disfunción endotelial.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

El mejor conocimiento sobre los mecanismos de interacción de las células que componen el microentorno vascular (plaquetas, neutrófilos, células endoteliales, músculo liso, monocitos, linfocitos... etc.) puede desvelar nuevos aspectos patogénicos acer-

ca de procesos vasculares como la aterosclerosis, isquemia miocárdica y disfunción endotelial.

La adhesión de las plaquetas al subendotelio, su agregación y reclutamiento, propicia la formación de un trombo. En los últimos años, se ha demostrado que la trombosis vascular es un proceso en que intervienen múltiples células, participando de manera directa no sólo las plaquetas, sino también otros elementos celulares tales como las células del endotelio vascular y elementos formes circulantes, como los neutrófilos; el papel de los neutrófilos en la formación y crecimiento del trombo es todavía controvertido.

FORMACION DEL TROMBO

Cuando la continuidad endotelial en un vaso está interrumpida, o el endotelio es disfuncionante y ha perdido sus propiedades antitrombóticas, las plaquetas se adhieren a la pared endovascular. Para iniciarse el proceso de adhesión plaquetaria es preciso que estos elementos formes circulantes sean, en cierto modo, frenados. El mecanismo íntimo de este proceso de frenado es enormemente complejo y sólo parcialmente conocido en el momento actual. La iniciación de la formación de un trombo cuando hay solución de continuidad endotelial es mejor comprendida que cuando existe sólo disfunción endotelial o ante superficies artificiales como son las prótesis valvulares cardíacas. En estas dos últimas situaciones, es posible que proteínas circulantes, como el fibrinógeno, sean absorbidas por tales superficies (el endotelio disfuncionante o el material protésico) iniciándose así la interacción (y adhesión) plaquetaria.

En el proceso de adhesión intervienen factores que actúan desde la superficie dañada o disfuncionante, bien frenando directamente las plaquetas circulantes o haciendo que éstas expresen proteínas frenadoras en su superficie, que comúnmente se engloban dentro del concepto de proteínas de adhesión. Entre estas proteínas frenadoras cabe destacar a una fa-

Correspondencia: Dr. A. López-Farré
Fundación Jiménez Díaz
Avda. Reyes Católicos, 2
28040 Madrid

milia de proteínas denominadas selectinas, de las que se han descrito tres miembros (E, L y P)⁴. La P-selectina se encuentra en los gránulos alfa de las plaquetas y también en los cuerpos de Palade de las células endoteliales. La expresión en la superficie plaquetaria de la P-selectina se produce en el curso del proceso de degranulación trombocitaria inducido por múltiples factores como el colágeno, la epinefrina, el ADP... etc.

Las plaquetas, al adherirse a la pared vascular (el endotelio, si éste es disfuncionante, o a la matriz subendotelial, si hubo pérdida de continuidad endotelial) liberan agentes protrombóticos, vasoactivos, y quimiotácticos respecto a la práctica totalidad de las células circulantes en la sangre, lo que da lugar a la formación y crecimiento del trombo. La interacción entre la plaqueta y otros elementos celulares (incluidos otros trombocitos) se lleva a cabo a través de distintas proteínas de adhesión y agregación expresadas en la superficie de la membrana trombocitaria. El término adhesión se refiere a la unión de la plaqueta con cualquier otra célula que no sea un trombocito. El término agregación, sin embargo, se refiere exclusivamente, a la unión plaqueta-plaqueta. Cuando hay falta de continuidad endotelial, la adhesión parece depender de la interacción entre diversas glicoproteínas de la membrana plaquetaria y componentes de la matriz subendotelial. Entre tales glicoproteínas se encuentran la Ia y Ib que intervienen en los mecanismos de adhesión y la IIb-IIIa que participa en el proceso de adhesión y agregación. Así, la glicoproteína (GP) IIb-IIIa es un complejo que permite agregar entre sí plaquetas a través de fibrinógeno, fibronectina y el llamado factor von Willebrand, o adherir plaquetas a la pared vascular a través del von Willebrand o la fibronectina⁵.

PAPEL DEL NEUTROFILO EN LA REGULACION DE LA AGREGACION DE LAS PLAQUETAS

El efecto antiagregante plaquetario del ácido acetilsalicílico no puede explicarse únicamente por el conocido mecanismo de la inhibición de la ciclooxigenasa trombocitaria. Así, nuestro laboratorio ha puesto de manifiesto recientemente que el ácido acetilsalicílico también ejerce un potente efecto antiagregante plaquetario estimulando en los neutrófilos la liberación de NO⁶.

