

Universitat de València
Departamento de Farmacología
Doctorado en Biomedicina y Farmacia



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LOS IPDE5 E IPDE5/NO
EN MODELOS *IN VITRO* DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Presentada por:

Amparo Ortiz Seller

Dirigida por:

Dr. D. Julio Cortijo Gimeno

Dra. Dña. Lucía Martínez-Costa Pérez

Noviembre 2020

Valencia



Doctorado en Biomedicina y Farmacia

D. Julio Cortijo Gimeno, Catedrático Numerario de Universidad del Departamento de Farmacología de la Universitat de València

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por la Graduada. **Amparo Ortiz Seller**, titulado “*Estudio farmacológico de los IPDE5 e IPDE5/NO en modelos in vitro de disfunción endotelial*”, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmo en Valencia a 9 de noviembre de 2020

Dr. Julio Cortijo Gimeno

Dña. Lucía Martínez-Costa Pérez, Jefa del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitari Dr. Peset de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por el Ldo. **Amparo Ortiz Seller**, titulado “*Estudio farmacológico de los IPDE5 e IPDE5/NO en modelos in vitro de disfunción endotelial*”, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmo en Valencia a 9 de noviembre de 2020

Dra. Lucía Martínez-Costa Pérez

Agradecimientos

Esta tesis doctoral no habría sido posible sin la ayuda de los directores y sin el apoyo de las personas que me han acompañado durante estos años. Quisiera agradecer en las siguientes líneas su labor a todos ellos.

Al Dr. Julio Cortijo, por todo el tiempo y el esfuerzo dedicado; sus ideas y buenos consejos. Por ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en el Departamento de Farmacología, y facilitar la realización de cada una de las partes de este trabajo. También por haber sido fundamental en mi inicio a la investigación, siendo director de mi trabajo de fin de grado; y haberme acompañado en el resto de mi carrera profesional hasta este momento.

A la Dra. Lucía Martínez-Costa, por co-dirigir este estudio y brindarme su ayuda desde el inicio. Por estar siempre disponible y apoyarme en todas las etapas de este gran recorrido. Por transmitirme su pasión por la profesión, y compartir tantas ideas, ilusiones y proyectos.

Agradecer al equipo de investigación del Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia su gran predisposición y su labor desde mis inicios allí, cuando aún estudiaba la carrera, hasta la finalización de esta tesis doctoral. Gracias a un equipo tan profesional pueden realizarse trabajos como este.

Al servicio de Oftalmología del Hospital Dr. Peset. A los residentes, por estar siempre. A las Dras Alicia Solves, Cristina Verdejo y Mara Albert, por enseñarme tanto y creer en mí; y a todos los demás compañeros de este gran servicio.

También al Dr. Honorio Barranco, por ser un apoyo tan importante en los últimos meses.

A todos mis amigos. En especial, a mis amigas de la U.V., por estar todas siempre cerca, a pesar de los kilómetros. Y a Amparo, Lydia, Berta y Alex, por haber vivido tantas cosas juntos, todos estos años.

A Pablo, por estar siempre conmigo, por hacer que los momentos difíciles acaben siendo grandes anécdotas que contar.

A mi tío José-Manuel, por tener siempre palabras de ánimo y ser un ejemplo a seguir.

A mis padres y a Daniel, por hacer de estar juntos el mejor lugar en el que estar. Por tener siempre la respuesta a todo y transmitir tanta tranquilidad. Por darme impulso. Por recordarme, cada vez, que vale la pena intentarlo. Por haber llegado hasta aquí, gracias a ellos.

Índice general

1. Introducción.....	11
1.1 El endotelio vascular: más que una barrera celular	13
1.1.1 Generalidades	13
1.1.2 Desarrollo embrionario del endotelio	14
1.1.3 Funciones del endotelio en la homeostasis vascular	16
1.1.3.1 Papel del endotelio en la trombosis y la trombólisis	16
1.1.3.2 Papel del endotelio en la coagulación sanguínea	17
1.1.3.3 Endotelio e interacción con plaquetas y leucocitos	17
1.1.3.4 Regulación del tono y crecimiento vascular.....	19
1.2 El papel del Oxido Nítrico y su importancia en la salud vascular	23
1.2.1 Concepto previo	23
1.2.2 Biosíntesis y metabolismo del óxido nítrico.....	23
1.2.2.1 Transducción enzimática de isoforma endotelial eNOS	25
1.2.2.2 Isoforma endotelial: Papel del NO como mensajero	25
1.2.3 Acción del Óxido Nítrico y guanilato-ciclasa (GC) intracelular en las células endoteliales y el músculo liso vascular.....	26
1.2.4 Variaciones en la concentración endotelial de NO.....	27
1.2.4.1 Disminución de la actividad enzimática de eNOS	27
1.2.4.2 Disminución de la biodisponibilidad de NO	27
1.3 Disfunción endotelial	28
1.3.1 Definición.....	28
1.3.2 Causas de disfunción endotelial.....	29
1.3.2.1 Trastornos metabólicos	29
1.3.2.2 Inflamación.....	29
1.3.2.3 Estrés mental	31

1.3.2.4	<i>Envejecimiento celular</i>	31
1.3.2.5	<i>Fármacos</i>	32
1.3.3	<i>Alteraciones moleculares implicadas en la disfunción endotelial</i>	33
1.3.3.1	<i>Alteración de la función de la eNOS</i>	33
1.3.3.1.1	<i>Disminución de BH4</i>	33
1.3.3.1.2	<i>Inhibición eNOS por dimetilarginina asimétrica</i>	34
1.3.3.1.3	<i>Arginina</i>	36
1.3.3.1.4	<i>Caveolas.y caveolinas</i>	36
1.3.3.2	<i>Disminución de la biodisponibilidad de NO</i>	38
1.3.3.2.1	<i>Estrés oxidativo</i>	38
1.3.3.2.2	<i>Estrés hiperglucémico</i>	39
1.3.4	<i>Marcadores circulatorios de disfunción endotelial</i>	39
1.4	<i>Diabetes Mellitus y mecanismos de disfunción endotelial</i>	41
1.4.1	<i>Diabetes Mellitus: importancia e impacto en la salud vascular</i>	41
1.4.2	<i>Resistencia a la insulina en el endotelio</i>	44
1.4.3	<i>Estrés oxidativo y otras alteraciones de la función endotelial específicas de la Diabetes Mellitus</i>	47
1.4.3.1	<i>Disminución de la actividad AMPK</i>	47
1.4.3.2	<i>Estrés mitocondrial</i>	48
1.4.3.3	<i>Estrés del retículo endoplásmico</i>	49
1.4.3.4	<i>Regulación enzimática del estrés oxidativo en diabetes mellitus</i> ...	49
1.4.3.4.1	<i>NO-sintasa endotelial y prostaglandina sintasa</i>	49
1.4.3.4.2	<i>Superóxido dismutasa</i>	50
1.4.3.4.3	<i>Tiorredoxina reductasa</i>	50
1.4.4	<i>Terapias anti-disfunción endotelial</i>	51
1.4.4.1	<i>Tratamientos antioxidante</i>	51

1.4.4.2	<i>Terapia antiinflamatoria</i>	51
1.4.4.3	<i>Suplementación con BH4</i>	52
1.4.4.4	<i>Terapia reparadora con agentes farmacológicos</i>	52
1.4.4.4.1	<i>Insulina</i>	52
1.4.4.4.2	<i>Tratamiento antihipertensivo e hipolipemiente</i>	52
1.4.4.4.2.1	<i>Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina</i>	52
1.4.4.4.2.2	<i>Estatinas y fenofibrato</i>	53
1.4.4.4.3	<i>Inhibidores de la fosfodiesterasa 5</i>	54
1.4.4.4.4	<i>Dadores de NO</i>	55
1.4.4.5	<i>Compuestos derivados de 2-fenil-3,4-dihidropirrol[2,1-f][1,2,4]triazinona como inhibidores de fosfodiesterasa</i>	55
1.4.4.5.1	<i>Estructura de TOP N53 y TOP 52</i>	56
1.4.4.5.2	<i>Farmacología del top n53 y top 52</i>	56
1.4.4.5.2.1	<i>Hallazgos in vitro</i>	56
2.	Objetivos	61
3.	Material y métodos	65
3.1	Estudios en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas	67
3.1.1	<i>Enfoque metodológico del estudio</i>	67
3.1.2	<i>Cultivos celulares</i>	68
3.1.3	<i>Efectos sobre la angiogénesis de TOP N53, TOP 52, sildenafil y nitroprusiato sódico</i>	68
3.1.3.1	<i>Proliferación celular células endoteliales</i>	68
3.1.3.2	<i>Migración de células endoteliales</i>	69
3.1.3.3	<i>Medición de la liberación de VEGF</i>	70
3.1.3.4	<i>Estudios de apoptosis</i>	70
3.1.3.5	<i>Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS)</i>	70
3.1.3.6	<i>Ensayo de formación de tubos</i>	71

3.1.4	<i>Efectos de TOP n53, TOP 52 y fármacos de referencia sobre mecanismos de disfunción endotelial</i>	73
3.1.4.1	<i>Expresión de componentes del eje NO-sGC-GMPc: GTPCH I, DDAH II, PDE5 y eNOS.</i>	73
3.1.4.1.1	<i>1 RT-PCR: Análisis de la expresión genética</i>	73
3.1.4.1.2	<i>Western Blot: Análisis de la expresión proteica</i>	73
3.1.4.2	<i>Medida de BH4</i>	74
3.1.4.3	<i>Medición de la actividad nos dependiente de Ca²⁺</i>	74
3.1.4.4	<i>Medición del contenido de GMPc de las células endoteliales</i>	75
3.2	<i>Estudios funcionales de órgano aislado en aorta de rata</i>	77
3.2.1	<i>Enfoque metodológico del estudio</i>	77
3.2.1.1	<i>Objetivos</i>	77
3.2.1.2	<i>Enfoque experimental</i>	77
3.2.2	<i>Baño de órganos</i>	77
3.2.2.1	<i>Descripción del sistema de baño de órganos</i>	77
3.2.2.2	<i>Montaje del preparado.</i>	78
3.2.3	<i>Condiciones experimentales</i>	79
3.2.3.1	<i>Animales</i>	79
3.2.3.2	<i>Preparación de suspensiones y soluciones de prueba</i>	80
3.2.3.3	<i>Estudios de tensión isométrica en anillos de aorta de rata aislados.</i>	83
3.2.3.3.1	<i>Preparación de anillos de aorta de rata</i>	83
3.2.3.3.1.1	<i>Endotelio intacto</i>	83
3.2.3.3.1.2	<i>Disfunción endotelial por remoción mecánica endotelial</i>	83
3.2.3.3.1.3	<i>Disfunción endotelial secundaria a L-NAME</i>	84
3.2.3.3.1.4	<i>Disfunción endotelial secundaria a glucosa alta</i>	84

3.2.3.3.2	<i>Relajación dependiente de la concentración por TOP N53, TOP 52 y sildenafilo</i>	85
3.2.3.3.3	<i>Experimentos de valoración del efecto en el curso del tiempo</i>	86
3.2.3.4	<i>Fármacos y productos químicos utilizados</i>	86
3.2.3.5	<i>Análisis de resultados</i>	87
4.	Resultados	89
4.1	Estudios en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas	91
4.1.1	Efectos sobre la angiogénesis de TOP N53, TOP 52, sildenafilo y nitroprusiato sódico	91
4.1.1.1	<i>Proliferación celular células endoteliales (incorporación de BrdU)</i>	91
4.1.1.2	<i>Migración de células endoteliales</i>	92
4.1.1.3	<i>Medición de la liberación de VEGF</i>	92
4.1.1.4	<i>Estudios de apoptosis</i>	93
4.1.1.5	<i>Medición de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS)</i>	96
4.1.1.6	<i>Ensayo de formación de tubos</i>	97
4.1.2	Efectos de TOP N53, TOP 52 y fármacos de referencia sobre mecanismos de disfunción endotelial	106
4.1.2.1	<i>Expresión de componentes del eje NO-sGC-GMPc: GTPCH I, DDAH II, PDE5 y eNOS.</i>	106
4.1.2.1.1	<i>RT-PCR: Análisis de la expresión génica</i>	106
4.1.2.1.2	<i>Western Blot: Análisis de la expresión proteica</i>	111
4.1.2.2	<i>Medida de BH4</i>	112
4.1.2.3	<i>Medición de la actividad de la óxido nítrico sintasa dependiente de Ca²⁺</i>	113
4.1.2.4	<i>Medición del contenido de GMPc de las células endoteliales</i>	114
4.1.3	Células progenitoras endoteliales	117
4.2	Estudios funcionales de órgano aislado en aorta de rata	125

4.2.1	<i>Relajación dependiente de la concentración por TOP N53, TOP 52 y sildenafil</i>	125
4.2.1.1	<i>Anillos de aorta de rata con endotelio intacto</i>	125
4.2.1.2	<i>Anillos de aorta de rata sin endotelio</i>	128
4.2.1.3	<i>Anillos de aorta de rata incubados con L-NAME (100 μM)</i>	131
4.2.1.4	<i>Anillos de aorta de rata en solución de Krebs con glucosa alta (25 mM)</i>	134
4.2.1.4.1	<i>Ratio de relajación respecto a curva control.</i>	138
4.2.1.4.2	<i>Desplazamiento de curvas por incubación con glucosa 25 Mm</i>	139
4.2.1.4.3	<i>Efecto de ODQ sobre efecto de TOP N53</i>	140
4.2.2	<i>Experimentos de valoración del efecto en el curso del tiempo</i>	142
5.	Discusión	149
5.1	Diabetes y daño vascular.....	151
5.2	Estudio de la angiogénesis en células microvasculares dérmicas humanas de diabéticos.	152
5.3	Estudio de las vías de disfunción endotelial	154
5.4	Efectos sobre GMPC en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas de diabéticos	155
5.5	Estudio de formación in vitro de células progenitoras endoteliales... ..	156
5.6	Estudio funcional en aorta de rata aislada.....	157
5.7	Consideraciones generales	160
6.	Conclusiones	161
7.	Bibliografía	165
8.	Anexos	187

Índice abreviaturas

Ach	Acetilcolina
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína serina-treonina kinasa
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada con adenina monofosfato
Ang	Angiopoyeintinas
ARNm	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BH4	(6R-) 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
Ca ²⁺	Calcio
CO ₂	Dióxido de carbono
COVID-19	Enfermedad por coronavirus 2019
CPE	Células progenitoras endoteliales
CuZnSOD o SOD1	Superóxido dismutasa citosólica que contiene cobre y zinc
DCF	a 2' 7'-diclorofluoresceína
DDAH	dimetilarginina dimetilaminohidrolasa
DDAHII	Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa II
DiI-Ac-LDL	DiI; 1,1'-dioctadecil-3,3,3', 3'-tetrametilindo-carbocianina perclorato
Drp1	Proteína 1 relacionada con la dinamina
EC-SOD o SOD3	Superóxido dismutasa extracelular
EC50	Concentración eficaz 50%
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E _{max}	Efecto máximo
eNOS	NO Sintasa endotelial
ET	Endotelina
ET-1	Endotelina 1
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
FCF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Fis1	Proteína 1 relacionada con la fisión 1
FMN	Flavina Mononucleótido
GC	Guanilato Ciclasa
GMPc	Guanosina-3,5-monofosfato cíclico
GTPCHI	Guanosina trifosfato ciclohidrolasa I
H2DCF-DA	2' 7'-diclorodihidrofluoresceína
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HDMVEC	Células endoteliales microvasculares dérmicas humanas
HIF	Factor inducible por hipoxia
Hsp90	Proteína de shock térmico de 90 kDa
IC40	Concentración inhibitoria 40%

ICAM	Molécula de Adhesión Intercelular
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL1	Interleukina 1
iNOS	NOS inducible
IPDE5	Inhibidor de fosfodiesterasa 5
IPDE5/NO	Inhibidor de fosfodiesterasa 5 y dador de NO
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Receptor de insulina isoforma tipo 1
IRS-2	Receptor de insulina isoforma tipo 2
I β	Inhibidores k β
L-NAME	L-N ^G - ester metil - nitro arginina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDL ox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MFN1	Mitofusina 1
MFN2	Mitofusina 2
MnSOD o SOD2	SOD que contiene manganeso mitocondrial
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NFKB	Factor nuclear kappaB
nNOS	NOS neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	NO sintasa
O ₂	Oxígeno
ODQ	1H- [1,2,4] Oxadiazolo [4,3- a] quinoxalin-1-ona
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PDE	Fosfodiesterasa
PDE5	Fosfodiesterasa 5
PDE5A1	Fosfodiesterasa 5A1
PDK-1	Quinasa 1 dependiente de fosfoinosítido
FE	Fenilefrina
PECAM	Molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias
PGH2	Prostaglandina H2
PGI2	Prostaciclina
PGIS	Prostaglandina sintasa
Phos-AMPK	Fosforilación de AMPK
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5) -trisfosfato
PIP3K	Fosfatidilinositol (3,4,5) -trisfosfato kinasa
PMO	Proteína morfogénica ósea
PPAR α	Proliferadores peroxisomales
PRMTs	Enzima arginina metil transferasas
PVP	Polivinilpirrolidona
Redox	Oxidación-Reducción

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPD	Respuesta a proteína desplegadas
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real
SARS-CoV-2	Coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave
Shc	Proteína recombinante de Shc 1
SOD	Superóxido dismutasa
TERT	Telomerasa transcriptasa inversa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRX	Tiorredoxina
TXNIP	Proteína que interactúa con tiorredoxina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

1. Introducción

1.1 El endotelio vascular: más que una barrera celular

1.1.1 Generalidades

Las células endoteliales forman una monocapa continua que tapiza la cara luminal interna de las arterias, las venas, los capilares y los vasos linfáticos. Los vasos sanguíneos, en algunas localizaciones, además de la capa endotelial, están formados por una capa adventicia y una capa media formada por células musculares lisas (Figura 1.1).^{1,2}

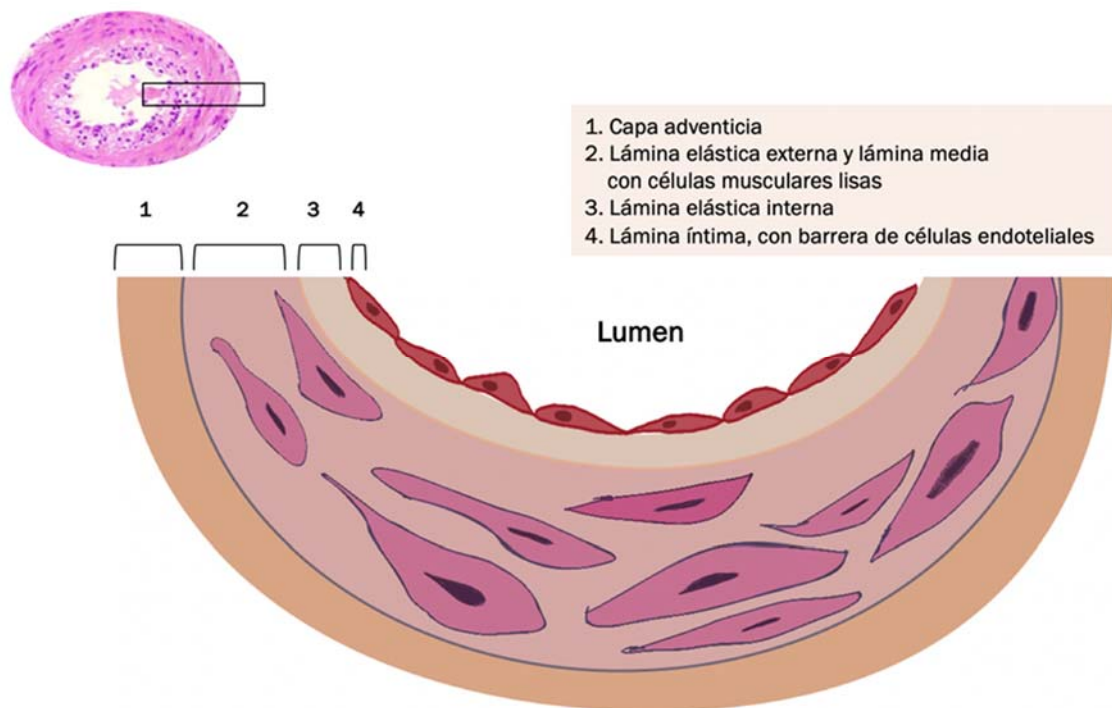


Figura 1.1. Imagen histológica de corte transversal de un vaso sanguíneo (esquina superior izquierda) con la representación esquemática ampliada de sus distintas capas

Actualmente, el endotelio vascular ya no es considerado como un simple epitelio que tapiza el interior de los vasos. Constituye un pilar fundamental en la homeostasis vascular y el principal responsable de múltiples funciones que contribuyen a mantener la fisiología del sistema cardiovascular.^{3,4}

1.1.2 Desarrollo embrionario del endotelio

El endotelio, una monocapa de células planas de origen mesodérmico, constituye el revestimiento interior de los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) y el sistema linfático. El conocimiento del desarrollo y la diferenciación de las células endoteliales es importante para comprender mejor los distintos trastornos del endotelio vascular, y en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas.²

Durante las primeras etapas del desarrollo, el tejido embrionario y extraembrionario se componen de dos capas de células: el epiblasto y el hipoblasto. El epiblasto expresa diversas proteínas, entre las cuales destaca la proteína morfogénica ósea (PMO). Las células del epiblasto desplazarán al hipoblasto, para formar el endodermo embrionario; y las células de epiblasto restantes, darán lugar al ectodermo embrionario. El tejido mesenquimatoso que acompaña al tejido embrionario, originará una capa denominada “mesodermo” con células mesenquimales. De esta manera, el disco embrionario se ha convertido en trilaminar y consta de tres capas: ectodermo, mesodermo y endodermo (Figura 1.2). Es lo que denominamos la línea primitiva.