Nuestros experimentos *in vitro* demostraron que en presencia de ácido acetilsalicílico, los neutrófilos inhiben la agregación de las plaquetas en respuesta a distintos estímulos de la agregación plaquetaria⁷. En ausencia de neutrófilos, el ácido acetilsalicílico no varió la respuesta agregante de las plaquetas a la

trombina. El efecto antiagregante plaquetario de la combinación aspirina-neutrófilo no sólo se produjo al utilizar como activador de las plaquetas trombina. Aunque la aspirina, *per se* tuvo un cierto efecto antiagregante plaquetario al activar las plaquetas con ADP o epinefrina, este efecto se potenció en presencia de neutrófilos, indicando que la inhibición de la agregación plaquetaria mediada por los neutrófilos en presencia de aspirina se modificó a nivel post-receptor⁷. Hemos obtenido resultados similares con plaquetas y neutrófilos aislados de voluntarios sanos a quienes se había administrado una dosis diaria de 200 mg de ácido acetilsalicílico por vía oral, durante 4 días. Antes de tomar ácido acetilsalicílico, los neutrófilos de estos voluntarios no modificaron la agregación de las plaquetas en respuesta a trombina; sin embargo, tras 4 días de tratamiento con ácido acetilsalicílico, los neutrófilos inhibieron de forma significativa la agregación de las plaquetas⁷.

Al igual que la célula endotelial, el neutrófilo tiene la maquinaria enzimática necesaria para generar de forma constitutiva NO. El efecto antiagregante plaquetario de los neutrófilos, en presencia de aspirina, se bloqueó mediante el empleo de antagonistas específicos de la formación de NO por el neutrófilo. En presencia de aspirina, la generación de NO por parte del neutrófilo se incrementó al igual que la formación de GMPc en el sistema neutrófilo-aspirina-plaqueta. Estos resultados demuestran la implicación del sistema NO-GMPc como responsable de las propiedades antiagregantes plaquetarias de los neutrófilos en presencia de aspirina y añaden una vía nueva por la que interpretar el efecto protector de la aspirina en el daño isquémico⁷.

PAPEL DEL NO EN LA DISFUNCION VASORRELAJANTE DEPENDIENTE DEL ENDOTELIO

En el momento actual se define la disfunción endotelial como una falta de respuesta vasodilatadora a través de los mecanismos dependientes del NO. La causa de esta deficiente capacidad vasorrelajante se ha intentado atribuir a una inadecuada producción de NO por las células endoteliales que tapizan la luz vascular. La hipertensión, la arteriosclerosis, la isquemia miocárdica o renal, la edad, la menopausia y el neoendotelio formado tras un proceso de desendotelización mediante angioplastia son procesos en los que se ha demostrado la existencia de disfunción endotelial⁸⁻¹⁰.

La disfunción endotelial ocurre de forma precoz al desarrollo de la enfermedad detectándose la exis-

tencia de disfunción endotelial en arterias angiográficamente normales¹¹.

Para conocer los mecanismos inducidos en la disfunción endotelial previamente hay que conocer como se genera el NO en la pared vascular. El NO se genera mediante el paso metabólico del aminoácido L-arginina el aminoácido L-citrulina mediante la actividad de unas enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS)¹¹.

En el endotelio existe una NOS endotelial (NOSe). La actividad de esta enzima genera pequeñas cantidades de NO en período de tiempos cortos y es dependiente del calcio^{1,12}. Este NO generado mediante la actividad NOSe es el responsable principal de la respuesta vasorrelajante dependiente de endotelio¹³.

Se ha demostrado que las células de músculo liso vascular (CMLV) no sólo responden a NO sino que también son capaces de producirlo. La estimulación de las CMLV con mediadores inflamatorios específicos, como por ejemplo, la interleuquina-1 β (IL-1 β), induce la liberación de NO por estas células debida al aumento de expresión de una isoforma inducible de (NOSi)¹⁴. La actividad de NOSi requiere varias horas de exposición de las CMLV a IL-1 β , y una vez activada genera cantidades elevadas de NO durante largos períodos de tiempo^{15,16}. Se ha propuesto que la NOSi es inducida en gran variedad de enfermedades cardiovasculares relacionadas con procesos inflamatorios como por ejemplo infarto de miocardio, shock séptico o aterosclerosis^{17,18}, en los que citoquinas como IL-1 β y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) se encuentran presentes¹⁹.