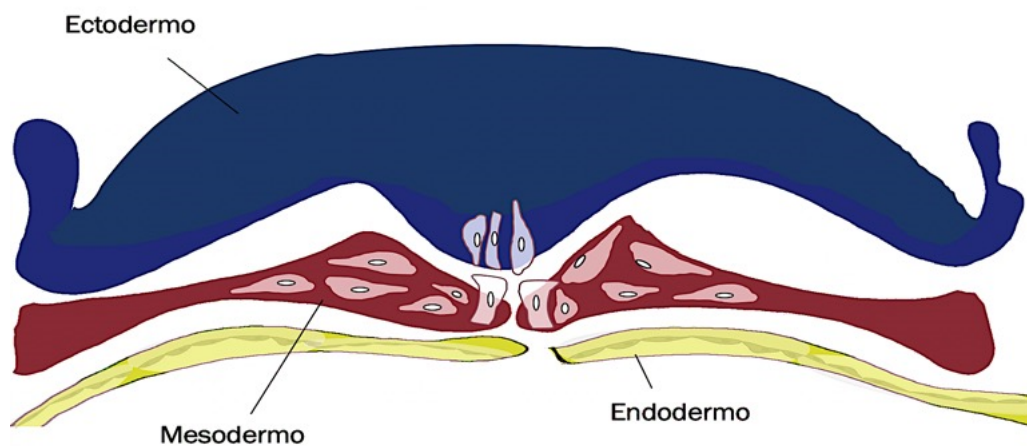


Figura 1.2. Disco embrionario trilaminar con formación del mesodermo intraembrionario

La formación de mesénquima embrionario es uno de los eventos más críticos durante la embriogénesis, ya que promueve el establecimiento de los tejidos cardiovasculares, hematopoyéticos, esqueléticos y blandos. El factor de crecimiento de fibroblastos es un factor precursor importante de los islotes sanguíneos en el mesodermo, que darán lugar al futuro órgano endotelial.⁵ Las células los islotes sanguíneos experimentan dos transiciones: las células externas se aplanan y se convierten en endotelio, mientras que las internas se diferencian en células hematopoyéticas.^{2,6,7}

Las células endoteliales se identifican por la expresión de VE-cadherina, receptor tirosina quinasa Tie2, y PECAM (molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias, también conocida como CD31).⁸ Aunque todavía no hay marcadores que distingan diferentes subconjuntos de células endoteliales en esta etapa precoz, los experimentos de “rastreo celular” han demostrado que cada célula endotelial contribuiría a la formación de bien arterias, o venas. Existen diferencias de soporte endotelial entre los vasos, en función de su localización. Asimismo, las arterias están rodeadas por células de músculo liso vascular. El endotelio secreta proteínas de la matriz extracelular, por lo que las células del músculo liso no tienen contacto directo con las células endoteliales. El músculo liso vascular proporciona soporte mecánico y elasticidad, mediado por proteínas contráctiles como la smootelina-B. Estas células del músculo liso vascular migran hacia las arterias primarias más grandes y posteriormente cubren las bifurcaciones de menor tamaño. Debido a que las células endoteliales arteriales están sometidas a un esfuerzo de cizallamiento extremadamente alto, es entendible que necesiten este apoyo estructural adicional que supone el músculo liso vascular. Por el contrario, las células endoteliales venosas tienen pocas células de músculo liso vascular de soporte, tienen paredes más delgadas y experimentan menos “esfuerzo cortante” o “estrés de flujo”. Curiosamente, algunas células endoteliales arteriales, como las arterias coronarias, son aterosusceptibles, mientras que otras células endoteliales arteriales, como las arterias ilíacas, son aterrorresistentes. Las arterias coronarias expresan preferentemente genes relacionados con la aterosclerosis, como el factor de transcripción factor de crecimiento temprano 1, el factor de transcripción proinflamatorio c-FOS y genes relacionados con la inflamación, oxidación y metabolismo de lípidos. Las arterias ilíacas, por el contrario, expresan genes que median la remodelación vascular y la angiogénesis, así como genes citoprotectores. Aunque actualmente se desconoce la causa de estas diferencias, *Zhang et al* plantearon la hipótesis de que dichos cambios pueden ser causados por el entorno mecánico local, como las diferencias en el estrés de flujo y la deformación circunferencial que sufren. La identificación reciente de algunas etapas de diferenciación de células mesenquimales endoteliales hacia células estromales, pericitos o stem-cells, además de nuevos marcadores específicos según el linaje, ha creado nuevas dianas para investigar los mecanismos moleculares que guían la especificación y diversificación de estas células de origen mesodérmico.⁶ La comprensión de cómo una célula endotelial puede diferenciarse en células especializadas durante el desarrollo embrionario, es esencial para entender la complejidad de los trastornos endoteliales y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.^{7,9}

1.1.3 Funciones del endotelio en la homeostasis vascular

El endotelio, hasta hace unos años, era considerado una simple barrera que regulaba el transporte de moléculas desde la sangre del interior de los vasos hacia el espacio intersticial. Sin embargo, hoy en día se sabe que el órgano endotelial juega un papel clave en el mantenimiento de la fluidez sanguínea, la agregación plaquetaria y el tono vascular, así como en la coordinación de la respuesta inmune e inflamatoria y también en la angiogénesis.^{3,10}

1.1.3.1 Papel del endotelio en la trombosis y la trombólisis

El endotelio juega un papel crucial para lograr el equilibrio hemostático en el organismo humano. Por un lado, en condiciones fisiológicas, las células endoteliales previenen la trombosis mediante diferentes mecanismos anticoagulantes y antiplaquetarios.^{4,11} Por el contrario, también están involucradas en las distintas vías hemostáticas que se desencadenan cuando existe una lesión vascular. En esos casos, limitan la formación de coágulos únicamente a las áreas donde se necesita hemostasia para reinstaurar la integridad vascular. La ruptura del equilibrio entre los sistemas pro y anticoagulante, debido a alteraciones congénitas o adquiridas, puede resultar en fenómenos hemorrágicos o trombóticos.¹² Asimismo, el endotelio se considera como un órgano heterogéneo, y asegura una adecuada homeostasis en los diferentes órganos y las diferentes partes del árbol vascular.¹³ El entorno local induce fenotipos concretos de células endoteliales, que vienen determinados por las necesidades locales, tal y como comentamos previamente. Esta heterogeneidad explica las diferentes respuestas patológicas que se pueden producir ante una alteración de la integridad vascular, en las distintas áreas del árbol vascular del organismo. Es decir, existe una respuesta localizada del endotelio, diferente en función de su localización. También es importante destacar que la gran mayoría de las células endoteliales se encuentran dispuestas a lo largo de los microvasos. Es por esto que las células endoteliales juegan un papel clave en el desarrollo de enfermedades microcirculatorias como las microangiopatías trombóticas o la coagulación intravascular difusa.^{14,15,16}

1.1.3.2 Papel del endotelio en la coagulación sanguínea

Las células endoteliales forman la superficie vascular luminal y, por lo tanto, tienen un papel fundamental en la regulación de la coagulación. Una forma importante mediante la cual las células endoteliales controlan el sistema de coagulación, es regulando la expresión de los puntos de unión de los factores anticoagulantes y procoagulantes a la superficie celular. Por un lado, las células endoteliales mantienen la fluidez sanguínea promoviendo la actividad de numerosas vías anticoagulantes, incluida la vía proteína C / proteína S¹⁷. Después de la activación de estas vías, producida en algunas ocasiones por las citocinas, el equilibrio de la barrera endotelial puede inclinarse a favor de la formación de coágulos mediante la inducción de vías procoagulantes y la supresión de otros mecanismos anticoagulantes. El factor de necrosis tumoral, por ejemplo, suprime la formación de trombosmodulina, un cofactor anticoagulante endotelial, e induce la expresión del factor tisular, que es un cofactor procoagulante. Estos cambios tan específicos, son capaces de inducir la formación de fibrina ocurra en un punto focal de inflamación, pero manteniendo aún así la fluidez sanguínea en las zonas de vasculatura circundante que no han sufrido ninguna alteración proinflamatoria. Igualmente, algunos estudios demostraron que los productos finales de la glicosilación avanzada pueden inducir cambios similares en las propiedades coagulantes endoteliales. Los productos derivados de la glicosilación, son proteínas modificadas por la glucosa y se acumulan en los vasos sanguíneos a un ritmo muy elevado en pacientes diabéticos. Esto indica que dichos mecanismos puedan ser clave en la fisiopatología de la enfermedad vascular diabética.¹⁸

1.1.3.3 Endotelio e interacción con plaquetas y leucocitos

La primera descripción del rodamiento de las células sanguíneas a lo largo de la superficie endotelial de las vénulas fue publicada hace más de 100 años. En ese momento, se demostró que los leucocitos se adherían a las paredes de los vasos sanguíneos, en situaciones con activación de la inflamación. Por otro lado, Giulio Bizzozero en 1882 describió por primera vez las plaquetas como un nuevo corpúsculo sanguíneo, que juega un papel relevante en la trombosis y la hemostasia, y observó que “cada vez que se daña una zona de pared vascular, la disminución de los glóbulos blancos representa un fenómeno secundario y puede, quizás, ser causado por aumento de la agregabilidad de las plaquetas sanguíneas”. Las plaquetas, por tanto, reaccionarían con los leucocitos en este

entorno. La adhesión de las plaquetas y los leucocitos que “ruedan” sobre el endotelio representan la etapa inicial de un proceso de múltiples etapas que conduce a la extravasación de glóbulos blancos a sitios de inflamación o infección, a la interacción y agregación plaquetas-leucocitos en una superficie trombogénica y finalmente a la oclusión vascular. Las plaquetas pueden interactuar con el endotelio incluso en ausencia de daño morfológico aparente. De hecho, pueden adherirse a un endotelio aparentemente intacto inflamado por diferentes estímulos, como infección, alteración mecánica o isquemia y reperfusión, o al endotelio localizado en sitios propensos a lesiones, como la bifurcación de la arteria carótida. El reclutamiento de plaquetas y leucocitos en sitios de lesión vascular es muy rápido y está mediada por la liberación de componentes preformados elaborados por el endotelio. Cuando el organismo responde a la invasión de un microorganismo patógeno, las células endoteliales venosas aumentan la expresión de las moléculas de adhesión, entre las que se incluyen los cuerpos de Weibel-Palade y sus constituyentes principales, los multímeros más grandes del factor von Willebrand y la P-selectina, que son los promotores más activos de la adhesión de plaquetas y leucocitos (Figura 1.3).^{19,20}

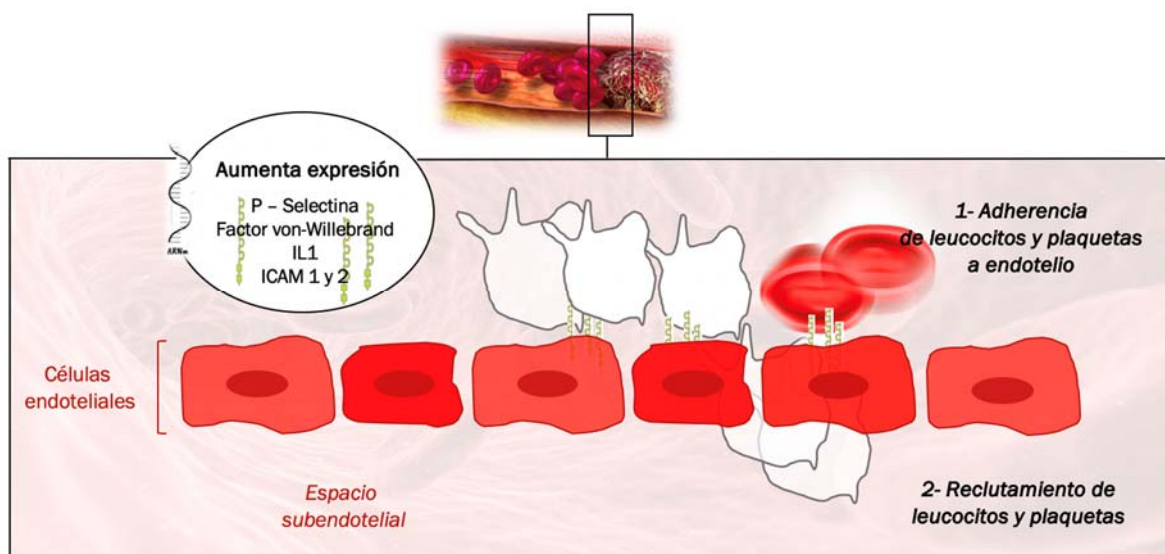


Figura 1.3. Interacción de plaquetas y leucocitos con el endotelio vascular, y aumento de la expresión de proteína necesarias para el reclutamiento

La molécula de adhesión intercelular (ICAM, por sus siglas en inglés) participa también en la captura de los leucocitos a nivel endotelial, de forma localizada. La P-selectina además de mediar la adhesión de leucocitos y plaquetas, se fusiona con la membrana plasmática endotelial.²¹ El proceso de rodamiento de leucocitos se inicia mediante la secreción de P-selectina y concluye con la adhesión y trans migración de los

leucocitos al tejido inflamado. El funcionamiento inadecuado del endotelio vascular provoca que este proceso suceda en algunas arterias con expresión anómala de las moléculas de adhesión. Así pues, se da un acúmulo de macrófagos y otras células inflamatorias en el espacio subendotelial. Los macrófagos ubicados en el espacio subendotelial arterial fagocitan lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox) y se convierten en células espumosas, que ocasionan el crecimiento y desarrollo de la placa de ateroma.²²

1.1.3.4 Regulación del tono y crecimiento vascular

Las células endoteliales juegan un papel regulador importante en la circulación sanguínea, tanto como barrera física, como fuente productora de diversas sustancias reguladoras del tono vascular. En primer lugar, el óxido nítrico (NO) derivado del endotelio y la prostaciclina, se liberan en respuesta a estímulos físicos, hormonas y sustancias derivadas de plaquetas. El NO es capaz de inducir la relajación vascular. Por el contrario, otras sustancias pueden provocar una hiperpolarización de las células del músculo liso y la vasoconstricción de los vasos (Tabla 1). Es decir, son las células endoteliales las mismas que también pueden liberar varios factores inductores de la contracción, tales que la Endotelina (ET), tromboxano A2, angiotensina II, superóxido y otros factores inductores de la contracción no identificados (Figura 1.4). El balance entre las acciones de cada una de estas sustancias es lo que determinará la adecuada función endotelial o su disfunción.^{23,24,25,26}

Propiedades vasodilatadoras, antiinflamatorias, antitrombóticas	Promueve vasoconstricción, inflamación, hipertrofia y trombosis
Óxido nítrico	Endotelina Angiotensina II Factor de crecimiento derivado de plaquetas B

Tabla 1.1. Ejemplos sustancias endoteliales capaces de modificar el tono y el crecimiento vascular

En segundo lugar, es importante resaltar que las células endoteliales también son una fuente de liberación de factores inhibidores y promotores de la angiogénesis, como la heparina y los sulfatos de heparina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y la trombospondina. Varias sustancias vasoactivas producidas por el endotelio, como el NO, la ET y la angiotensina II, además de su función vasodilatadora o vasoconstrictora,

también pueden desempeñar una función clave en la regulación del crecimiento vascular. Por tanto, la capa endotelial puede ser capaz de regular tanto el tono como el crecimiento vascular. La disfunción de estos sistemas reguladores dependientes del endotelio puede desempeñar un papel importante en algunas enfermedades cardiovasculares.²⁷

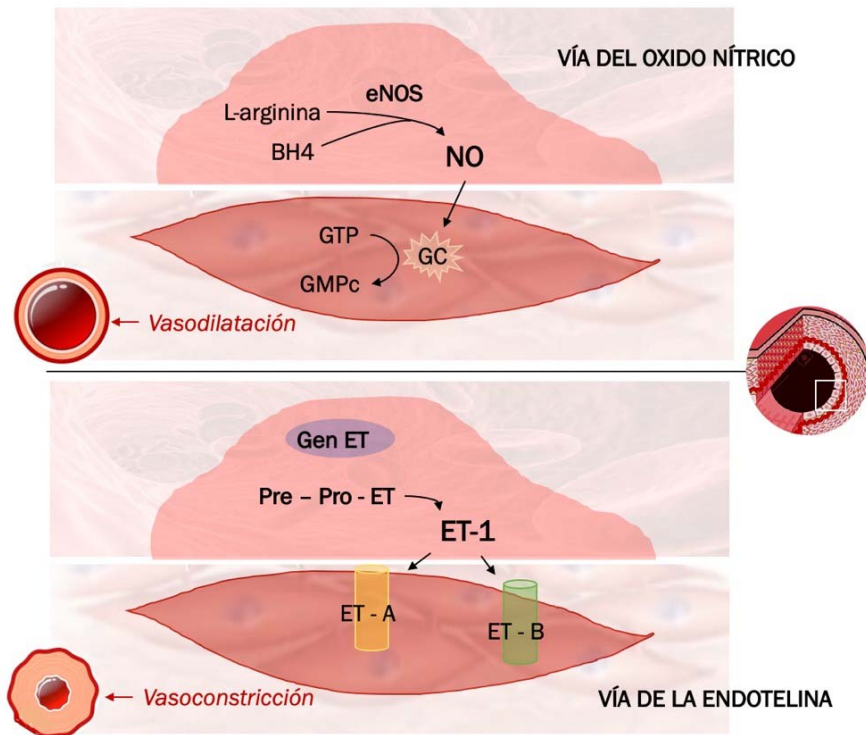


Figura 1.4. Efectos del NO y de ET-1 en células de músculo liso vascular

El endotelio también participa en la formación de los vasos sanguíneos, tanto en etapas embrionarias como en etapas vitales posteriores. Después de la semana 22 de gestación, se cree que la vasculatura fetal de algunas áreas de microcirculación, como el plexo retiniano, se desarrolla a través de la angiogénesis “en ciernes”. Es decir, la proliferación y crecimiento de vasos sanguíneos tiene lugar desde la vasculatura fetal existente en ese momento. Entendemos como vasculogénesis la formación de vasos primitivos “de novo”. La angiogénesis es la formación de vasos mediante la extensión y el desarrollo de una vasculatura ya formada. Esto ocurre en los plexos de la retina, el riñón y algunas áreas del sistema nervioso central.²⁸ En varias especies, los astrocitos detectan una "hipoxia fisiológica" en estos plexos, y regulan al alza el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Como consecuencia, las células endoteliales proliferan y migran, extendiendo así la vasculatura. En el caso del plexo retiniano, el plexo vascular interno (creado inicialmente por vasculogénesis) se ampliaría mediante este mecanismo, desde el polo posterior hasta la ora serrata (Figura 1.5).^{29,30,31}

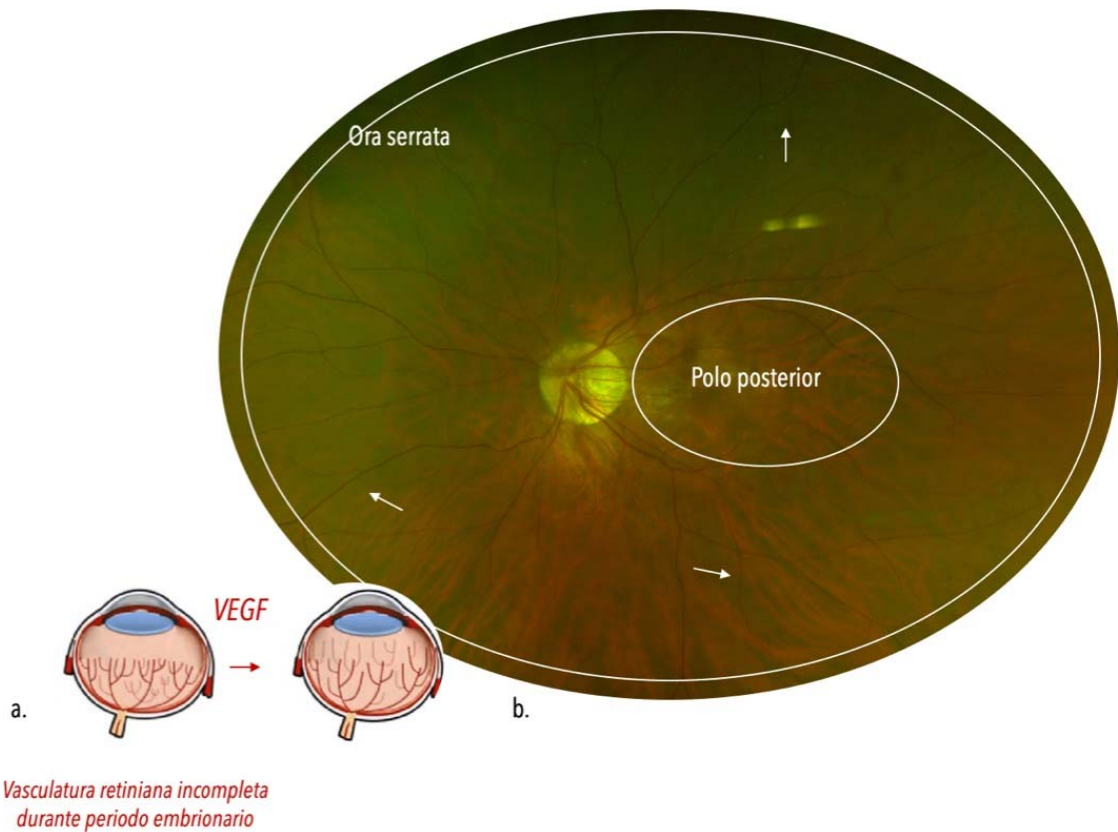


Figura 1.5. a. Esquema ilustrativo de la angiogénesis tras estimulación por VEGF. **b.** Imagen ultra-amplia de fondo de ojo con vasculatura retiniana completa hasta retina periférica (flechas)

El desarrollo de una red vascular funcional, tanto en el plexo retiniano como en otros plexos vasculares específicos, requiere una gran coordinación entre diferentes tipos de células que experimentan cambios complejos. Estos procedimientos dependen en gran medida de las señales intercambiadas entre las células. De esta forma, el VEGF ha supuesto el primer ejemplo de un factor de crecimiento específico del endotelio vascular. Recientemente, una familia de factores de crecimiento conocidos como angiopoyetinas (Ang) y otros miembros de la amplia familia de las efrinas están siendo estudiados por tener efectos únicos sobre el endotelio. Las investigaciones recientes han llevado a un modelo de formación vascular que intenta incorporar los factores de crecimiento específicos vasculares nuevos y los ya conocidos. En estos modelos, el VEGF es el impulsor más importante de la formación vascular, ya que se requiere para iniciar la formación de vasos inmaduros mediante la vasculogénesis. En etapas posteriores, se requieren *Ang1* y factores adicionales como el *ephrinB2* para una mayor remodelación y maduración de esta vasculatura (Figura 1.6).^{32,33}

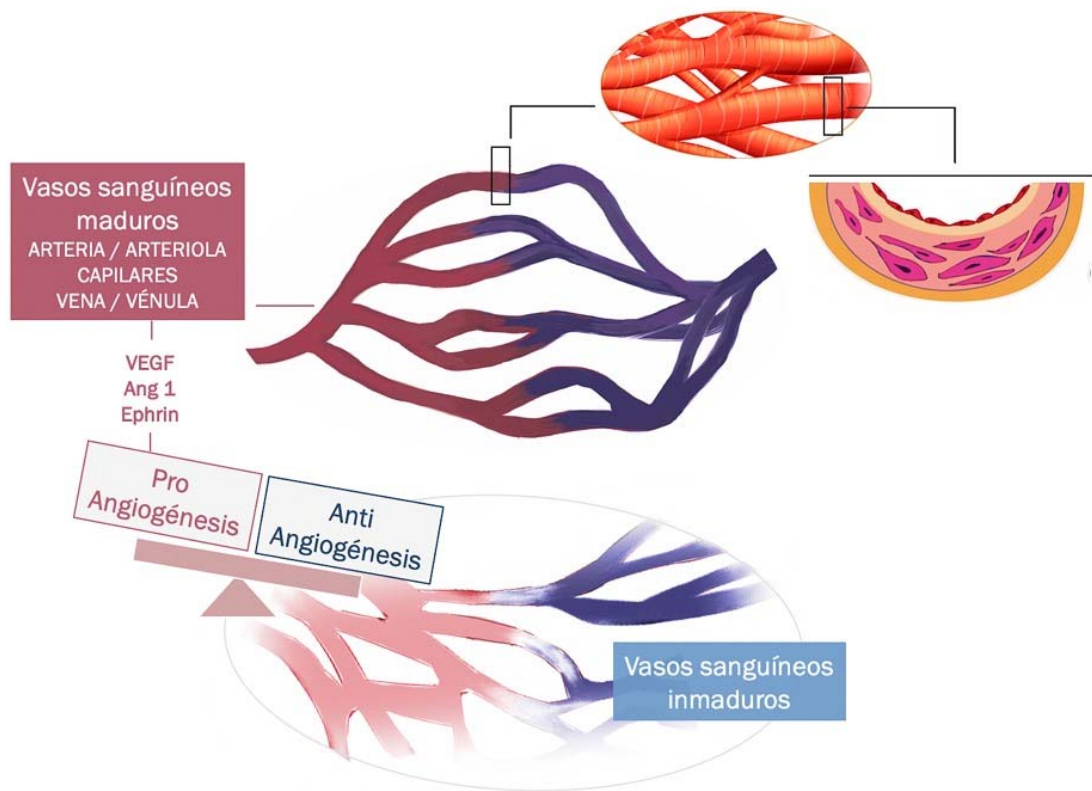


Figura 1.6. Maduración de vasos sanguíneos inmaduros gracias a factores pro-angiogénesis con diferenciación de las distintas capas de los capilares culminando en el endotelio

La vasculatura es inicialmente inmadura, y estos factores juegan un papel importante en la fase de maduración, sobre todo a medida que las células endoteliales se integran con células de soporte, como es el caso de las células musculares lisas o los pericitos.³ Después de la maduración de los vasos, Ang1 podría seguir siendo importante en el mantenimiento de la quiescencia y la estabilidad de la vasculatura ya madura. De hecho, se ha observado un posible papel protector en relación con las angiopoyetinas en patologías con proliferación vascular anómala con la degeneración macular asociada a la edad exudativa, caracterizada por el crecimiento de neovasos retinianos.³⁴

1.2 El papel del Oxido Nítrico y su importancia en la salud vascular

1.2.1 Concepto previo

Desde el descubrimiento de la liberación endotelial del radical libre NO que regula el tono vascular, se descubrió que esta molécula gaseosa actúa como mensajero autocrino y paracrino de una amplia gama de procesos fisiológicos. La vida media del NO es muy corta porque se metaboliza rápidamente a nitrito y después a nitrato; y se excreta en la orina. El NO cumple diversas funciones relacionadas con la homeostasis vascular, incluyendo múltiples efectos vasodilatadores y antitrombóticos y la inhibición de la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. También inhibe la proliferación de células de músculo liso vascular, la oxidación de las LDL, y la acción de factores que transcriben mediadores aterogénicos, como el factor nuclear kappaB (NFkB).

Ha surgido un interés creciente por el desarrollo de herramientas farmacológicas con la capacidad de regular la biodisponibilidad del porcentaje de NO. Estas nuevas terapias irían dirigidas, entre otras cosas, al tratamiento de la incorrecta funcionalidad endotelial en trastornos cardiovasculares como la hipertensión o la angina de pecho.³⁵ Recientemente, se han investigado también opciones terapéuticas para trastornos vasculares relacionados con la diabetes mellitus, incluyendo el pie diabético.^{36,37}

1.2.2 Biosíntesis y metabolismo del óxido nítrico

La NO sintasa (NOS) engloba una familia de enzimas responsables de la síntesis de NO a partir del aminoácido L-arginina en el organismo. Las reacciones medidas por NOS, en general, constan de dos etapas de mono-oxigenación, donde el oxígeno molecular utiliza nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como donante de electrones; y las proteínas hemo, flavina mononucleótido (FMN), flavina adenina dinucleótido (FAD), y (6R-) 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactores (Figura 1.7).³⁸ Hay tres diferentes isoformas de la NOS, que se conocen como NOS neuronal (nNOS o NOS I), NOS inducible (iNOS o NOS II), y NOS endotelial (eNOS o NOS III).³⁹

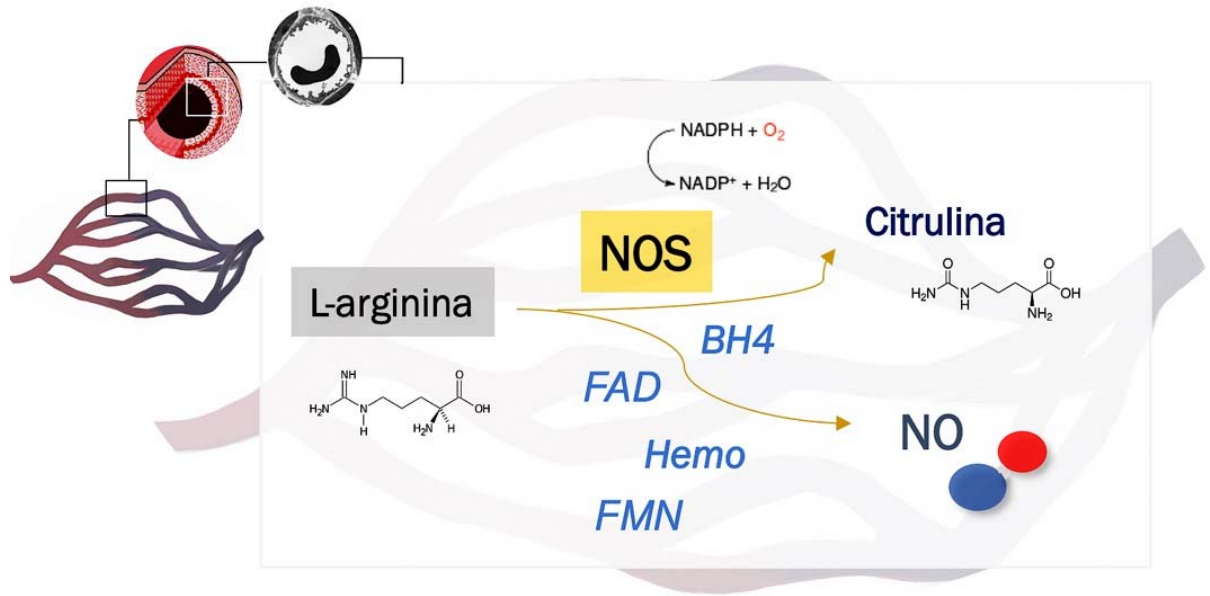


Figura 1.7. Reacción de formación de óxido nítrico (NO) mediado por la enzima NO-sintasa (NOS) a partir de L-arginina y con sus principales cofactores

Las enzimas nNOS y eNOS, también son conocidas como NOS constitutivas, ya que generan y liberan NO en células en estado basal, tal y como se ha visto que ocurre en las células del sistema nervioso y las células endoteliales. Es decir, tanto eNOS y nNOS se expresan constitutivamente generando una concentración de NO basal. De esta manera, mantienen la regulación a largo plazo de la transmisión sináptica, así como la regulación del tono microvascular *in vivo*.³⁵ Tanto eNOS como nNOS aumentan sus actividades respondiendo al aumento de la concentración de calcio intracelular, provocado por la transducción de estimulación mecánica detectada por células endoteliales, o por estimulación glutamatérgica de los núcleos supraquiasmáticos, el sitio del circadiano de mamíferos.^{40,41}

Por otro lado, la iNOS en varios tipos de células como macrófagos, hepatocitos y sinoviocitos, para regular la inflamación y funciones inmunes. La iNOS es inducida por algunos estímulos, entre los que se incluyen las citocinas inmunoestimuladoras, o los productos derivados de bacterias.^{35,38} La iNOS se controla transcripcionalmente y, en conjunto con NADPH oxidasa, genera altas concentraciones de NO y superóxido para formar el radical inestable peroxinitrito (ONOO⁻), con actividad citostática.^{42,43}

1.2.2.1 Transducción enzimática de isoforma endotelial eNOS

La eNOS regula el tono muscular liso y la hemostasia, y puede variar en función de múltiples mecanismos reguladores. Por ejemplo, tanto eNOS como nNOS aumentan su actividad respondiendo al aumento de la concentración de calcio intracelular, provocado por la transducción tras estimulación mecánica como la detectada en las células endoteliales por el “estrés de flujo”. Además, la fosforilación o desfosforilación por varias quinasas y fosfatasas, son clave en la regulación postraduccionales de eNOS, ya que actúan sobre moléculas específicas y son capaces de aumentar o disminuir la actividad eNOS.⁴⁴

1.2.2.2 Isoforma endotelial: Papel del NO como mensajero

El NO es el compuesto al que se atribuye actividad fisiológica de la eNOS, tal y como hemos comentado en párrafos anteriores. El NO puede generarse por varios tipos de células, en este caso las células endoteliales, que actúan como una molécula de señalización mensajera autocrina y paracrina altamente regulada. Debido a su naturaleza no polar y altamente reactiva, puede difundirse en gradientes de hasta ~ 100 μm , con una vida media de pocos segundos. Estas características permiten que el tejido objetivo responda proporcionalmente a la concentración local de NO. Por ejemplo, puede generar vasodilatación focal en respuesta a la turbulencia, focalizada en ciertas zonas de los lechos microvasculares. Sin embargo, es importante saber que la vida media de esta molécula de gas puede variar en función de las reacciones de oxidación y de la cantidad de oxígeno (O_2) y otros reactivos, como los nitratos y nitritos, presentes ocasionalmente en el momento de la transducción.³⁵

1.2.3 Acción del Óxido Nítrico y guanilato-ciclasa (GC) intracelular en las células endoteliales y el músculo liso vascular

Tal y como hemos comentado en apartados previos, el NO tiene diversas funciones vasculares. Sin embargo, es de especial importancia la función del NO en la musculatura lisa vascular, debido a la importante implicación de las células musculares lisas vasculares en la regulación del tono vascular y la homeostasis cardiovascular. El NO difunde a las células del músculo liso vascular y se une a un grupo hemo de la enzima Guanilato Ciclasa (GC), lo que conduce a la formación de guanosina-3,5-monofosfato cíclico (GMPc). Esta acción incrementa la concentración de GMPc celular hasta en 100 veces, permitiendo así la activación de proteína cinasa dependiente de GMPc y el posterior aumento de la salida de calcio (Ca^{2+}) del citosol. Así, se inhibe la maquinaria contráctil y se produce la vasodilatación del vaso sanguíneo (Figura 1.8).

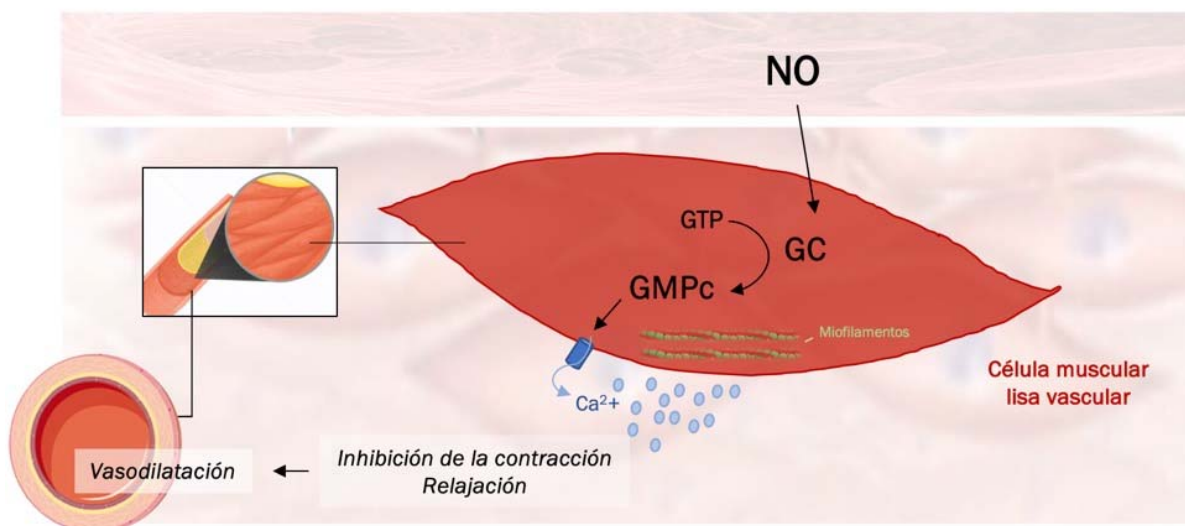


Figura 1.8. Representación de la acción vasodilatadora del GMPc con salida de Ca^{2+} al exterior de la célula, tras acción del NO proveniente de célula endotelial

El GMPc es una molécula de señalización intracelular ubicua que involucra un amplio espectro de procesos celulares y, por tanto, fisiológicos, y van desde el crecimiento celular hasta la apoptosis o la activación de canales iónicos. En el músculo liso vascular, los efectos del GPMc son mediados a través de proteínas kinasas, canales iónicos y fosfodiesterasas. El GMPc hiperpolariza la membrana celular inhibiendo el influjo de calcio y disminuyendo la sensibilidad de los miofilamentos al mismo. El avance en la búsqueda de nuevas terapias moleculares que se dirigen a la vía de transducción de NO se debe en gran parte a una comprensión más detallada de las complejidades bioquímicas y mecánicas de las vías de transducción del NO. Se ha hecho especial hincapié en el papel

regulador del GMPc en el sistema cardiovascular, y en muchos mecanismos homeostáticos vitales, incluida la permeabilidad de las células endoteliales, la contractilidad del músculo liso vascular y la hipertrofia de los cardiomiocitos.³⁶

1.2.4 Variaciones en la concentración endotelial de NO

La disminución de producción de NO, la reducción de su biodisponibilidad de o el aumento de la degradación son las principales causas de la aparición de disfunción endotelial. La regulación de la disponibilidad de NO es compleja y está controlada por numerosos mecanismos que afectan directamente a los niveles de NO, incluida la expresión de eNOS, la presencia de cofactores y sustrato, así como la inactivación química del mismo.⁴⁵

1.2.4.1 Disminución de la actividad enzimática de eNOS

La disminución de la biodisponibilidad de NO puede ser el resultado de una disminución de la expresión de la proteína eNOS y/o una actividad alterada de la eNOS, en presencia de resistencia a la insulina e hiperglucemia, entre otros factores. De manera similar, la disponibilidad limitada de algunos cofactores, puede causar una disminución de las concentraciones de NO, ya que, en esos casos, eNOS no podría ejercer su acción correctamente.

1.2.4.2 Disminución de la biodisponibilidad de NO

Una degradación acelerada de NO también puede versar en una disminución de la biodisponibilidad de NO, como en presencia de niveles elevados de aniones superóxido que reaccionan con NO.⁴⁶ Un ejemplo de situación donde es frecuente hallar menor disponibilidad de NO, es la hiperglucemia típica de la diabetes mellitus. Es lo que denominamos la resistencia al NO. Este concepto es clave en el entendimiento de la respuesta a algunos tratamientos y del pronóstico cardiovascular en pacientes con disfunción endotelial. De esta manera, algunos tratamientos vasodilatadores facilitan la producción de NO pero no son efectivos, debido al estrés oxidativo que impide la acción del NO en las células endoteliales y de músculo liso vascular.

1.3 Disfunción endotelial

1.3.1 Definición

Las células endoteliales vasculares constituyen un órgano estructuralmente simple, pero funcionalmente muy complejo, que regula, tal y como se ha señalado en apartados anteriores, procesos diversos como la hemostasia, la fibrinólisis, la inflamación, la presión arterial, o la angiogénesis. Las alteraciones que se presentan en uno o más de estos fenómenos fisiológicos es lo que se conoce como disfunción endotelial.⁴⁷ La disfunción endotelial se caracteriza pues, por un cambio en las funciones del endotelio, y viene marcada por una vasodilatación reducida, un estado proinflamatorio y propiedades protrombóticas. El estrés oxidativo es un mecanismo decisivo en el desarrollo de la disfunción del endotelio vascular. Se caracteriza por un exceso de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son un grupo de pequeñas moléculas que juegan un papel crucial en distintos procesos celulares. El deterioro de la función endotelial vascular se asocia con la mayoría de variantes de la enfermedad cardiovascular, como la hipertensión, diabetes, o insuficiencia renal crónica.³ Además, la disfunción endotelial es un marcador temprano de algunas alteraciones, como la aterosclerosis, en la que el malfuncionamiento del endotelio precede incluso a la evidencia angiográfica o ultrasónica de la placa aterosclerótica. El estrés oxidativo, presente en muchas de estas alteraciones metabólicas, lleva a una alteración de la producción de NO y a una disfunción endotelial vascular. Cabe destacar que la evidencia científica ha relacionado también la disfunción endotelial con condiciones prediabéticas, como es el caso de la glucemia basal alterada o la tolerancia a la glucosa alterada.⁴⁸ De una forma sencilla, podríamos decir que la disfunción endotelial debida a factores de riesgo cardiovascular y otros procesos que analizaremos a continuación, conduce a la presencia de enfermedad y comorbilidad cardiovascular (Figura 1.9).