A pesar de que estas citoquinas estimulan la producción de NO por la actividad de NOSi, varios artículos han demostrado recientemente que la respuesta hipotensiva relacionada con la actividad de NOSe podría ser inhibida por las mismas citoquinas que actúan aumentando la expresión de NOSi. En este sentido, se ha demostrado que la vasodilatación dependiente de la actividad de NOSe está disminuida en arterias ateroscleróticas mientras que el NO liberado se encuentra considerablemente aumentado^{20,21}.

Siguiendo esta misma línea, en nuestro laboratorio consideramos la posibilidad de que el NO generado por las CMLV podrían modificar la expresión de NOSe de las células endoteliales.

Utilizando un sistema de cocultivos de CMLV y células endoteliales encontramos que cuando las CMLV expresan NOSi, mediante estimulación por IL-1 β , las células endoteliales tienen una disminución significativa de la expresión de NOSe. La expresión de NOSe se preservó al añadir un antagonista de la formación de NO.

Sin embargo, cuando se añadieron de forma directa dadores de NO sobre el endotelio en cultivo la expresión de NOSe no se modificó. Estos resultados nos indicaron la importancia que tenía la presencia de CMLV para que el NO disminuyera la expresión de NOSe. La hipótesis siguiente fue por lo tanto que el NO liberado por las CMLV estimuladas con IL-1 β podría actuar sobre las propias CMLV haciendo que estas liberaran un factor difusible que sería el responsable último de la disminución de la expresión de NOSe en las células endoteliales.

En la pared vascular, las CMLV son una fuente local de citoquinas y entre ellas de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)²². El TNF- α es uno de los contribuyentes sustanciales de la respuesta inflamatoria dentro del microambiente de la pared vascular.

Se ha demostrado que el TNF- α disminuye la expresión de NOSe en las células endoteliales²³, por lo que el TNF- α se propuso como mediador involucrado en los efectos del NO liberado por las CMLV sobre la expresión de NOSe en las células endoteliales. La adición de un anticuerpo policlonal anti-TNF- α en el cultivo de las células endoteliales y de CMLV impidió la inhibición que las CMLV tratadas con IL-1 β ejercen sobre la expresión de NOSe en las células endoteliales (fig. 1).

En el mismo sentido de nuestros resultados, distintos estudios han demostrado que la respuesta vasodilatadora dependiente de agonistas, por lo tanto relacionada con la actividad NOSe, está sustancialmente disminuida en la endotoxemia. Esta situación patológica se acompaña de un aumento de la actividad NOSi en las CMLV de la pared. En la misma línea de evidencias, Minor y cols., demostraron una disminución de la vasorrelajación dependiente del endotelio en conejos hipercolesterolémicos, lo cual se acompañó de un aumento en la liberación de NO por la pared del vaso lo que podría indicar la expresión de la isoforma NOSi²⁴.

Por último, nos quedaba analizar por qué mecanismo el TNF- α disminuía la expresión de NOSe en las células endoteliales. La regulación de la estabilidad del ARNm ha comenzado a demostrarse como uno de los principales mecanismos de control de los niveles celulares de ARNm. Parece probado que, en cada caso, secuencias específicas contenidas en cada ARNm están involucradas en la regulación de su vida media. Estas secuencias se llaman elementos cis²⁵.

Algunos elementos cis se han identificado en la región 3' que no se traducen en proteína (3'-UTR)²⁶. Las regiones 3'-UTR interaccionan como factores trans (proteínas reguladoras) que pueden afectar la vida media de los ARNm. En este sentido, la región 3'-UTR del ARNm del receptor de la transferrina constituye el