Figura 1.9. Esquema simplificado de la secuencia de acontecimientos en pacientes con factores de riesgo cardiovascular y disfunción endotelial

1.3.2 Causas de disfunción endotelial

Existen diversas causas que puede conducir a una disfunción del endotelio vascular, mediante la acción de distintos mecanismos. Los efectos sobre la producción y biodisponibilidad de NO, tal y como señalamos en el *apartado 1.2*, son los más destacables y en los que se centra gran parte de la investigación sobre la disfunción del endotelio vascular. Nuevas vías están siendo estudiadas para dilucidar otros aspectos de la fisiopatogenia de dicha disfunción. En este apartado, comentaremos las situaciones y/o enfermedades que pueden influir negativamente sobre la homeostasis vascular medida por el endotelio. Las alteraciones moleculares concretas por las que estas enfermedades pueden alterar la biodisponibilidad de NO y por ende la correcta función del endotelio vascular, se analizarán con mayor detalle en el *apartado 1.3.3*.

1.3.2.1 Trastornos metabólicos

Los trastornos metabólicos, incluyendo la hipertensión arterial, hiperlipidemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia así como la resistencia a la insulina, tienen relación entre sí y pueden afectar la función endotelial al alterar la síntesis o degradación de NO, entre otras causas. En primer lugar, podemos decir que, tanto en la hipertensión arterial como en otros factores de riesgo cardiovascular, existen niveles elevados de radicales libres oxidativos. El estrés oxidativo conduce con el tiempo a una disfunción endotelial, que pueden empeorar a su vez la hipertensión arterial y otras enfermedades. De este modo, encontramos dos mecanismos, la enfermedad cardiovascular basal y la disfunción endotelial progresiva, que se retroalimentan y se refuerzan positivamente.

1.3.2.2 Inflamación

Los procesos inflamatorios y los mediadores liberados durante los mismos pueden alterar también la función del NO. En situaciones que cursan inflamación sistémica notoria, la biodisponibilidad de NO disminuiría. Además, NO dejará de inhibir la transcripción de factores pro-aterogénicos y se producirá una situación de aterosclerosis acelerada, tal y como veremos detalladamente en los siguientes apartados. Las situaciones de inflamación pueden darse por muy distintas causas, desde infecciones agudas o crónicas y patologías autoinmunes, hasta enfermedades cardiovasculares capaces de crear un “estado inflamatorio”.⁴⁵

En los pacientes con factores de riesgo cardiovascular, encontramos con frecuencia la coexistencia de hipertensión arterial, dislipemia o diabetes, todas ellas agravadas a su vez por la obesidad. En el tejido adiposo, en condiciones de obesidad, los adipocitos secretan citocinas proinflamatorias, facilitando el estado de inflamación sistémica. Las vías exactas que conducen a un estado proinflamatorio del tejido adiposo no se han identificado todavía con exactitud. Una hipótesis vigente actualmente es la producción de citocinas y el aumento de la expresión de las mismas por la acción de los macrófagos. Este “estado inflamatorio”, puede deteriorar la función del endotelio y retroalimentar el desarrollo de otras patologías de índole cardiovascular.

En el caso de las infecciones bacterianas, un ejemplo de desencadenante de inflamación importante sería el lipopolisacárido de la pared celular bacteriana, que es capaz también de interactuar con celular endoteliales. En cuanto a las infecciones víricas, por su importancia en la situación sanitaria actual, destacaremos el papel del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2) en la disfunción del endotelio vascular, altamente frecuente en la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) y responsable de muchas complicaciones y comorbilidades asociadas a esta infección en humanos (Figura 1.10).^{49,50,51}

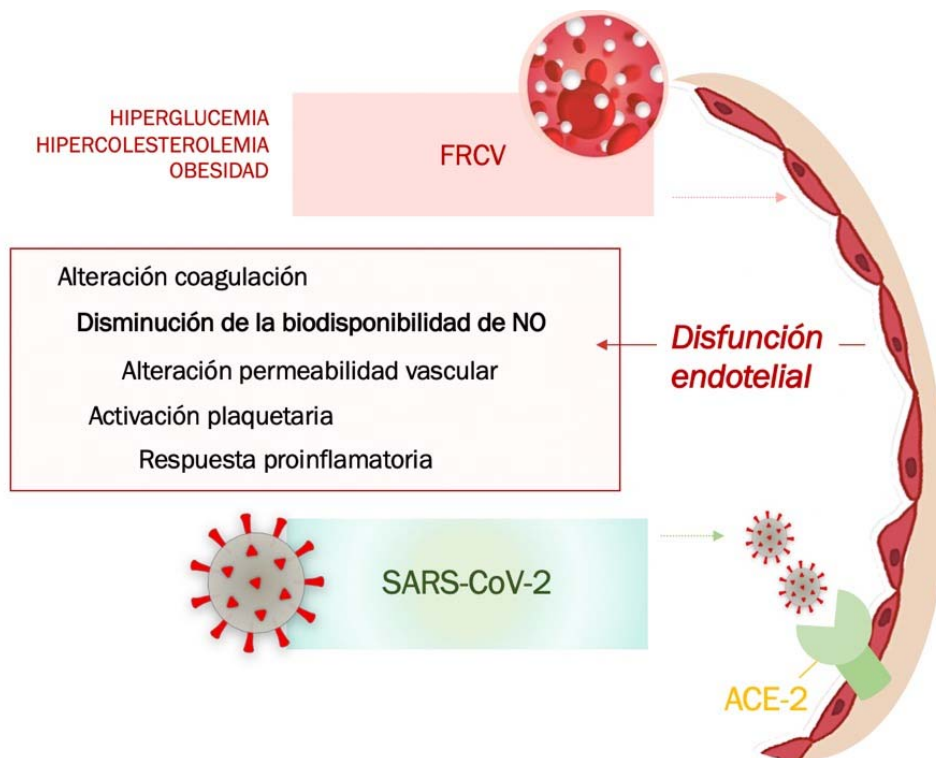


Figura 1.10. Disfunción endotelial mediada por SARS-Cov-2 y por factores de riesgo cardiovascular, resaltando la disminución de la biodisponibilidad de NO

1.3.2.3 Estrés mental

Además de los factores de riesgo clásicos de disfunción del endotelio vascular, existen otros factores adicionales identificados en los últimos años, incluyendo el estrés mental. La disfunción endotelial relacionada con el estrés mental es un factor de riesgo temprano que predice el desarrollo de trastornos cardiovasculares graves. Incluso los episodios breves de estrés mental, similares a los que pueden ocurrir en la vida cotidiana, causan una disfunción transitoria. Además del efecto en la enzima eNOS, es importante destacar el papel de la ET-1, que aumenta y contrarresta la acción vasodilatadora del NO, ejerciendo un potente efecto vasoconstrictor. El estrés mental crónico altera la función endotelial también al afectar a los niveles de citocinas proinflamatorias y de los opioides endógenos (morfina, endomorfina, metionina, encefalina y nociceptina), que ejercen efectos negativos y beneficiosos sobre el endotelio, respectivamente. Además, las catecolaminas epinefrina y norepinefrina, liberadas por el sistema nervioso simpático, son otro mediador importante de la disfunción endotelial inducida por estrés. Tanto en los estudios *in vivo* como los *in vitro*, las catecolaminas han demostrado que no afectan la función endotelial *per se*, pero el estrés repetitivo o crónico puede conducir a un aumento de la presión arterial a través de la participación de las catecolaminas, lo que nos lleva a un endotelio deteriorado con el paso del tiempo. La inhibición de la producción de cortisol y ET-1 tras modificar el estilo de vida, puede ayudar a tratar la disfunción endotelial relacionada con el estrés.⁵²

1.3.2.4 Envejecimiento celular

El envejecimiento contribuye al deterioro progresivo de la función endotelial, por lo que es un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La disfunción endotelial relacionada con el envejecimiento implica un aumento del estrés oxidativo, activación de vías inflamatorias mediadas por factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y NF κ B, y deterioro de la regeneración de las células endoteliales. Específicamente, la senescencia celular es una forma especializada de detención del crecimiento confinada a las células mitóticas, inducida por diversos estímulos y caracterizada por remodelación de la cromatina, y aumento de la actividad de la β -galactosidasa y autofagia.

Se han propuesto múltiples mecanismos responsables de la senescencia celular, aunque el más importante parece ser el acortamiento de los telómeros. La telomerasa

transcriptasa inversa (TERT) es la enzima que contrarresta el acortamiento de los telómeros y su expresión es constitutiva solo en células neoplásicas y germinales, incluidas las células progenitoras endoteliales (CPE) y las células endoteliales cultivadas in vitro. La disminución de la actividad del TERT acelera la senescencia celular, y esto puede ser causado por una menor biodisponibilidad de NO y un aumento del estrés oxidativo.⁵³ La reducción de NO, resultante de la disminución de la actividad de eNOS, se asocia con niveles reducidos de lipoproteína de alta densidad (HDL) y factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) en personas de edad avanzada.

Otra consecuencia del envejecimiento es la regeneración insuficiente de las células endoteliales. Un número menor de CPE está relacionado con la apoptosis y necrosis de las células endoteliales que se producen en el envejecimiento. Sin embargo, la reducción de la movilidad de las CPE está probablemente relacionada con una menor producción de NO en células endoteliales envejecidas.

Existe además un interés emergente en la proteína klotho, cuyo gen es considerado como un nuevo gen antienvjecimiento. Es una proteína transmembrana de 130kDa que se expresa predominantemente en el riñón (túbulo distal, proximal y colector), en la glándula paratiroidea, en plexo coroideo y también a nivel endotelial. En algunos estudios recientes, se ha visto que podría proteger el sistema cardiovascular aumentando la producción de NO e inhibiendo el estrés oxidativo.^{54,55}

1.3.2.5 Fármacos

Los fármacos usados en terapias antineoplásicas también pueden causar disfunción endotelial. La quimioterapia puede inducir toxicidad vascular al inducir la desregulación del tono y constricción de los vasos sanguíneos, apoptosis de células endoteliales y producción de citocinas proinflamatorias que reducen la formación de NO. Estos acontecimientos pueden favorecer la aparición de hipertensión arterial, aumento de la permeabilidad vascular, trastornos autonómicos y trombosis de grandes y pequeños vasos. La radioterapia también causa deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio en las arterias expuestas a la radiación, al reducir el NO derivado del endotelio, con la consecuente disfunción endotelial y desregulación de la homeostasis vascular, destacando la agregación plaquetaria y aumento de la adhesión de leucocitos a la superficie endotelial.

1.3.3 Alteraciones moleculares implicadas en la disfunción endotelial

1.3.3.1 Alteración de la función de la eNOS

1.3.3.1.1 Disminución de BH4

En algunas ocasiones, eNOS produce superóxido en lugar de NO, reacción que puede estar ocasionada por el déficit del cofactor BH4. Cuando la concentración de arginina (sustrato) o BH4 (cofactor) desciende, eNOS genera superóxido en lugar de la reacción habitual de producción de NO. El superóxido formado en las reacciones mediadas por eNOS con desacoplamiento enzimático, reacciona con el. Esto lleva a una reducción de la biodisponibilidad del NO y a procesos enzimáticos que deterioran directamente el endotelio vascular. Las células en el ser humano, generan BH4 por medio de la acción de la enzima guanosina trifosfato ciclohrolasa I (GTPCHI).⁵⁶ Algunos estudios de fisiología han demostrado una disminución marcada de las cantidades de GTPCH I, y de BH4, en algunas patologías. Estas circunstancias patológicas que se pueden englobar en el llamado síndrome metabólico, incluyen la resistencia a la insulina, cifras de colesterol en sangre elevadas, o pacientes fumadores con alto consumo de paquetes/año.⁵⁷ Asimismo, el aumento de las moléculas de LDL-ox típico de pacientes con hipercolesterolemia o resistencia a la insulina, así como el incremento de algunas citoquinas inflamatorias como el TNF- α , podrían ser la causa de la escasa cuantía de GTPCH I y BH4.⁵⁸ El estrés oxidativo habitual en estos trastornos metabólicos, mediante los radicales libres como ONOO-, puede disminuir la concentración celular BH4 de forma directa, transformándola en el radical inactivo "B3". El estrés mental agudo, señalado en el apartado anterior, junto a otros factores de reciente descubrimiento, están también implicado en el desacoplamiento de eNOS. La disfunción endotelial por estrés mental está mediada por el aumento de glucocorticoides y ET-1, que dan como resultado la depleción de BH4, y la consecuente reducción de la expresión de ARNm y las proteínas que componen eNOS (Figura 1.11).

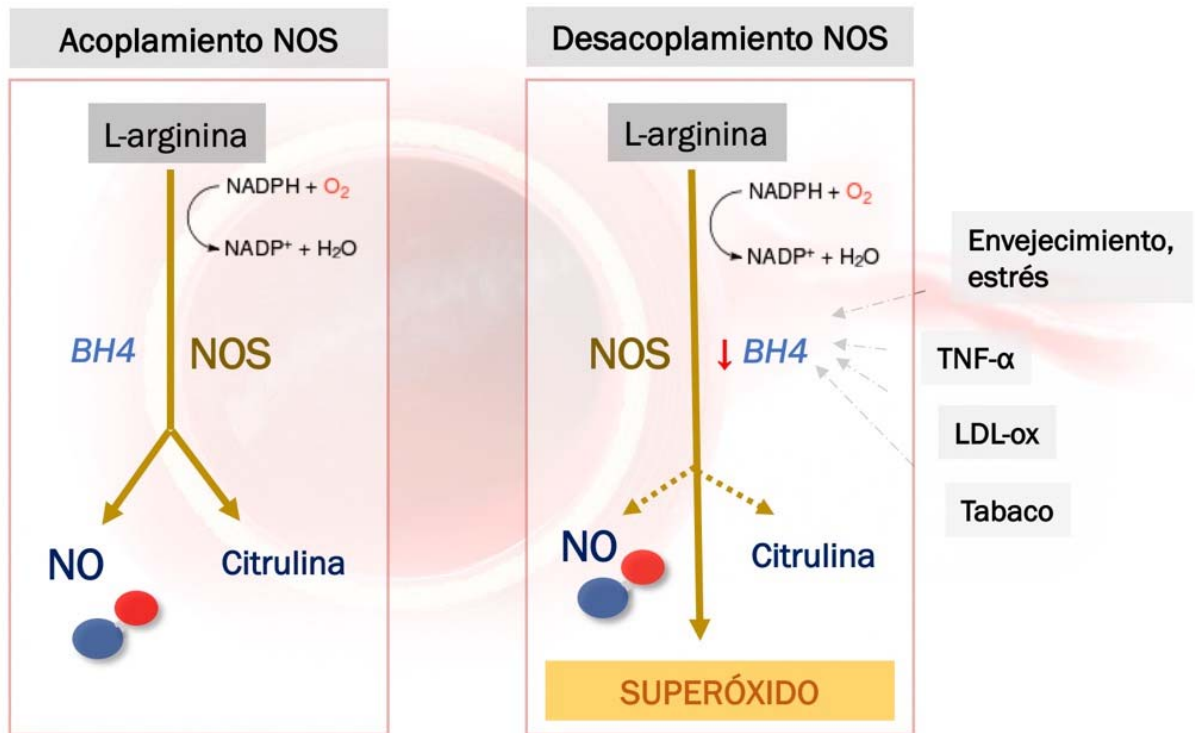


Figura 1.11. Acoplamiento y desacoplamiento de la enzima eNOS. El desacoplamiento de NOS conduce a la formación de radicales libres como el superóxido

La aparición de enfermedad cardiovascular sólo en algunos individuos del total que presentan factores de riesgo cardiovascular, podría explicarse, entre otras cosas, por la mayor o menor depleción de cofactor BH4.

1.3.3.1.2 Inhibición eNOS por dimetilarginina asimétrica

La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un aminoácido que se halla en células y tejidos del organismo. Puede circular en el plasma y se excreta normalmente por la orina. La molécula ADMA se sintetiza en las células endoteliales, gracias a la arginina, mediante a enzima arginina metil transferasas (PRMTs), concretamente la PRMT-1. El papel del ADMA en la disfunción endotelial se debe a su capacidad de disminuir la síntesis de NO. La expresión y actividad de la enzima PRMT-1 en las células endoteliales puede cambiar en función de distintos estímulos.

En primer lugar, las concentraciones de esta proteína aumentan en respuesta al denominado “estrés de flujo”. Es por esto que en los casos en los que la PRMT-1 presenta mayor actividad, la concentración de ADMA en células endoteliales será mayor. Si la cantidad de ADMA aumenta, la producción de NO disminuirá (Figura 1.12).⁵⁹

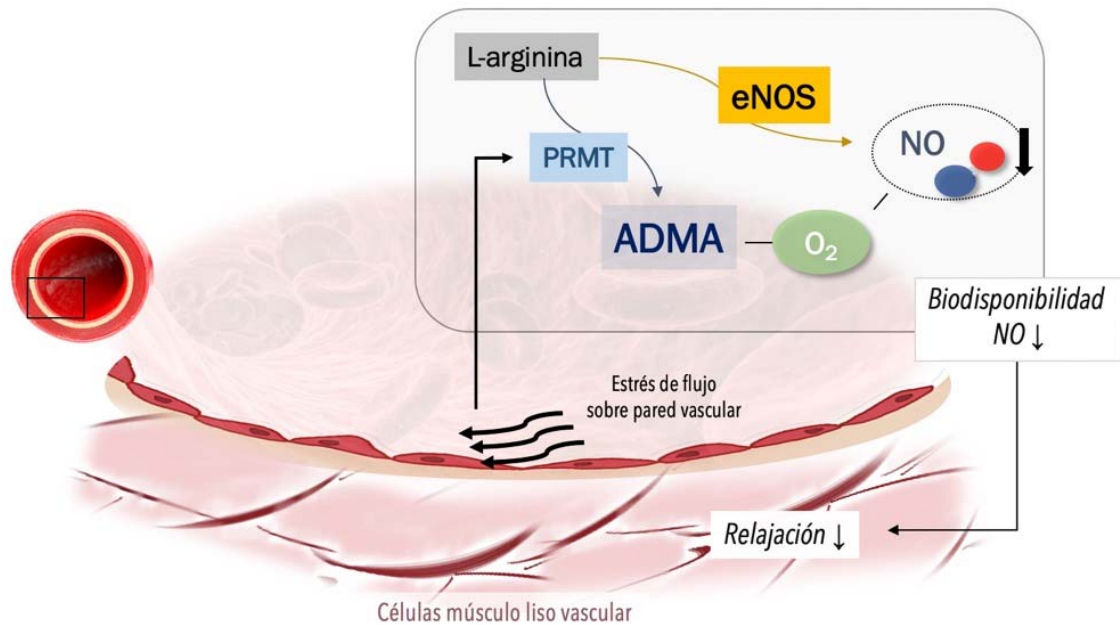


Figura 1.12. Representación del aumento de la formación de ADMA y disminución de la biodisponibilidad de NO por el estrés de flujo sobre la pared vascular

En segundo lugar, la función de ADMA puede ser disminuida o aumentada, gracias a los denominados “inhibidores $\kappa\beta$ ($I\beta$)”. Una función importante del NO en la célula endotelial es mantener estable la unión del NFKB con su inhibidor (IkB) en el citosol, en forma de homodímeros o de heterodímeros. Así, la disminución de la biodisponibilidad de NO en endotelio separa IkB de FNKB, y este emigra al núcleo celular. El NFKB es crucial para regular transcripción de varios genes implicados en el desarrollo de la aterosclerosis. Cuando existe un estímulo para que el NFKB se separe de IkB, como el TNF, o la interleukina 1 (IL1), liberados en ciertas situaciones de inflamación sistémica nombradas con anterioridad, activan la IkB kinasa, que fosforila al IkB, separándolo del NFKB. Una vez liberado de su inhibidor, el NFKB se trasloca al núcleo, donde activa diversos genes, que expresan moléculas de adhesión endotelial, particularmente ICAM-1 y E-selectina. NFKB también regula la liberación del factor estimulante de macrófagos, que favorece la diferenciación de los monocitos a macrófagos, y de otras proteínas que median en el proceso aterogénico. Por tanto, los estados inflamatorios pueden conducir a una alteración de la disponibilidad de NO y un aumento de la actividad NKBK con posterior estado pro-aterogénico.⁵⁹

En tercer lugar, se ha evidenciado que la coexistencia de varios factores de riesgo cardiovascular (hipercolesterolemia, estados inflamatorios, hiperhomocisteinemia, etc) también podría tener influencia en la actividad de la enzima que metaboliza a la ADMA,

la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH), mediante una reacción que favorezca el estrés oxidativo.⁶⁰ Las concentraciones de la ADMA intracelular aumentan de forma significativa en algunos de esos casos pre-patológicos, debido a un aumento de la actividad de la DDAH. El déficit de NO por el aumento de la DDAH y por tanto de la ADMA, podría conducir después, a una alteración de la función endotelial. Por todo esto, se puede establecer una relación clara entre la presencia de factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de los mismos en los casos en los que haya elevación de la concentración de ADMA.^{61,62}

Por último, es interesante también el papel del ADMA a nivel clínico como factor pronóstico de algunas patologías pulmonares y cardiovasculares en recién nacidos pretérmino, asociadas a una disfunción del endotelio debida a la prematuridad⁶³, o de pacientes con insuficiencia renal y factores de riesgo cardiovascular asociados.⁶⁴

1.3.3.1.3 Arginina

La arginina es uno de los sustratos de la eNOS, y es necesaria para que puede llevar a cabo su actividad. La arginasa es una enzima encargada de la conversión de la arginina a ornitina, y de esta a la úrea. Si la actividad de la arginasa aumenta, la arginina disminuye, y la eNOS disminuye su actividad, produciendo menor NO. Esta enzima puede presentarse en dos isoformas: la arginasa I que se expresa constitutivamente en las células endoteliales, y la arginasa II, que puede ser inducida, también en células endoteliales, por el lipopolisacárido y el interferon- γ . El lipopolisacárido y el interferon- γ , pueden aumentar su concentración en el organismo durante algunos procesos infecciosos o inflamatorios, de forma aguda o crónica. La LDL-ox también es capaz de aumentar la concentración de arginina. Es decir, en algunas enfermedades, sistémicas o más concretas del sistema vascular, se podría observar un aumento importante en los niveles de la arginasa, lo que derivaría en una disminución significativa del sustrato de eNOS y por tanto de la concentración de NO. Estas enfermedades pueden ser de origen infeccioso, tal y como señalamos anteriormente, o crónico, como la artritis reumatoide o la diabetes mellitus tipo 2, en las que se genera inflamación de bajo grado de a largo plazo.

1.3.3.1.4 Caveolas.y caveolinas

Diferentes estudios realizados por distintos investigadores demostraron que la actividad enzimática de eNOS depende de su ubicación. Una localización clave son las

caveolas. Las caveolas son una estructura de la membrana plasmática que está presente en algunos tipos celulares, con mayor frecuencia en las células endoteliales y en los adipocitos. Están constituidas por invaginaciones especializadas de la membrana, y sus componentes principales son el colesterol, los glicoesfingolípidos, y algunas proteínas estructurales como la caveolina.⁶⁵

Algunos estímulos extracelulares ponen en marcha la transducción de algunos procesos celulares mediante esta estructura. Cuando eNOS se encuentra en el interior de las caveolas, su actividad enzimática queda disminuida, ya que la caveolina-1, una proteína que compone en las caveolas, inactiva a eNOS. La caveolina-1 es una proteína integral de la membrana plasmática celular, que se une a eNOS mediante un enlace que impide la interacción de la misma con la calmodulina, cuando los niveles intracelulares de calcio se encuentran bajos. A parte de lo niveles de calcio, los niveles de LDL-ox también podrían condicionar la actividad de eNOS. Cuando la LDL-ox se encuentra elevada, ocasiona una disminución del contenido de colesterol en las caveolas, lo que conduce a la traslocación de la caveolina-1 junto a la enzima eNOS, y, por tanto, en la inhibición de su actividad.^{66,67} Asimismo, se ha demostrado que el suero hipercolesterolémico y la LDL no modificada son capaces de regular al alza la cantidad de caveolina-1, aumentando de esta manera la formación de complejos entre eNOS y esta proteína, y disminuyendo finalmente la producción de NO (Figura 1.13).⁶⁸

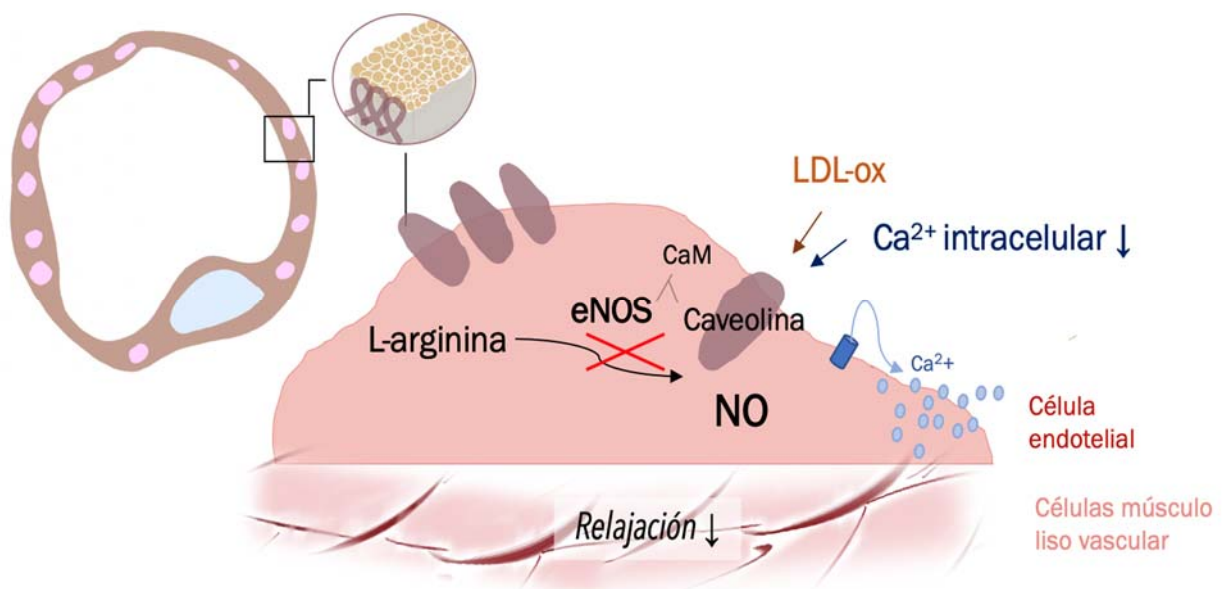


Figura 1.13. Dibujo ilustrativo de las caveolas presentes en la membrana plasmática de células endoteliales (izquierda y arriba-izquierda) y reacción de eNOS inhibida por la unión a la Caveolina tras ciertos estímulos

1.3.3.2 Disminución de la biodisponibilidad de NO

1.3.3.2.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo juega un papel esencial en la disfunción del endotelio vascular y en el mecanismo fisiopatológico de ciertas patologías, ya que disminuye la disponibilidad de NO. El análisis del estrés oxidativo está cobrando importancia en los estudios de las vías que afectan a la homeostasis vascular. Por un lado, tal y como describimos previamente, los radicales libres oxidativos liberados en ciertas patologías, pueden aumentar la concentración de ADMA y el desacoplamiento de eNOS, y ambas cosas culminan en una reducción del NO disponible. Por otra parte, y como veremos a continuación, los radicales libres pueden actuar directamente sobre el NO, disminuyendo su disponibilidad, a pesar de encontrarse éste en su rango normal.

Los niveles de NO pueden encontrarse dentro del rango normal y aún así, bajo ciertas circunstancias, la biodisponibilidad podría ser baja, impidiendo así su correcta función. Existen diversas situaciones en las que podría darse la baja biodisponibilidad de NO. El factor más conocido, es la formación de ONOO⁻ en lugar de NO, cuando el estrés oxidativo en las células es elevado. Por ejemplo, en los casos de hiperlipidemia o hiperglucemia, el exceso de LDL en plasma culmina en una mayor producción de LDL-ox, y un estado de estrés oxidativo que desencadena la formación de superóxidos, como el peroxinitrito, reduce de esta manera los efectos beneficiosos del NO. Tanto el NO como el superóxido son radicales libres. Cuando estos dos últimos se encuentran expuestos el uno al otro, experimentan una reacción a una velocidad muy elevada. La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima capaz de eliminar superóxido, pero, en una célula en donde coexistan tanto NO, como superóxido y SOD, el superóxido es susceptible de reaccionar con cualquiera de los otros compuestos, dependiendo de las concentraciones a las que se encuentren. El superóxido podría, por tanto, reaccionar con el NO antes que con la SOD, con una velocidad de reacción mayor y disminuir su concentración intracelular. Es por esto que el superóxido es clave en la baja biodisponibilidad del NO en los estados de estrés oxidativo alto, que acontecen en algunos pacientes con factores de riesgo cardiovascular.

1.3.3.2.2 *Estrés hiperglucémico*

La hiperglucemia por si misma puede aumentar la producción de radicales libres de oxígeno mediante el aumento del metabolismo del ácido araquidónico. En células aórticas endoteliales humanas, aunque la exposición a altas concentraciones de glucosa puede elevar de la misma manera la producción de anión superóxido, lo que inactiva directamente la molécula de NO. Además, el estrés hiperglucémico prolongado ocasiona la acumulación de productos de glucosilación avanzada, los cuales también son capaces de suprimir las funciones biológicas del NO. En experimentos in vitro, se demostró que alteración en la capacidad de relajación dependiente del endotelio en ratas diabéticas puede ser parcialmente restablecida por medio de la administración de aminoguanidina, un inhibidor de la formación de los productos avanzados de la glucosilación. Por tanto, es fácilmente demostrable la estrecha relación que existe entre la diabetes mellitus y la disfunción endotelial.

1.3.4 **Marcadores circulatorios de disfunción endotelial**

Los niveles de moléculas de origen endotelial circulantes en sangre circulante podrían ayudarnos a entender mejor las numerosas funciones del endotelio vascular. Estas moléculas incluyen productos directos de células endoteliales que se liberan cuando se activa el endotelio, como el NO, citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión, o marcadores de daño y reparación endotelial. Muchos de estos marcadores circulatorios son difíciles y muy costosos de medir, y actualmente solo se utilizan en el ámbito de la investigación clínica. Sin embargo, en el futuro estas medidas podrían proporcionar información importante sobre los mecanismos y la gravedad de la disfunción endotelial.⁴⁷

Por un lado, los niveles circulatorios de nitritos y proteínas nitrosiladas reflejan una parte de la generación endotelial de NO, pero son difíciles de medir y es posible que no representen en todos los casos la producción endotelial de NO. Asimismo, la ADMA, antagonista competitivo derivado de forma endógena de la enzima NOS, presenta niveles elevados en suero medibles, en sujetos con alteración de la función endotelial.^{69,70,71} También se ha asociado en algunos estudios reumatológicos, niveles elevados de ADMA con el pronóstico de enfermedades que cursan con cierto grado de inflamación sistémica.^{72,73,74} A los niveles elevados de ADMA, se asocia con una reducción de la biodisponibilidad de NO tanto en estudios animales como en estudios clínicos. Este aumento de ADMA está en parte causado por la actividad reducida de su enzima de

degradación DDAH, que es extremadamente sensible a la alteración celular. La alteración de células endoteliales puede darse en las condiciones de oxidación – reducción (redox) que normalmente acompañan a los factores de riesgo cardiovascular y la inflamación. Debido a que los niveles de ADMA se han relacionado con el nivel de enfermedad aterosclerótica preclínica y un pronóstico clínico peor, podría ser una medida útil del estado de salud endotelial y un marcador de riesgo en la práctica clínica diaria.^{63,64}

Por otro lado, la activación de las células endoteliales conduce a una mayor expresión de citocinas inflamatorias y moléculas de adhesión que desencadenan la adhesión y la migración de los leucocitos al espacio subendotelial. Este proceso es fundamental para el inicio, la progresión y la desestabilización de la lesión aterosclerótica. Las moléculas bien caracterizadas que pueden medirse en la circulación con inmunoensayos comerciales incluyen E-selectina, ICAM 1, y P-selectina. La E-selectina es probablemente la proteína más específica de activación de las células endoteliales. Los niveles aumentan en asociación con factores de riesgo cardiovascular y se han asociado con valores y medidas estructurales y funcionales de enfermedad aterosclerótica, así como con un mal pronóstico cardiovascular.⁷⁵ En el caso de la retinopatía diabética, complicación microvascular más frecuente de la diabetes, los niveles altos de E-selectina fueron factor predictor de desarrollo de la retinopatía, según *Kaszca et al.*⁷⁶ De manera similar, las alteraciones procoagulantes de la activación endotelial se pueden medir como un cambio en el equilibrio del activador del plasminógeno tisular y su inhibidor endógeno, el inhibidor de la activación del plasminógeno. Además, el factor von Willebrand, una glicoproteína derivada principalmente del endotelio, se libera a la circulación desde células endoteliales activadas. Este factor tiene como función la activación celular, de la coagulación y de las plaquetas, y se puede medir con relativa facilidad.⁷⁷

En tercer lugar, resaltaremos el papel de las células progenitoras y circulantes endoteliales. El mayor conocimiento de la función endotelial y su relación con el grado de lesión y reparación celular, ha llevado al desarrollo de estudios que cuantifican las CPE, el desprendimiento de células endoteliales maduras y de ciertas micropartículas sanguíneas. Las micropartículas derivan de diferentes tipos de células, incluyendo plaquetas, glóbulos rojos, granulocitos, monocitos, linfocitos y células endoteliales. Las micropartículas endoteliales son vesículas formadas por la membrana celular tras de la activación endotelial.⁷⁸ Por un lado, las células endoteliales circulantes maduras se pueden distinguir de las CPE circulantes, dependiendo de su tamaño y de la expresión de

marcadores de superficie. Las CPE son una población heterogénea que puede tener distintos grados de maduración, y juegan un papel fundamental en la formación y regeneración del endotelio vascular. Si hay isquemia en alguna localización, se induce la transcripción de citoquinas pro-angiogénicas como el factor derivado del estroma 1 y el VEGF. Estas citoquinas, gracias a sus respectivos receptores CXCR4 y VEGFR-2 de las células endoteliales, participan en la movilización de las CPE desde la médula ósea hasta el tejido isquémico. El grado de enfermedad cardiovascular y la inflamación vascular podría tener una relación directa la movilidad de las CPE en circulación periférica. Es necesaria una mejor caracterización de estas células y sus marcadores. Por otro lado, la sobreproducción de micropartículas endoteliales se ha relacionado con diversos factores fisiológicos y condiciones fisiopatológicas como la adhesión celular de plaquetas a endotelio, apoptosis, respuesta inmune exagerada, mala función vascular, remodelación vascular y angiogénesis, así como en infecciones y neoplasias. La detección de estas micropartículas endoteliales podría utilizarse como herramienta de diagnóstico y como factor pronóstico en la diabetes u otras condiciones que cursen con disfunción endotelial. Algunos estudios han demostrado incremento significativo de micropartículas celulares en pacientes diabéticos en comparación con sujetos sanos.⁷⁹ Asimismo, en el futuro, podrían suponer una diana terapéutica novedosa en el tratamiento de algunas enfermedades vasculares.^{80,81}

1.4 Diabetes Mellitus y mecanismos de disfunción endotelial

1.4.1 Diabetes Mellitus: importancia e impacto en la salud vascular

La diabetes es un problema de salud mundial, caracterizado por una secreción deficiente de insulina y resistencia a la insulina. La insulina es una hormona que regula los niveles de glucosa en sangre y juega un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis vascular. La resistencia a la insulina se define como una sensibilidad alterada a la capacidad de respuesta tras la estimulación de la insulina en los tejidos diana, incluidos el músculo, el tejido adiposo y el hígado.^{82,83} La característica que define a la diabetes es la presencia de hiperglucemia. Las formas más comunes de diabetes son la diabetes tipo 1, en la que se produce una deficiencia absoluta de insulina como consecuencia de la destrucción de las células beta pancreáticas; y la diabetes tipo 2, en la que la resistencia a la insulina puede provocar hiperglucemia.⁸⁴ La obesidad es un factor de riesgo importante para la diabetes tipo 2 y está aumentando considerablemente en los

últimos años. Según la Federación Internacional de Diabetes, se estima que el número de personas con diabetes aumentará de 425 millones en la actualidad a más de 600 millones en 2045. La diabetes conlleva un riesgo significativo de patologías microvasculares, como retinopatía^{85,86,87}, neuropatía⁸⁸, pie diabético^{89,90}, nefropatía⁹¹, y de patologías macrovasculares (Figura 1.14).⁹² Además, cabe destacar que el riesgo relativo de enfermedad cardiovascular aumenta de dos a cuatro veces en pacientes con diabetes en comparación con los pacientes sin diabetes.^{48,93}

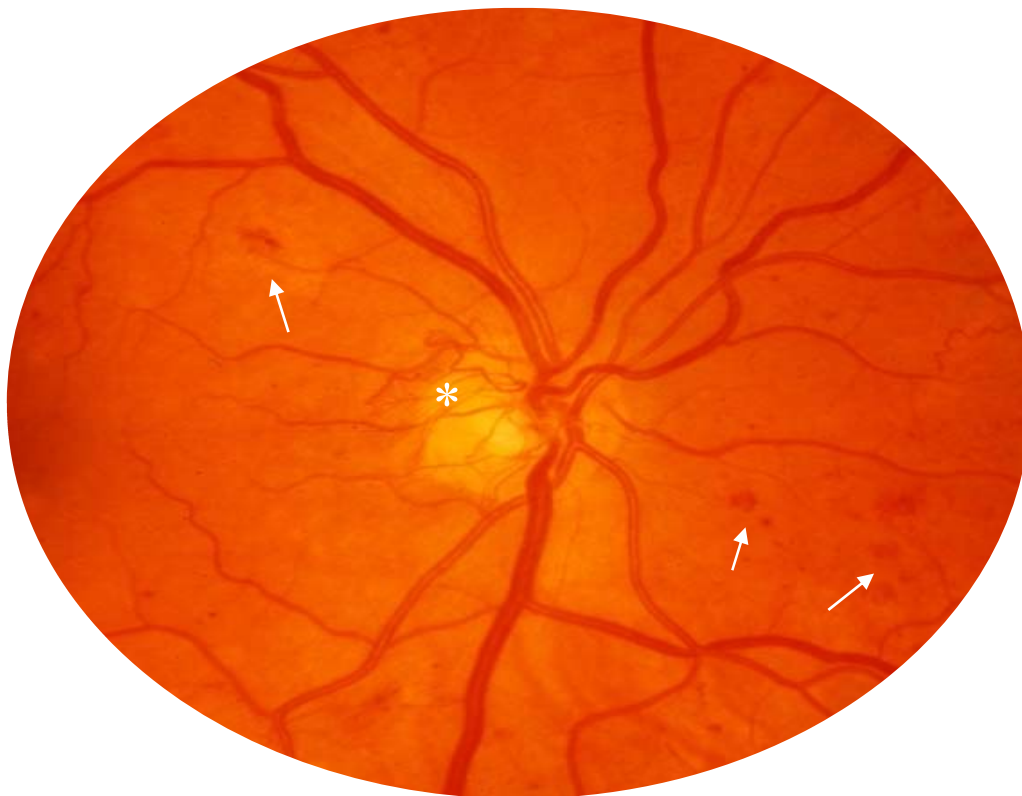


Figura 1.14. Fotografía en color de fondo de ojo mostrando retinopatía diabética proliferativa. Se observa neovascularización en disco óptico (asterisco) y hemorragias intrarretinianas dispersas (flechas). Esta imagen se publicó originariamente en Retina Image Bank. Michael P. Kelly. "Proliferative Diabetic Retinopathy". Retina Image Bank. 2012. 773. © the American Society of Retina Specialists.