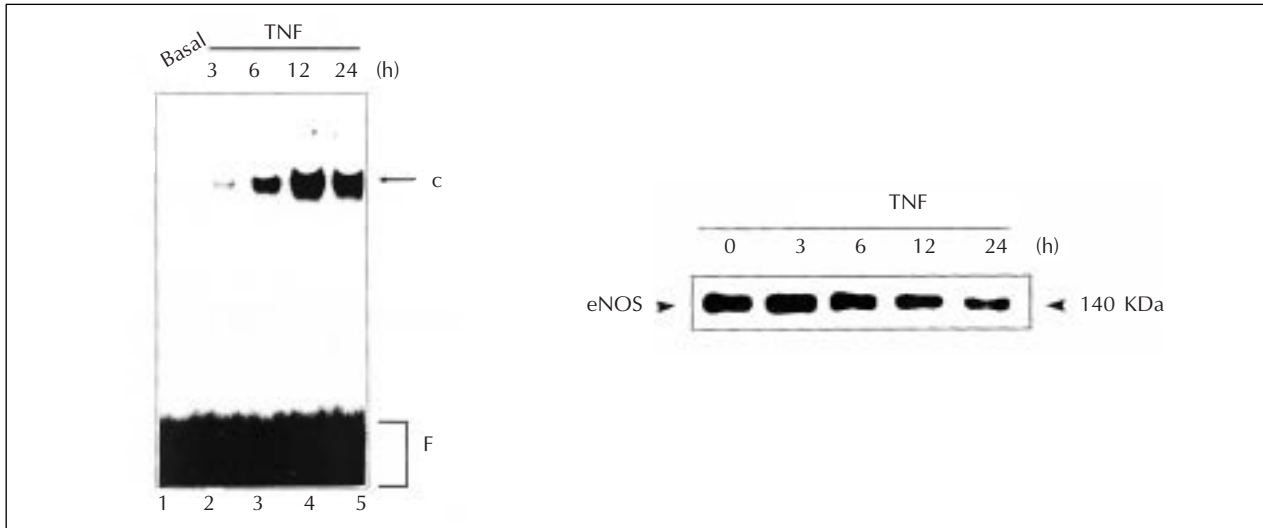


Fig. 1.—Regulación de la proteína citosólica endotelial que degrada el ARNm de la NOSe. Las células endoteliales se estimularon con TNF- α (10 mg/ml) durante diferentes tiempos se extrajo su citosol. Este se analizó mediante gels de retardo utilizando una sonda marcada en la región 3'-UTR del ARNm de la NOSe. Se encontró que el citosol de estas células tenían una proteína que se unía a esta región 3'-UTR. La actividad de esta proteína estaba incrementada al estimular las células endoteliales con TNF- α , encontrándose la máxima actividad a las 12 h después de la incubación (panel A). Estos efectos se correlacionaron con una disminución significativa de la proteína de NOSe (panel B). Abreviaturas: C = complejo de unión de la proteína con la sonda 3'-UTR marcada. F = Frente (sonda marcada no unida a la proteína).

ejemplo más conocido del control de la vida media del ARNm mediante la unión de factores trans²⁷. Otros ejemplos son las secuencias AUUUA encontradas en los 3'-UTR de muchos ARNm como aquellos que codifican a pro-oncogenes, citoquinas y linfoquinas^{25,28}.

El ARNm de la NOSe es muy estable, con una vida media de alrededor de 48 horas. El ARNm de la NOSe tiene una región 3'-UTR. Nosotros también hemos recientemente demostrado que el ARNm de la NOSe contiene elementos de unión de proteínas en su región 3'-UTR²⁹.

Hemos identificado que existe una proteína citosólica en el endotelio en cultivo que se une a la región cis, en concreto a 38 bases ricas en UC, y que la unión de esta proteína con el ARNm de la NOSe estaría asociada a la degradación del ARNm²⁹.

La actividad de esta proteína se incrementa cuando el endotelio en cultivo es tratado con TNF- α a la vez que el ARNm de los NOSe se degrada y desaparece la proteína NOSe por lo que probablemente esta proteína está involucrada en la degradación del ARNm de la NOSe²⁹.

Nuestros experimentos no han establecido todavía el mecanismo exacto por el que el TNF- α estimula la actividad de la proteína citosólica endotelial. Sin embargo, Mohamed y cols.³⁰ y Yoshizumi y cols.²³ han demostrado que la desestabilización del mensajero de NOSe por TNF- α se previene mediante la incubación con cicloheximida. Esto podría indicar

que la proteína citosólica endotelial activada por el TNF- α podría ser de nueva síntesis.

En este sentido, la pérdida de la expresión de NOSe y por lo tanto la disminución de la capacidad endotelial de liberar NO en respuesta a estímulos fisiológicos puede comprometer la capacidad del endotelio de protegerse contra la trombosis, la vasoconstricción y la proliferación subintimal. Un nivel incrementado de citoquinas se han encontrado en distintas patologías de origen cardiovascular, en las cuales la disfunción endotelial parece tener un papel fundamental en su desarrollo.