La diabetes tipo 2 tiene una asociación estrecha con el síndrome metabólico. El síndrome metabólico es un grupo de trastornos que se presentan al mismo tiempo y aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2.^{94,95} Las enfermedades cardiovasculares representan una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.⁹⁶ Es por esto que es interesante conocer la fisiopatogenia y realizar un abordaje clínico y farmacológico adecuado en esos pacientes.⁹⁷ Los trastornos del síndrome metabólico incluyen el aumento de la presión arterial, niveles elevados de

glucosa en sangre, obesidad, y valores anormalmente altos de colesterol o triglicéridos.^{94,98} La resistencia a la insulina puede ser responsable de los trastornos metabólicos y cardiovasculares, conocidos en su conjunto como síndrome metabólico. La alteración de la señalización de la insulina conduce a intolerancia a la glucosa, diabetes, dislipemia y cardiopatía isquémica.⁹⁹ Además, la alteración del tejido adiposo, causada principalmente por la obesidad, facilita la liberación de moléculas bioactivas, incluyendo el TNF-alfa y la IL1 beta, y disminuye la adiponectina, contribuyendo así a la instauración de las enfermedades englobadas en el síndrome metabólico.⁹⁴ Uno de los puntos comunes de estas afecciones, son el estrés oxidativo y la disfunción endotelial. Existe un solapamiento de las diferentes causas de disfunción endotelial en estas enfermedades (Figura 1.15). Por ejemplo, los ácidos grasos libres o la LDL-ox, tal y como describimos anteriormente, deterioran la función del endotelio, y se pueden encontrar en situaciones de hipercolesterolemia o de resistencia a la insulina. La disfunción endotelial producida por la LDL-ox, contribuiría a su vez al desarrollo de trastornos cardiovasculares adicionales en esos individuos. De hecho, algunos autores consideran que el estrés oxidativo y la consecuente disfunción del endotelio juega un papel crucial en la fisiopatología del síndrome metabólico y todas las enfermedades que engloba.¹⁰⁰

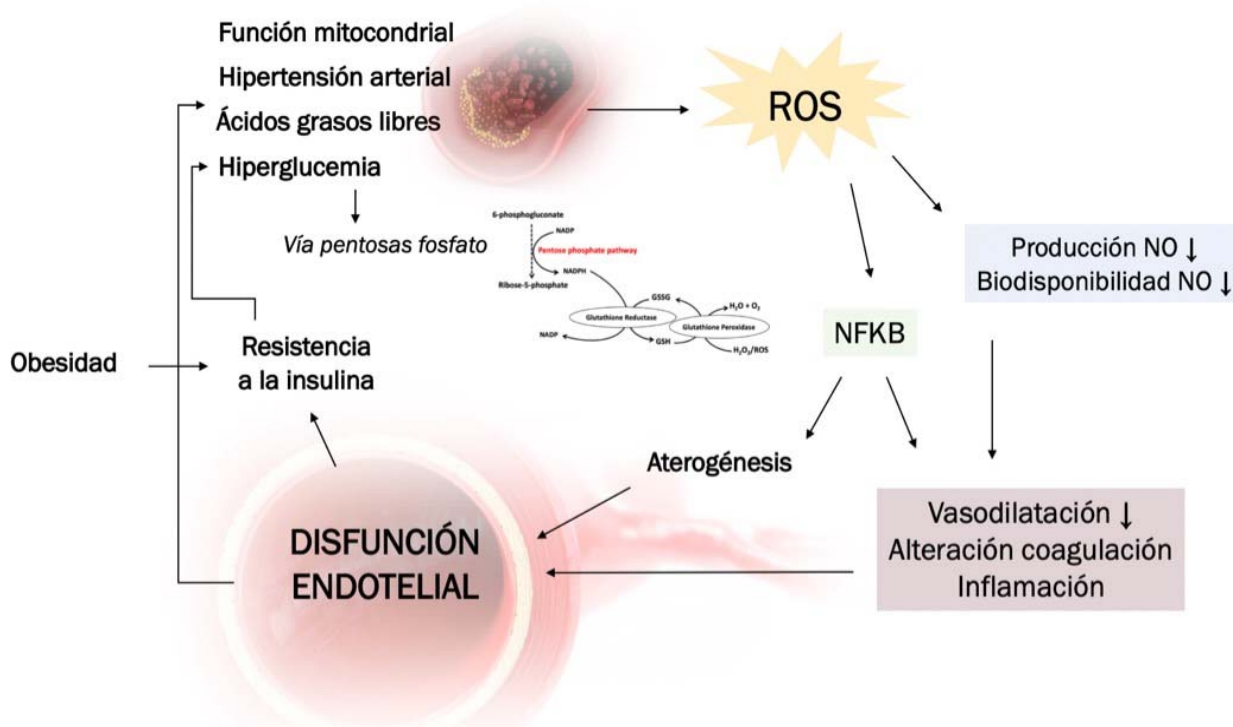


Figura 1.15. Representación esquemática de la relación existente entre el estrés oxidativo, la disfunción endotelial y ciertas patologías asociadas a síndrome metabólico

En la actualidad, existen múltiples y diversos estudios que van desde modelos celulares, moleculares y animales, hasta intervención en humanos. Ofrecen nuevos conocimientos sobre las causas y consecuencias de la diabetes y exploran objetivos terapéuticos y nuevos tratamientos que puedan mejorar el manejo y pronóstico de la diabetes mellitus y el síndrome metabólico.⁹⁷

1.4.2 Resistencia a la insulina en el endotelio

En la diabetes, las acciones de la insulina sobre el endotelio y otras células vasculares tienen gran importancia en la homeostasis celular y el desarrollo de ciertas patologías.^{48,101,102} La insulina se une al receptor de la superficie celular conocido como receptor de insulina (IR), que pertenece a la familia de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa.¹⁰³ Los receptores de insulina en el endotelio son importantes para regular el transporte de insulina a través la barrera endotelial y median las acciones de la insulina en músculo, corazón, grasa y cerebro. En los seres humanos, se ha demostrado que tres isoformas de IR (IRS 1, 2 y 4) desempeñan funciones importantes que varían según el tipo de célula y las condiciones metabólicas. Por ejemplo, el IRS-1 regula la acción de la insulina en el músculo esquelético. El IRS-2 funciona como regulador de la acción de la insulina en las células del hígado y del páncreas. Curiosamente, los ratones con deficiencia de IRS-2 son más susceptibles a la diabetes que los ratones knockout para IRS-1 debido a mayor deterioro en la secreción de insulina, lo que indica que IRS-2 contribuye a la base molecular de la diabetes. Tanto el IR-1 como el IRS-2 se expresan en el endotelio. Las células vasculares de la insulina están mediadas por dos vías que involucran las acciones de la vía metabólica **IRS / fosfatidilinositol (3,4,5) -trifosfato kinasa (PI3K) / proteína serina-treonina kinasa (Akt) / proteína recombinante de Shc 1 (Shc) / proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)**. La activación por la insulina de la vía metabólica IRS / PI3K / Akt tiene acción antiaterogénica, ya que esta vía induce la activación de eNOS, y la reducción de ICAM-1, entre otras cosas. Por el contrario, la activación por la insulina de la vía receptor de factor de crecimiento unido a proteína (**Grb) / Shc / MAPK** aumenta la expresión de factores como ET-1, así como la migración y proliferación de células contráctiles, que tienen acciones proaterogénicas. La hiperglucemia, los ácidos grasos libres y las citocinas inflamatorias derivadas de la diabetes así como la resistencia a la insulina inhiben selectivamente las acciones antiaterogénicas mediadas por vía IRS / PI3K / Akt.¹⁰²

Analizaremos en primer lugar la transducción de la vía IRS / PI3K / Akt. En condiciones fisiológicas, gracias a la acción de la insulina en los receptores RI, la enzima tirosina RIS fosforilada aumenta la producción de fosfatidilinositol (3,4,5) -trifosfato (PIP3). PIP3 inicia una cascada de serina quinasas, que activa a la quinasa 1 dependiente de fosfoinosítido (PDK-1) y la Akt en la membrana celular. La vía IRS / PI-3K / Akt activada induce la fosforilación de eNOS, la transformación de L arginina en L-citrulina y la producción de NO. Es por eso que la activación de Akt ayuda a regular la producción de NO, la adherencia de leucocitos, la angiogénesis y el metabolismo de la glucosa en el interior de la célula.¹⁰⁴ Además, alarga la supervivencia celular. La función de Akt también puede inducirse por la generación de factor inducible por hipoxia (HIF), tanto en endotelio como en otros tejidos.¹⁰⁵ En situaciones de isquemia, activación de HIF conduce a la expresión y posterior producción de factores angiogénicos, como el VEGF. En condiciones fisiopatológicas como la obesidad y la resistencia a la insulina, una parte del receptor RI se degrada y la vía IRS / PI3K / Akt no funciona de forma adecuada. La obesidad y la diabetes tipo 2 están asociadas a niveles elevados de leptina, que facilitan la fosforilación de la serina del IRS-1, perturbando así la señalización a través de la PI-3K / Akt. En cuanto a la vía de señalización o Grb / Shc / MAPK. La proteína Shc, provoca la activación de la proteína de unión a GTP “Ras” e inicia una cascada de fosforilación que involucra a la proteína MAPK, que aumenta fundamentalmente la secreción de ET-1, ICAM-1 y E-selectina. La resistencia a la insulina en endotelio se caracteriza pues, por la mala regulación de las acciones metabólicas en estas vías de señalización endoteliales. Un trastorno de la vía PI3-K / Akt da como resultado una falta de sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos. Por el contrario, a vía MAPK está fuertemente activada por hiperinsulinemia compensadora cuando el eje PI3-K / Akt está regulado “a la baja”. El desequilibrio entre estas dos señales conduce a una disfunción endotelial, caracterizada por una disminución de la producción de NO y una mayor generación de ET-1 en las células endoteliales.¹⁰⁶ El bloqueo farmacológico de los receptores ET-1 mejora la función endotelial en sujetos obesos o diabéticos, pero no en individuos sensibles a la insulina.¹⁰⁷

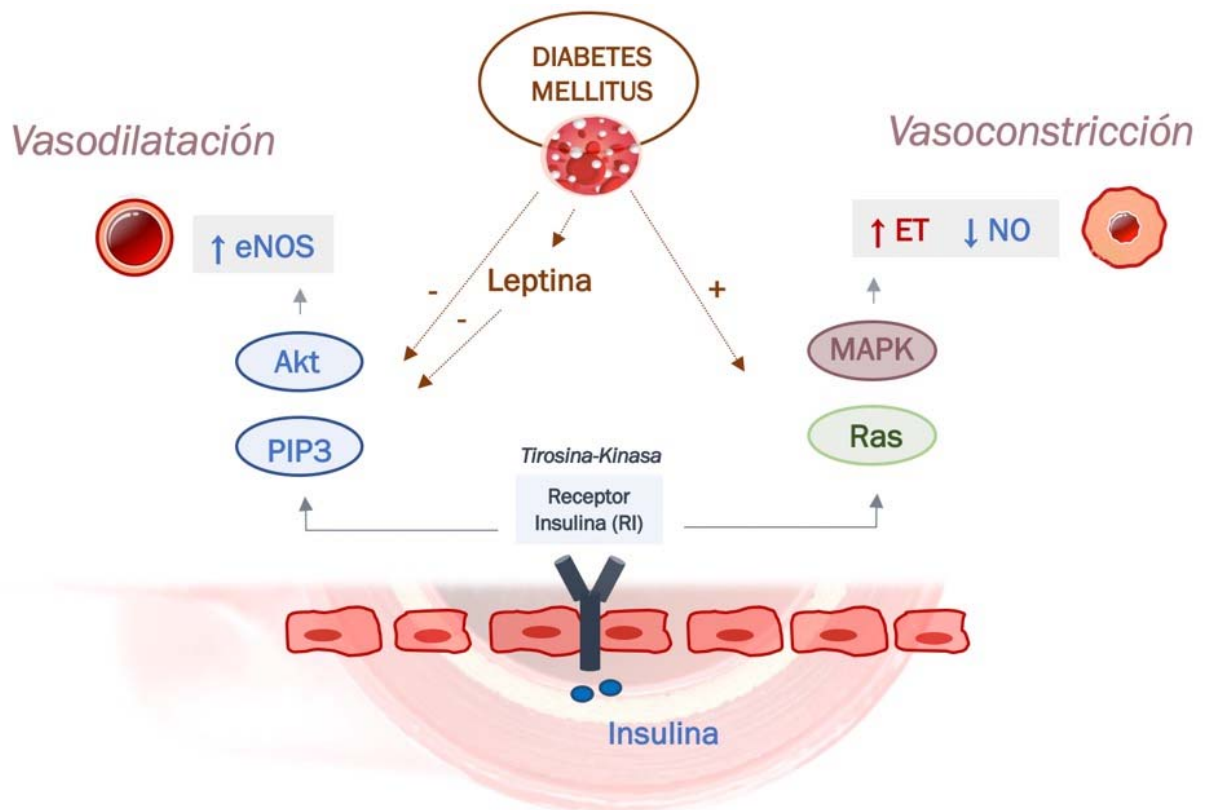


Figura 1.16. Representación de la vía IRS / PI-3K / Akt que facilita la vasodilatación y disminuye en presencia de hiperglucemia, y la vía Grb / Shc / MAPK que conduce a vasoconstricción tras su activación.

Desde otro punto de vista, la disfunción endotelial también podría desempeñar un papel causal en el desarrollo de resistencia a la insulina. La insulina actúa sobre la vasculatura periférica de tres formas, para mejorar su propio suministro a los tejidos: relajación de los vasos “de resistencia” para aumentar el flujo sanguíneo total, relajación de las arteriolas precapilares para aumentar la superficie de intercambio microvascular perfundida o reclutamiento microvascular y aumento del transporte transendotelial de la propia insulina. Si existe una alteración de la función vascular, como desequilibrio en la producción de NO y la secreción de ET-1, observaremos una disminución del flujo sanguíneo, lo que empeorará a su vez la resistencia a la insulina. Es decir, la resistencia a la insulina provoca disfunción endotelial, pero esa misma disfunción de la vasculatura podría provocar o agravar la resistencia a la insulina. La disfunción endotelial podría incluso preceder al desarrollo tanto del síndrome de resistencia a la insulina como de la aterosclerosis.

1.4.3 Estrés oxidativo y otras alteraciones de la función endotelial específicas de la Diabetes Mellitus

En el *apartado 1.3*, se describieron diversas alteraciones moleculares, generalmente en asociación con factores de riesgo cardiovascular, que podían ser clave en la patogenia de la disfunción endotelial. En este apartado veremos alteraciones concretas que se han asociado a la hiperglucemia y a la diabetes mellitus.

1.4.3.1 Disminución de la actividad AMPK

La función principal de la proteína quinasa activada con adenina monofosfato (AMPK) es mantener la homeostasis intracelular en varios órganos.^{108,109} En primer lugar, la fosforilación de AMPK (phos-AMPK) facilita la unión de la proteína de shock térmico de 90 kDa (Hsp90) a eNOS. La Hsp90 es una proteína chaperona que estabiliza a otras proteínas en ciertas situaciones.¹¹⁰ Cuando se forma el complejo hsp90-AMPK-eNOS, aumenta presuntamente la actividad de eNOS y la producción de NO. Es por ello que la activación de AMPK se considera un atenuante de la disfunción del endotelio gracias a la regulación al alza de la actividad eNOs. Por otro lado, es conocido el papel perjudicial del peroxinitrito, tal y como señalamos en apartados previos, formándose en algunas situaciones de activación de la NAPH oxidasa. Cuando esto sucede, AMPK aumenta la expresión de peroxisoma proliferador coactivador de respuesta gamma-1 α , factor respiratorio nuclear-1 y factor de transcripción de ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial A, todos ellos siendo beneficiosos para mantener del equilibrio de las reacciones de oxidación – reducción en células endoteliales, y evitando así la formación de radicales libres.^{111,112} Por último, la AMPK es capaz de reducir la producción endotelial de moléculas que favorecen la vasoconstricción, como la ET-1 o la angiotensina.¹⁰⁷

En los casos de pacientes diabéticos, la hiperglucemia la relación adenosina monofosfato (AMP) / adenosina trifosfato (ATP) se invierte. La hiperglucemia aumenta los niveles de ATP celular en el endotelio, que compete con AMP por el lugar de unión de AMP en las subunidades de AMPK, lo que resulta en la inhibición de la actividad de AMPK. El tratamiento con algunos activadores de AMPK como la metformina, podría mejorar la función endotelial deteriorada.¹¹³ Algunos autores resaltan el aumento de los niveles de GMPc y NO objetivado en ratones con glucemia elevada y tratados con metformina. De una forma similar, el fenofibrato y el resveratrol, compuesto que se

produce de forma natural en algunas plantas y aislado del vino tinto, aumentan la AMPK y con ello los efectos beneficiosos sobre la función del endotelio vascular.¹¹⁴

1.4.3.2 Estrés mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos del citoplasma celular de doble membrana que generan ATP y O₂. Son capaces de realizar cambios estructurales, y este proceso se regula gracias a los procesos de fusión y fisión mitocondrial.¹¹⁵ En la fusión de mitocondrias, se produce la fusión de la membrana externa mediada por mitofusina 1 y 2 (MFN1 y MFN2) y la fusión de la membrana interna por la proteína atrofia óptica 1.¹¹⁶ Por el contrario, la fisión de las mitocondrias está regulada principalmente por la proteína 1 relacionada con la dinamina (Drp1) y la fisión 1 (Fis1). La Drp1, una proteína citoplásmica, se modifica tanto por fosforilación como por SUMOilación. La SUMOilación es una modificación postraduccional involucrada en varios procesos celulares, como el transporte del citosol al núcleo, la regulación transcripcional, la apoptosis, la estabilidad de las proteínas, o la respuesta al estrés oxidativo.¹¹⁷ Tras la SUMOilación DRp1 se ancla en Fis1 y el Drp1 acumulado en las mitocondrias produce una fuerza contráctil para dividir las mitocondrias tubulares en fragmentos. La fragmentación mitocondrial incrementa la producción de ROS mitocondriales, la liberación de citocromo C, y el movimiento de mitocondrias.¹⁰⁷

En estados de hiperglucemia, las mitocondrias aumentan su fragmentación mediante varios mecanismos que incluyen el aumento de la expresión de Drp1, la translocación de una proteína quinasa desde el citosol celular a las mitocondrias para activar DRp1, aumento de proteína disulfuro-isomerasa 1 que también activa Drp1, y una mayor acción de Fis1. Asimismo, cuando la glucemia aumenta en sangre, la translocasa de membrana externa mitocondrial sufre una translocación que impide la correcta función de MFN en células endoteliales y, por tanto, el proceso de fusión mitocondrial queda inhabilitado. En definitiva, la hiperglucemia modifica los cambios en la fisión y fusión mitocondrial contribuyendo al estrés oxidativo en las células endoteliales.^{107,118}

1.4.3.3 Estrés del retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) tiene como función la transducción de proteínas para mantener la función celular adecuada. También se encarga del mantenimiento del calcio intracelular o de metabolizar y eliminar determinadas moléculas que pueden ser dañinas para la homeostasis de la célula.^{119,120,121} El acoplamiento incorrecto de proteínas o la acumulación de Ca^{2+} pueden desencadenar lo que se denomina el estrés del RE.¹²² El estrés del RE induce una respuesta a proteína desplegadas (RPD) que finalmente causa la muerte celular.¹²³ En las células endoteliales, la hiperglucemia, la homocisteína y las LDL-ox inducen estrés del RE evidenciado por la activación de tres proteínas constituyentes del mismo: el factor de transcripción activador 6, el inositol que requiere proteína 1 y la RE quinasa. El estrés prolongado del RE y la RPD compensadora desencadenan disfunción del endotelio y aterosclerosis. El estrés del RE daña las células endoteliales y también disminuye la actividad de eNOS y la producción de NO: minimiza la actividad de la esfingomielinasa 2 y reduce la sensibilidad a insulina del endotelio mediada por Akt¹²⁴, entre otras cosas.¹⁰⁷ Asimismo, las LDL-ox, más elevadas en pacientes diabéticos, podrían provocar estrés del RE. Por último, el estrés del RE también se ha vinculado a una mayor tasa angiogénesis en diabéticos.¹⁰⁷

1.4.3.4 Regulación enzimática del estrés oxidativo en diabetes mellitus

Los sistemas oxidante y antioxidante controlan el equilibrio de reducción-oxidación intracelular. La mejora del sistema oxidante y la reducción del sistema antioxidante provoca un desequilibrio entre el estrés oxidativo. Algunas enzimas son capaces de regular este equilibrio y pueden afectarse en la diabetes mellitus, contribuyendo así a la aparición de disfunción endotelial y comorbilidad cardiovascular en estos pacientes. A continuación, comentaremos algunas de las enzimas con mayor peso en la regulación del estrés oxidativo en presencia de hiperglucemia.

1.4.3.4.1 NO-sintasa endotelial y prostaglandina sintasa

El estrés oxidativo y el exceso de ROS causa disfunción endotelial y aterosclerosis en la diabetes. Además, la hiperglucemia puede inducir también a su vez la formación de ROS. Tal y como comentamos en previos apartados, el exceso de producción de ROS contribuye a una reducción de la biodisponibilidad de NO y al aumento de la generación de ONOO⁻. Además de la molécula de NO, otras enzimas y otros vasodilatadores

dependientes del endotelio son bloqueados irreversiblemente por ONOO⁻ en contexto de hiperglucemia. Un ejemplo sería la vía medida por la prostaglandina sintasa (PGIS). La PGIS cataliza la conversión de prostaglandina H₂ (PGH₂) en prostaciclina (PGI₂), que es un vasodilatador eficaz.¹²⁵ El desacoplamiento de eNOS puede disminuir la producción de PGI₂ mediante la nitración de PGIS. Asimismo, la inactivación de PGIS conduce a la acumulación de PGH₂. PGH₂ es un sustrato para el receptor tromboxano-prostanoide, que provoca constricción de vasos medianos y grandes. Por tanto, la hiperglucemia impide la relajación dependiente de PGI₂ e induce vasoespasmo mediado por PGH₂.¹²⁶

1.4.3.4.2 Superóxido dismutasa

La SOD es una enzima antioxidante de defensa crucial contra los radicales libres de oxígeno en las células. La SOD incluye tres isoformas: la SOD citosólica que contiene cobre y zinc (CuZnSOD o SOD1), la SOD que contiene manganeso mitocondrial (MnSOD o SO₂), y la SOD extracelular (EC-SOD o SOD3). La SOD3 aumenta la vasodilatación inducida por acetilcolina (Ach), la expresión de adiponectina y la vía de Akt-eNOS que facilita la vasodilatación. Se ha visto que la actividad de MnSOD y SOD3 pueden disminuir por nitrotirosinación debida a radicales libres. Además, la actividad de la SOD puede disminuir en las células endoteliales en hiperglucemia, lo que sugiere una disminución del aclaramiento de las especies reactivas en las células endoteliales en pacientes diabéticos.^{127,128}

1.4.3.4.3 Tiorredoxina reductasa

La tiorredoxina (TRX) es un modulador del estrés redox intracelular, ya que posee actividad antioxidante.¹²⁹ La proteína que interactúa con tiorredoxina (TXNIP) sirve como “regulador negativo” de TRX y contribuye al estrés oxidativo en la diabetes, además de promover la inflamación mediante la activación del inflamosoma NLRP3.^{130,131} La expresión del gen de TXNIP se encuentra elevada en células mononucleares óseas de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y pueden tener un impacto negativo en la señalización de NO en estos pacientes. Teniendo en cuenta el papel destacado de la NO en la disfunción endotelial, y el defecto de la señalización de NO por distintas causas en diabetes, la expresión de TXNIP podría tener un papel importante en la aparición de complicaciones cardiovasculares en diabetes mellitus.^{132,133}

1.4.4 Terapias anti-disfunción endotelial

1.4.4.1 Tratamientos antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en la regulación de la función vascular. Se han realizado varios estudios que utilizan vitamina C como terapia antioxidante para intentar restaurar la función endotelial y reducir así reducir la comorbilidad por enfermedad cardiovascular.^{134,135,136} Se obtuvieron resultados prometedores en estudios en los que se administró vitamina C durante un periodo de tiempo concreto a pacientes que padecían factores de riesgo de enfermedad cardiovascular como el síndrome metabólico, el tabaquismo o la hipertensión. Otros estudios analizaron la correlación entre la deficiencia de vitamina C y el pronóstico de la enfermedad cardiovascular. Los ensayos clínicos a largo plazo realizados para dilucidar el impacto clínico real de los antioxidantes en la progresión de la aterosclerosis mostraron, lamentablemente, resultados negativos, ya que apenas detectaron efectos beneficiosos sobre el pronóstico vital. De hecho, en un estudio sobre mujeres posmenopáusicas con diabetes tipo 2, la administración de vitamina C suplementaria mostró correlación positiva con la mortalidad.¹³⁷ Las razones del resultado de estos ensayos clínicos que utilizaron terapia antioxidante oral son diversas. Incluyen, entre otras, la absorción limitada de los antioxidantes orales clásicos en tejidos sometidos a estrés oxidativo, el acceso a los sitios intracelulares de producción de superóxido y otros productos derivados del estrés oxidativo.¹³⁸

1.4.4.2 Terapia antiinflamatoria

La inflamación es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad cardiovascular.^{139,140,141} El estudio PROVE IT-TIMI 22 demostró que los niveles altos de proteína C reactiva en pacientes con síndrome coronario agudo eran predictivos de muerte por infarto de miocardio.¹⁴² Existen numerosos estudios en humanos y animales que demuestran una correlación entre los procesos inflamatorios y la disfunción endotelial, tal y como hemos comentado en apartados previos. Además, ahora se acepta en general que, además de la aterosclerosis, la hipertensión arterial también es una enfermedad inflamatoria de bajo grado.^{143,144,145} Actualmente se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos para investigar si el tratamiento antiinflamatorio mejora los resultados cardiovasculares, como por ejemplo el que analiza la eficacia del bloqueo IL-1 β con canakinumab en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.^{146,147,148} Otra nueva

terapia antiinflamatoria podría basarse en la restauración de un glucocálix alterado¹⁴⁹, que se asocia con una mayor susceptibilidad a los factores capaces de desencadenar de la aterosclerosis y la adhesión de leucocitos y plaquetas.¹³⁸

1.4.4.3 Suplementación con BH4

La BH4, cofactor importante para la enzima eNOS, mejora la producción de NO en estudios animales. La suplementación con BH4 ha demostrado mejorar la relajación dependiente del endotelio en modelo de diabetes tipo 2 y nos sugieren la hipótesis de que la tetrahidrobiopterina, o un precursor del mismo, podría ser un nuevo enfoque terapéutico eficaz para la mejora de la función del endotelio en condiciones fisiopatológicas.^{150,151}

1.4.4.4 Terapia reparadora con agentes farmacológicos

Algunos tratamientos farmacológicos con distintos mecanismos de acción, han demostrado ser capaces de mejorar la disfunción endotelial.

1.4.4.4.1 Insulina

El tratamiento con insulino terapia ha demostrado ser beneficioso para el mantenimiento de la homeostasis del endotelio vascular. La insulina relaja los vasos sanguíneos y aumenta el flujo sanguíneo al músculo esquelético y tejidos grasos. Tal y como comentamos anteriormente, mediante la vía IRS / PI3K / Akt la molécula de insulina estimula la producción de NO vía eNOS y facilita la vasodilatación de los capilares. Además, la insulina reduce directamente las concentraciones plasmáticas de moléculas de adhesión de las células endoteliales y puede disminuir así la cascada de inflamación vascular.^{152,153}

1.4.4.4.2 Tratamiento antihipertensivo e hipolipemiente

1.4.4.4.2.1 Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina

La producción de angiotensina II posee propiedades prooxidativas, proinflamatorias y vasoconstrictoras, está asociada con muchas enfermedades cardiovasculares.^{154,155} Los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) ramipril y perindopril disminuyen la formación de angiotensina II, y en ensayos clínicos extensos como el *European Trial on Reduction of Cardiac Events with Perindopril*¹⁵⁶, han demostrado

reducir la incidencia de infarto de miocardio, paro cardíaco, insuficiencia cardíaca, accidente cerebrovascular y complicaciones relacionadas con la diabetes en adultos de alto riesgo, con enfermedad vascular basal o diabetes. Si bien los mecanismos responsables de la mejora de los resultados cardiovasculares después del tratamiento con ramipril o perindopril sigue sin estar clara, se piensa que la capacidad de estos inhibidores de la ECA para mejorar la resistencia al NO puede contribuir al beneficio del tratamiento. Se ha demostrado que el ramipril y el perindopril mejoran la resistencia al NO en pacientes diabéticos, sobre todo a nivel plaquetario. Además, ramipril disminuyó la presión sistólica y presión diastólica, los niveles plasmáticos de ADMA, y los marcadores de rigidez arterial y disfunción endotelial.^{157,158}

1.4.4.4.2 Estatinas y fenofibrato

Las estatinas han demostrado tener la capacidad de mejorar la disfunción endotelial. También se les atribuye propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, acción antitrombótica y antiproliferativa, y reducen la apoptosis. La razón de estas acciones beneficiosas son diversas. Las más destacables son la disminución de la LDL-ox, lo que hará que no se inhiba la eNOS y la producción de NO y la reducción del NK-kB.^{159,160}

El fenofibrato es un agonista de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR α), que regulan la transcripción del metabolismo de lípidos por distintas vías. Además de reducir los niveles de LDL, también ha demostrado mejorar la disfunción endotelial y tener acción anti-inflamatoria.¹⁶¹ También se ha visto útil en la reducción de las complicaciones vasculares en pacientes diabéticos. El fenofibrato activa la eNOS, produciendo más NO, gracias a la activación de la AMPK, que está reducida en la diabetes mellitus., tal y como demuestran experimentos en modelo animal de diabetes.^{162,163} En pacientes diabéticos, el mecanismo por el cual mejoran la función endotelial sigue sin estar claro, pero sí se ha visto un efecto beneficioso en endotelio vascular, independientemente de los niveles de lípidos.^{164,165}

1.4.4.4.3 *Inhibidores de la fosfodiesterasa 5*

Los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (PDE5) (sildenafil, tadalafilo, vardenafilo), actúan regulando la concentración de GMPc, aumentándola, mediante inhibición de la enzima PDE5. De esta manera, el aumento de GMPc provoca una relajación del músculo liso vascular.¹⁶⁶ En primera instancia, los inhibidores de PDE5 fueron utilizados para el tratamiento de la hipertensión arterial y la angina de pecho. Por sus efectos secundarios, y por su capacidad para relajar el músculo liso cavernoso y las arteriolas peneanas, fueron indicados para el tratamiento de la disfunción eréctil.^{167,168} Más tarde, la FDA aprobó su uso para el tratamiento de la hipertensión pulmonar junto a los antagonistas de la ET y los agonistas de prostaciclina.^{169,170}

Recientemente, los inhibidores de PDE5 se han propuesto como nuevas opciones terapéuticas en diversas patologías, como la isquemia miocárdica¹⁷¹ o como tratamiento suplementario anti-neoplásico en algunos tipos de cáncer¹⁷². También han demostrado eficacia en la demencia vascular¹⁷³, y en la fibrosis quística por aumento de la acción del canal de cloro¹⁷⁴. En cuanto a la disfunción endotelial en diabetes mellitus, algunos estudios recientes han investigado el papel de los inhibidores de PDE5 en la protección del endotelio vascular, dañado por hiperglucemia, basándose en la relación entre la neuropatía y la vasculopatía diabética y la síntesis insuficiente de NO en estos pacientes. Algunos resultados mostraron que la administración diaria crónica de sildenafil y tadalafilo, podría mejorar la disfunción endotelial en casos de pacientes afectados de diabetes mellitus. Además de los efectos sobre el endotelio, la inhibición de la PDE5 con tadalafilo ha demostrado ser capaz de reducir los niveles de glucosa y triglicéridos sin que afecte al peso corporal, en un modelo animal. Sildenafil, por su parte, mejoró la sensibilidad a la insulina y el pronóstico de la miocardiopatía en ensayos clínicos con pacientes humanos afectados de diabetes. Además, tal y como señalamos anteriormente, la hiperglucemia se asocia a condición inflamatoria con la presencia de citosinas como TNFalfa, capaces de reducir la disponibilidad de NO. Este estado de mayor inflamación también se ha visto disminuido por vardenafilo en estudios con ratas diabéticas. Hacen falta más estudios en para perfilar mejor la eficacia y la utilidad de administrar IPD5 en casos de disfunción endotelial asociada a diabetes, a largo plazo.^{175,176}

1.4.4.4 Dadores de NO

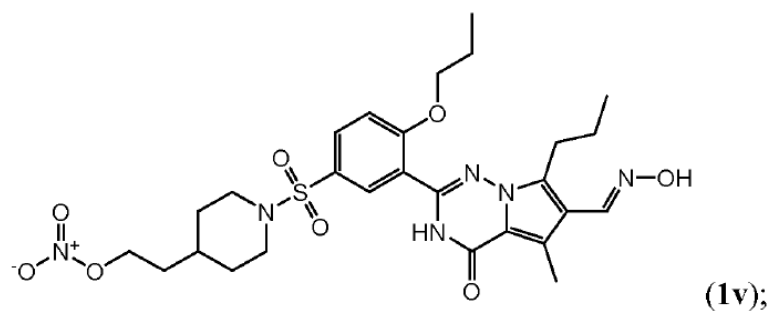
Tal y como hemos comentado en apartados previos, el estrés oxidativo presente en la diabetes mellitus y en otras enfermedades, puede conducir a una resistencia a la acción del NO, aunque este se encuentre en concentraciones celulares adecuadas. Además, la concentración de NO también se ve disminuida en muchos de estos trastornos metabólicos por alteración de la transducción enzimática que produce NO, debido a hiperglucemia, LDL-ox, y citosinas inflamatorias, entre otros. Por este motivo, el potencial beneficio de los fármacos incluidos en el grupo de “dadores de NO” está cobrando creciente importancia en los últimos años. Dedicaremos un apartado completo a estos fármacos (apartado 1.4.4.5)

1.4.4.5 Compuestos derivados de 2-fenil-3,4-dihidropirrol[2,1-f] [1,2,4]triazinona como inhibidores de fosfodiesterasa

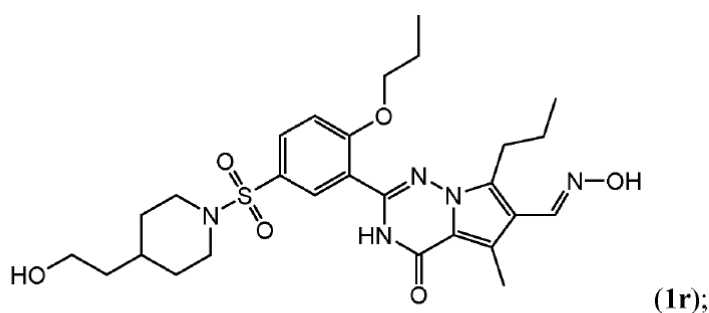
La patente registrada por Laboratorios TOPADUR, se centró en fármacos para ser utilizados en terapéutica, en particular compuestos que son útiles como inhibidores de fosfodiesterasas, que degradan el GMPc, en particular, inhibidores de PDE5. Los compuestos registrados pueden tener indicaciones en diversas áreas terapéuticas, que incluyen disfunción eréctil masculina, enfermedad de Alzheimer, hipertensión arterial pulmonar, disfunción endotelial, hiperplasia prostática benigna y síntomas del tracto urinario inferior, priapismo, fibrosis quística, enfermedad vascular periférica, trastornos vasculares como la enfermedad de Raynaud, esclerosis sistémica, esclerodermia, diabetes y, en particular, para la cicatrización de heridas, sobre todo en casos de cicatrización de heridas crónicas, como las que se dan frecuentemente en diabéticos (pie diabético, úlcera del pie diabético, úlcera de pierna y neuropatía diabética).

Los compuestos utilizados en el presente trabajo de laboratorios TOPADUR son el TOP N53 (registrado como “**1v**”) y el TOP 52 (registrado como “**1r**”).

1.4.4.5.1 Estructura de TOP N53 y TOP 52



2-(2-ethoxy-5-((4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)sulfonyl)phenyl)-5-methyl-4-oxo-7-propyl-3,4-dihydropyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazine-6-carbaldehyde



ethyl-3-(2-(2-ethoxy-5-((4-methylpiperazin-1-yl)sulfonyl)phenyl)-5-methyl-4-oxo-7-propyl-3,4-dihydropyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-yl)-3-hydroxypropanoate

Figura 1.17. Estructura química de los compuestos TOP N53 y TOP 52. Imagen tomada de Naef y Tenor (2017).

Remarcar que el compuesto TOP N53 es una molécula híbrida de éster de nitrato orgánico / inhibidor de la PDE5, que cuando actúa en el tejido es capaz de liberar dos metabolitos activos, el primero es una molécula de NO, el segundo metabolito activo es el TOP 52, que presenta una potente acción inhibidora de PDE5.

1.4.4.5.2 Farmacología del top n53 y top 52

1.4.4.5.2.1 Hallazgos *in vitro*

1.4.4.5.2.1.1 Ensayo enzimático

Tanto TOP N53, la molécula híbrida de éster de nitrato orgánico / inhibidor de la PDE5, y el TOP 52, uno de los metabolitos activos de TOP N53 (el otro debería ser NO) son potentes inhibidores de la PDE5.

La CI50 (concentraciones de inhibidor que logran una inhibición del 50% de la actividad enzimática) de TOP N53 y TOP 52 para la inhibición de la actividad enzimática

de la PDE5A recombinante humana fueron 0,185 nM y 2,24 nM, respectivamente (Tabla adjunta a la figura). Así, el TOP 52 que debería surgir del metabolismo del TOP N53 en un proceso llamado "bioactivación" fue 12 veces más potente para inhibir la PDE5 que el TOP N53 original. La potencia de TOP N53 y TOP 52 para inhibir la PDE5A recombinante humana también se comparó con los inhibidores de la PDE5 de referencia (comercializados) Sildenafil, Vardenafil y Mirodenafil. El orden de rango de potencia (IC50, nM) fue T52> Vardenafil> Mirodenafil> TOP N53> Sildenafil (Figura 1.18)

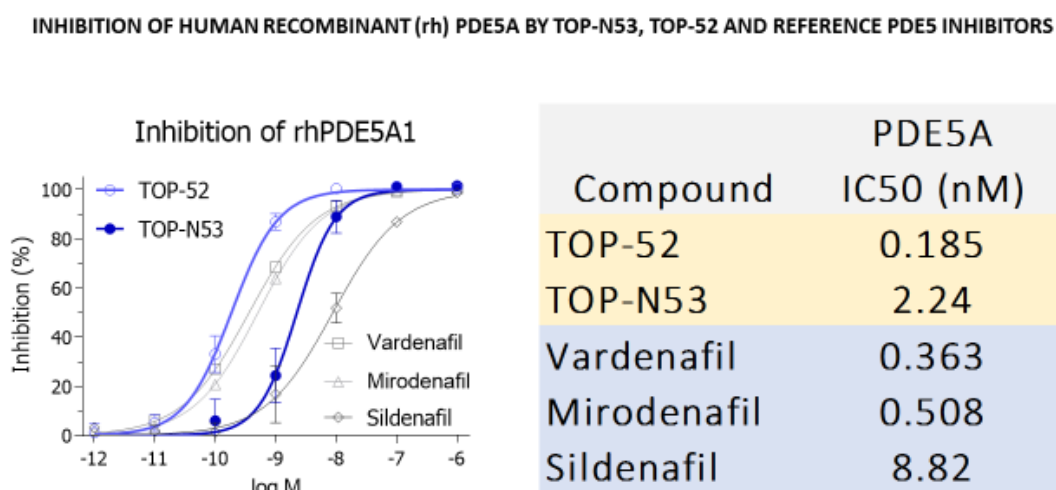


Figura 1.18. Inhibición de rhPDE5A por inhibidores de PDE5. La inhibición dependiente de la concentración de rhPDE5A (Sigma E9034, longitud completa, etiquetada con GST en el extremo N) se determinó en un ensayo radiométrico usando [³H] GMPc como sustrato basado en la tecnología SPA (ensayo de centelleo por proximidad). La concentración de sustrato fue 0,5 μM de GMPc. Los resultados se muestran como medias +/- Desviación estándar de N experimentos independientes cada uno realizado por triplicado: N = 9 (TOP 52), N = 9 (TOP N53), N = 5 (Vardenafil), N = 4 (Mirodenafil), N = 7 (Sildenafil)

1.4.4.5.2.1.2 Ensayo celular

1.4.4.5.2.1.2.1 GMPc en células de músculo liso vascular

Un sello distintivo de la farmacología de los inhibidores de la PDE5 es su capacidad para reducir rápidamente el tono del músculo liso vascular, lo que resulta en vasodilatación. Esta relajación del músculo liso vascular por los inhibidores de la PDE5 es producida por un aumento de GMPc secundario a un impedimento de su degradación. La vía GMPc también es utilizada por nitratos orgánicos que liberan NO tras su "bioactivación". El NO activa la GC soluble, por lo que la síntesis de GMPc explica los efectos vasodilatadores de los nitratos orgánicos. TOP N53 fue diseñado para integrar

ambas propiedades en una molécula: aumento de la síntesis de GMPc de nitratos orgánicos y reducción de la inactivación de GMPc de inhibidores de PDE5.

Por lo tanto, se midieron los efectos de TOP N53 para aumentar la síntesis de GMPc en las células del músculo liso vascular y se compararon con el Sildenafil de referencia.