Bibliografía

1. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-141, 1991.
2. Radomski MW, Moncada S: Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Tromb Haemost* 70: 36-41, 1993.
3. López-Farré A, Riesco A, Digiuni E y cols.: Aspirin-stimulated nitric oxide production by neutrophils after acute myocardial ischemia in rabbits. *Circulation* 94: 83-87, 1996.
4. Malik AB, Lo SK: Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol Rev* 48: 213-229, 1996.
5. Gieberts AN, Van Willigen G, Lapetina EG, Akkerman JWN: Regulation of platelet glycoprotein IIb/IIIa (integrin $\alpha_{IIb} \beta_3$) Function via the thrombin receptor. 309: 613-60, 1995.
6. Michelson AD, Benoit SE, Furman MI y cols.: Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol* 270: H1640-H1648, 1996.

INTERACCIONES DE LAS CELULAS DEL ENTORNO VASCULAR

7. López-Farré A, Caramelo C, Esteban A y cols.: Effects of aspirin on platelet-neutrophil interaction: role of nitric oxide and endothelium-1. *Circulation* 91: 2080-2088, 1995.
8. Tschudi MR, Criscione L, Lüscher TF: Effect of aging and hypertension on endothelial function of rat coronary arteries. *J Hypertens* 9: 164-165, 1991.
9. Viehman GE, Xin-Liang MA, Lefer DJ, Lefer AM: Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during coronary arterial occlusion. *Am J Physiol* 261: H874-H881, 1991.
10. Farhat MY, La MC, Ramwell PW: The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 10: 615-624, 1996.
11. Werns SW, Walton JA, Hsia HH, Nabel EG, Sanz ML, Pitt B: Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation* 79: 287-291, 1989.
12. Moncada S, Higgs A: The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993.
13. Busse R, Mulsch A, Fleming I, Hecker M: Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. *Circulation* 87: 18-25, 1993.
14. Montón M, López-Farré A, Mosquera JR y cols.: Endogenous angiotensin II produced by endothelium regulated interleukin-1 β -stimulated nitric oxide generation in rat isolated vessels. *Hypertension* 30: 1191-1197, 1997.
15. Schini VB, Junquero DC, Scott-Burden T, Vanhoutte PM: Interleukin- β induces the production of an L-arginine derived relaxing factor from cultured smooth muscle cells from rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 14-121, 1991.
16. López-Farré A, Mosquera JR, Sánchez de Miguel L y cols.: Endothelial cells inhibit NO generation by vascular smooth muscle cells. Role of transforming growth factor-beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1263-268, 1996.
17. Thiemeermann C, Vane J: Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypertension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat *in vivo*. *Eur J Pharmacol* 182: 591-595, 1990.
18. Haywood GA, Tsao PS, Von der Leyen HE y cols.: Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 93: 1087-1094, 1996.
19. Mayer CF, Sajuthi D, Tulli H, Williams JK: Synthesis of IL-1 α and IL-1 β by arterial cells in atherosclerosis. *Am J Pathol* 138.
20. Myers P, Zhong Q, Jones JJ y cols.: Release of EDRF and NO in *ex vivo* perfused aorta; inhibition by *in vivo* E. coli endotoxemia. *Am J Physiol* 37: 268: HP55-H961, 1995.
21. Aoki N, Siegfried M, Lefer A: Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated perfused cat carotid arteries. *Am J Physiol* 256: H1509-H1512, 1989.
22. Warner SJC, Libby P: Human vascular smooth cells. Target for and source of tumor necrosis factor. *J Immunol* 142: 100-109, 1989.
23. Yoshizumi M, Perella MA, Burnett JC, Lee ME: Tumor necrosis factor downregulates and endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 73: 205-209, 1993.
24. Minor RL, Myers PR, Guerra R, Bates JN y cols.: Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitric oxide from rabbit aorta. *J Clin Invest* 86: 2109-2116, 1990.
25. Zhon B, Matler JS: Regulation of mRNA stability and its relevance to disease. *Lab Invest* 65: 610-621, 1991.
26. Jackson RJ: Cytoplasmic regulation mRNA function: the importance of the 3'-untranslated region. *Cell* 74: 90-14, 1993.
27. Seiser C, Posch M, Thompson N, Kühn LC: Effect of transcription inhibitor on the iron-dependent degradation of transferrin receptor mRNA. *J Biol Chem* 270: 29400-29406, 1995.
28. Ross J: mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59: 423-450, 1995.
29. Alonso J, Sánchez de Miguel L, Montón M, Casado S, López-Farré A: Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha. *Moll Cell Biol* 17: 5719-5726, 1997.
30. Mohamed F, Monge JC, Gordon A y cols.: Lack of role for nitric oxide (NO) in the selective destabilization of endothelial NO synthase mRNA by tumor necrosis factor-alpha. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 15: 52-57, 1995.