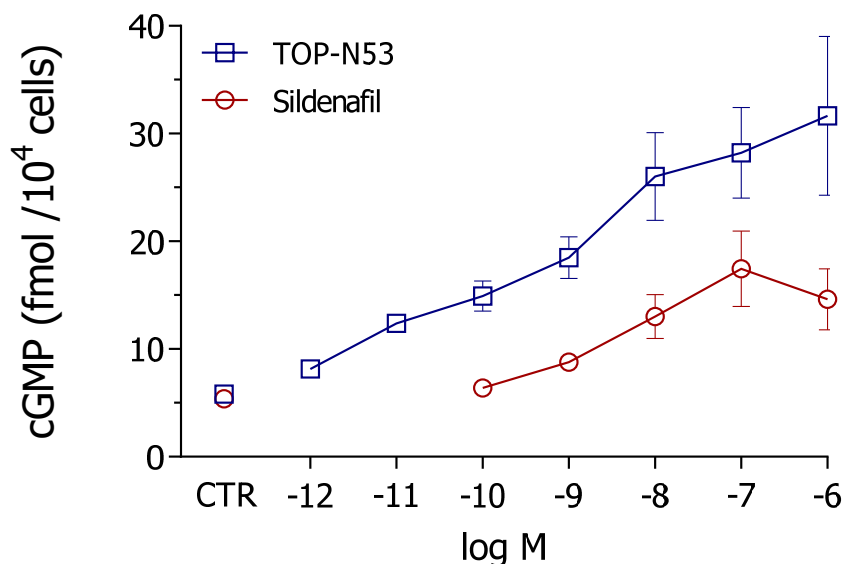


Figura 1.19. TOP N53 mejora el GMPc en células de músculo liso vascular humano. Se incubaron células de músculo liso de la arteria pulmonar humana con diferentes concentraciones de TOP N53 (TN53; 1 pM a 1 μ M) o Sildenafil (0,1 nM a 1 μ M) durante 30 min. El contenido total de GMPc se midió mediante ELISA. CTR, control de vehículos. Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de experimentos realizados con células de 3 donantes diferentes, cada uno analizado por triplicado.

Tanto TOP N53 como sildenafil aumentan de manera dependiente el contenido de GMPc. TOP N53 superó al sildenafil en términos de potencia y eficacia. De hecho, se observó un aumento de 2,5 veces del contenido de GMPc de la línea de base a 9,2 nM de sildenafil, sin embargo, ya a aproximadamente 0,07 nM de TOP N53. Además, el aumento máximo de GMPc con sildenafil fue de 2,7 veces en comparación con el valor inicial, pero 5,4 veces con TOP N53. Mientras que el sildenafil aumenta el GMPc en un rango de concentración comparable a la inhibición de PDE5 en términos de TOP N53, concentraciones más bajas que las esperadas del perfil de inhibición de PDE5 dan como resultado un aumento sustancial de GMPc. Esto se ejemplifica mediante un aumento de 2,1 veces de GMPc a 0,01 nM y un aumento de 2,6 veces a 0,1 nM de TOP N53 (figura 1.19).

En conjunto, estas observaciones apoyan la noción de que en las células del músculo liso vascular TOP N53 se convierte en el inhibidor de PDE5 más potente TOP 52 acompañado de la liberación de NO que actúa en conjunto para aumentar el GMPc.

Estos estudios fueron realizados en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, España, en el contexto de EUROSTARS E 10192 Proyecto “Nuevos Fármacos PDEI en Heridas” donde la Universidad de Valencia es socio subcontratado de TOPADUR. Los ensayos enzimáticos de PDE, fueron realizados por Topadur Pharma AG.

2. Objetivos

Los objetivos del presente estudio son:

1. Evaluar, como modelo celular de disfunción endotelial diabética, los efectos de la incubación con elevada concentración de glucosa en cultivos de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas.
2. Valorar nuestro modelo celular de disfunción endotelial diabética mediante el estudio de la alteración del proceso de angiogénesis y de diferentes marcadores de función endotelial.
3. Estudiar y comparar los efectos de TOP N53 (molécula híbrida con doble actividad funcional: inhibidora de PDE5 y dadora de NO), de su metabolito TOP 52 (potente acción inhibidora PDE5) y de sildenafil (inhibidor de PDE5 de referencia ya comercializado), sobre nuestro modelo de disfunción endotelial en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas.
4. Estudiar el efecto de los fármacos en estudio y de referencia sobre la formación de células progenitoras endoteliales a partir de células mononucleares de sangre periférica.
5. Estudiar y comparar los efectos relajantes de TOP N53, TOP 52 y sildenafil en aorta aislada de rata en cuatro condiciones experimentales diferentes:
 - a. con endotelio intacto,
 - b. sin endotelio,
 - c. en presencia de inhibidor de NO sintasa,
 - d. e incubados con elevada concentración de glucosa como modelo funcional de disfunción endotelial diabética.

3. Material y métodos

3.1 Estudios en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas

3.1.1 Enfoque metodológico del estudio

- **Objetivos:**

Para explorar si TOP N53 y TOP 52 promueven la angiogénesis en cultivos de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMVEC), específicamente de diabéticos en los que la angiogénesis está alterada, o mejora el eje NO-GC soluble-GMPc, también comprometido en la diabetes, se procede al siguiente enfoque experimental.

- **Enfoque experimental:**

Los estudios se realizarán en HDMVEC cultivadas in vitro procedentes de sujetos diabéticos. En algunos experimentos, se realizan de forma paralela experimentos en HDMVEC procedentes de sujetos sanos.

- Efectos sobre la angiogénesis de TOP N53, TOP 52 y los fármacos de referencia sildenafil y nitroprusiato sódico. Se estudiarán sobre:
 1. Proliferación celular: incorporación de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU)
 2. Migración (ensayo de quimiotaxis).
 3. Liberación de VEGF
 4. Apoptosis (anexina V).
 5. Liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS)
 6. Formación de tubos (Matrigel ensayos).
- Efectos de TOP N53, TOP 52 y fármacos de referencia sobre mecanismos de disfunción endotelial:
 1. Expresión de componentes del eje NO-sGC-GMPc: GTPCHI, DDAHII, PDE5 y eNOS.
 2. Liberación de BH4.
 3. Actividad de eNOS.
 4. Producción de GMPc
- Formación in vitro de células progenitoras endoteliales (CPE) a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas durante 21 días

en presencia o ausencia de TOP N53, TOP 52, sildenafilo y nitroprusiato sódico.

Los compuestos estudiados TOP N53, TOP 52, y sildenafilo se analizan para determinar los efectos y su dependencia de la concentración. En general, los compuestos se probaron en varias concentraciones próximas a la EC50 y al Emax de los estudios previos de nuestro laboratorio sobre el aumento de GMPc en las células del músculo liso vascular de arteria pulmonar. Concretamente, se emplearon concentraciones de 10 pM, 1 nM, 100 nM y 1 µM. El nitroprusiato sódico se utiliza a una concentración de 1 µM, como referencia de un aumento de óxido nítrico sin inhibición de PDE5.

3.1.2 Cultivos celulares

Los estudios se realizaron con HDMVEC primarias (HDMVEC; N° cat. C-12212) de la casa comercial PromoCell (*Heidelberg, Germany*) y con HDMVEC de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que se adquirieron de Lonza (*D-HMVEC-Ad, Dermal Microvascular Endothelial Cells, Diabetes T2. Catalog: CC-2930*). Se utilizó medio de cultivo *EBM™ Endothelial Cell Growth Basal Medium BulletKit™*. El medio contiene una mezcla de suplementos que consta de VEGF (0,5 ng / ml), EGF (5 ng / ml), bFGF (10 ng / ml), IGF (20 ng / ml), hidrocortisona (200 ng / ml), ácido ascórbico (1 µg / ml) a 37°C con 5% CO₂ en aire humidificado. El medio fue reemplazado cada 48 horas. En algunos experimentos, las HDMVEC se expusieron a concentraciones elevadas de glucosa (30 mM) para imitar los cambios metabólicos en las células endoteliales tal y como ocurre en la disfunción endotelial descrita en la diabetes tipo 2

3.1.3 Efectos sobre la angiogénesis de TOP N53, TOP 52, sildenafilo y nitroprusiato sódico

3.1.3.1 Proliferación celular células endoteliales

La HDMVEC de pacientes diabéticos se midió mediante técnica de inmunoensayo colorimétrico basado en la incorporación de BrdU durante la síntesis de ADN utilizando el kit *cell proliferation enzyme-linked immunosorbent assay BrdU kit (Roche, Mannheim, Germany; Catalogue n°.11647229001)* de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se trata de un compuesto halogenado formado por una base pirimidínica y el monosacárido ribosa, cuya analogía con la timidina permite una sustitución casi total (99.8-100%) de los nucleótidos de timidina en las células en fase de síntesis.

Las células HDMVEC de pacientes diabéticos cultivadas en medio EGM-MV2 se incubaron diferentes grupos durante 24 horas con medio de cultivo normal (control) o con glucosa 30 mM y los fármacos TOP 52, TOP N53, Sildenafil y nitroprusiato sódico o el grupo control con el vehículo (DMSO al 0.1%). Se añadió BrdU en las últimas 20 h. Posteriormente, se añadió la solución de fijación para desnaturalizar el ADN y cuantificar el BrdU incorporado mediante anticuerpos primarios anti-BrdU conjugados con anticuerpos secundarios en un ensayo colorimétrico siguiendo las instrucciones del fabricante del kit.

Los datos de proliferación hacen referencia a los valores de absorbancia del DNA celular marcado con BrdU por pocillo fueron cuantificados midiendo la absorbancia a 450 nm mediante espectofotometría usando un Espectrofotómetro microplaca (*Victor 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer*).

3.1.3.2 Migración de células endoteliales

La quimiotaxis se evaluó utilizando un “ensayo de migración celular Cytoselect™ de 96 pocillos (8 µm, fluorométrico)” (*Cell Biolabs, CBA-106*). Las HDMVEC de pacientes diabéticos (en suspensión, 50.000 células / 100 µl por pocillo) en medio basal endotelial (sin la mezcla de suplemento) se agregaron a los pocillos superiores de una cámara Boyden equipada con filtros PCTE sin polivinilpirrolidona (PVP) (tamaño de poro de 8 µm) en medio basal de células endoteliales. Después de un tiempo de incubación de 5 horas (37 ° C, 5% de CO₂), las células del lado inferior de los filtros PVP se tiñeron y contaron.

Cuando se utiliza el ensayo de migración celular Cytoselect™ de 96 pocillos con un tamaño de poro de 8 µm de Cell Biolabs, las células migradas se adhieren al lado inferior de la membrana de policarbonato. Siguiendo las instrucciones del fabricante, las células se disocian de la membrana mediante una solución de desprendimiento de células. Las células se lisan y se marcan con ADN usando una solución de colorante CyQuant® GR. La fluorescencia se mide a una excitación / emisión de 480 nm / 520 nm.

Los estudios de quimiotaxis se realizaron en dos protocolos diferentes. En el protocolo I, los compuestos de prueba (TOP N53, TOP 52) y de referencia (sildenafil y nitroprusiato sódico) se agregaron a la cámara inferior solo para estudiar cualquier efecto pro-migratorio directo. En el protocolo II, los compuestos de prueba y de referencia se agregarán a la cámara superior e inferior en concentraciones idénticas.

3.1.3.3 Medición de la liberación de VEGF

Se incubaron HDMVEC de pacientes diabéticos durante 24 horas en varios grupos control, con glucosa 30 mM, y con glucosa 30 mM y los fármacos con TOP N53, TOP 52 y sildenafilo en concentraciones desde 10 pM hasta 1 μM y nitroprusiato sódico a 1 μM. El VEGF fue determinado en el sobrenadante del cultivo. Para medir el VEGF se utilizó el *Kit Human VEGF DuoSet ELISA- R&D Systems DY293B-05* en placa de 96 pocillos. La concentración de VEGF se cuantificó midiendo la absorbancia a 450 nm, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.3.4 Estudios de apoptosis

Las HDMVEC de pacientes diabéticos se sembraron en placas porta para inmunofluorescencia. Cuando se obtuvo una confluencia del 80%, se expusieron a glucosa 30 mM durante 24 horas, en presencia o ausencia de los fármacos TOP 52, TOP N53, sildenafilo y nitroprusiato sódico. La apoptosis se determinó mediante un kit *Annexin V-FITC Apoptosis Staining / Detection Kit (ab14085)*. La anexina V se añade durante una hora, se lavan y se procede a medir por inmunofluorescencia. Los datos tomados para la representación de la apoptosis celular se expresaron como porcentaje de células apoptóticas.

3.1.3.5 Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS)

El diacetato de 2' 7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCF-DA) (*Molecular Probes, Reino Unido*) es un compuesto permeable a las células que después de la hidrólisis intracelular del éster se oxida a 2' 7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente por O^{2-} y H_2O_2 , y por lo tanto puede usarse para monitorear la generación intracelular de ROS. Para cuantificar los niveles de ROS, en HDMVEC procedentes de pacientes diabéticos, se incubaron sin / con glucosa 30 mM durante 24 horas, posteriormente se incubaron durante 30 min con H2DCF-DA 50 μM diluido en Opti-MEM. Los compuestos de prueba (TOP N53, TOP 52) y de referencia (sildenafilo y nitroprusiato sódico) se agregaron cuando las HDMVEC fueron expuestas a glucosa alta (30 mM) o bien, simultáneamente con H2DCF-DA en el grupo control.

Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar el H2DCF-DA restante y se estimularon con o sin glucosa (30 mM) durante 30 min en presencia de compuestos de prueba o de referencia o vehículo como en el paso anterior. Se midió la

intensidad fluorescente de cinco campos seleccionados al azar por condición utilizando un microscopio de epifluorescencia (*Nikon Eclipse TE 200, Tokio, Japón*) con filtro ajustado para FITC (excitación / emisión 480 nm / 525 nm). La captura y el análisis de imágenes posteriores se realizarán utilizando el software *Metafluor 5.0 (Analytical Technologies, EEUU)*. Los resultados se expresarán como fluorescencia DCF en unidades de fluorescencia relativa.

3.1.3.6 *Ensayo de formación de tubos*

La formación del tubo endotelial se determinó utilizando el kit comercial Endothelial Tube Formation Assay, siguiendo las instrucciones propuestas por el fabricante del kit comercial *Endothelial Tube Formation Assay, CBA-200, Cell Biolabs*. Se siembran las HDMVEC con medio de cultivo *EBM™ Endothelial Cell Growth Basal Medium BulletKit™* (medio + suplementos) sobre placas opacas previamente revestidas con el gel proporcionado por en el kit, y se incuban con el fármaco a sus diferentes concentraciones durante 16 horas para permitir la formación del tubo endotelial. Las células se tiñeron con una solución en calceína-acetoximetil (calceína-AM) durante 30 min, se lavaron con PBS y se tomaron imágenes mediante microscopía de fluorescencia, con el *equipo Spectral Leica TCS SP2 microscope (Leica Biosystems; Wetzlar, Germany)* usando las siguientes longitudes de onda de excitación/emisión: 495/515 nm. Las imágenes se analizaron mediante el programa informático *Image J (National Institutes of Health, EEUU)* instalando y utilizando el plugin “Angiogenesis analyzer”.¹⁷⁷

Con el fin de evaluar la capacidad de las HDMVEC de pacientes diabéticos tienen de inducir la formación de redes que simulen sistemas capilares, evaluamos los parámetros que ofrecen una idea estructural de menor a mayor complejidad en el proceso de organización de la red de células endoteliales:

- Extremidad (*extremities*): Segmento terminal derivado de un nodo (Figura 3.1: Puntos señalados por las flechas en A y B)
- Nodos (*nodes*): Un pixel con tres más conectados a él (bifurcación, Figura 3.1: Flechas en A y B).
- Uniones (*junctions*): Dos o más nodos cercanos entre sí, o nodos fusionados (Figura 3.1: C3 y D3).
- Segmento (*segment*): Elementos delimitados por dos nodos (Figura 3.1: C2 y D2).
- Rama (*branch*): Elemento delimitado por una unión y una extremidad.

- Segmento maestro (master segment): Fragmento de red compuesto por dos segmentos que se unen formando una estructura cerrada (Figura 3.1: E3).
- Uniones maestras (master junctions): Uniones que conectan al menos tres segmentos maestros (Figura adjunta: E2). Dos uniones maestras pueden unirse (Figura 3.1: F2).
- Redes/mallas (meshes): Porciones de área rodeadas por segmentos maestros (Figura 3.1: F1).

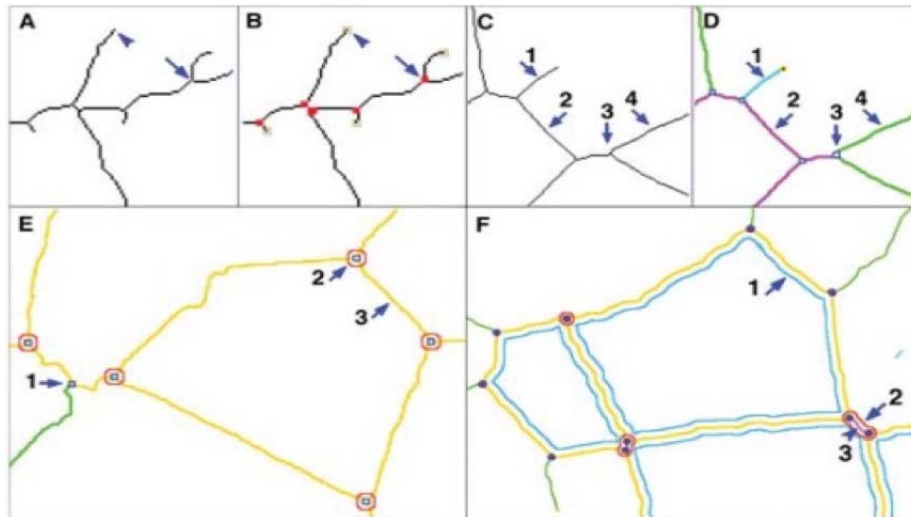


Figura 3.1. Elementos integrantes de una red capilar formada por células endoteliales sobre una matriz de matrigel¹⁷⁷

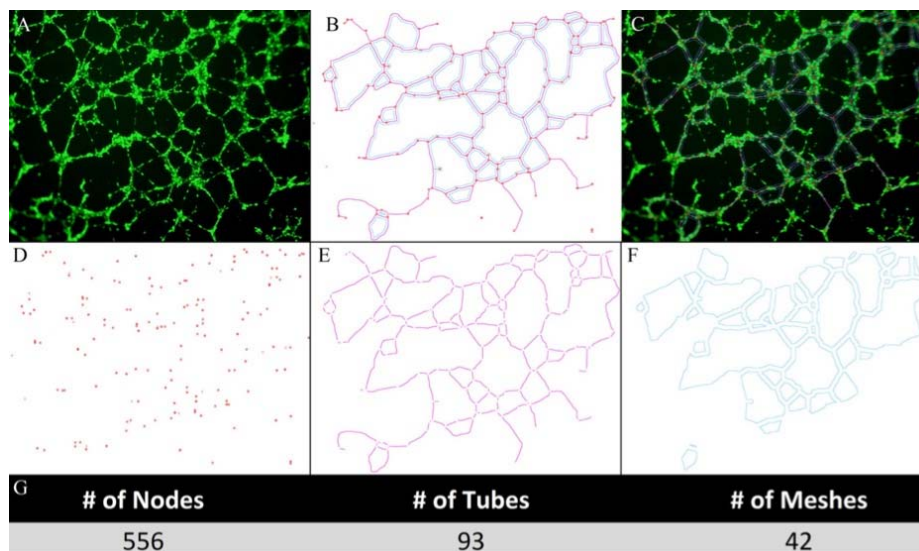


Figura 3.2. Imágenes de microscopía de fluorescencia y la cuantificación de la formación del tubo¹⁷⁸ Con el plugin del software Image J para analizar la angiogénesis se puede utilizar en una imagen fluorescente teñida con calceína. (A), para detectar de forma combinada los nodos totales (rojo) / tubos (rosa) / malla (azul) (B) que podemos fusionar con la red (C). Además, este programa puede ser utilizado para detectar individualmente nodos (D), tubos (E), o malla (F) que luego pueden ser cuantificados (G)

3.1.4 Efectos de TOP n53, TOP 52 y fármacos de referencia sobre mecanismos de disfunción endotelial

3.1.4.1 Expresión de componentes del eje NO-sGC-GMPc: GTPCH I, DDAH II, PDE5 y eNOS.

Las HDMVEC de sujetos normales y diabéticos fueron expuestas en grupos con y sin glucosa alta (30 mM) se incubaron con compuestos de prueba (TOP N53, TOP 52) o de referencia (sildenafil, nitroprusiato sódico), o vehículo durante 6, 12 y 24 horas. Se realizaron extracciones de ARN y de proteínas, para analizar la expresión génica y proteica de GTPCHI (enzima limitante de la velocidad de síntesis de BH4), DDAHII que es la enzima que convierte la ADMA, L-citrulina, PDE5A1 (fosfodiesterasa 5A1) y eNOS.

3.1.4.1.1 1 RT-PCR: Análisis de la expresión genética.

Se realizaron análisis de la expresión de ARN mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR): el ARN total se aisló de HDMVEC utilizando el reactivo de aislamiento TriPure® (Roche, Indianápolis, EEUU). La integridad del ARN extraído se confirmó con *Bioanalyzer 2100* (Agilent, Palo Alto, CA, EEUU). La transcripción inversa se llevó a cabo a partir de 300 ng de ARN total con el kit de reactivos de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU). El ADNc se amplificó con ensayos específicos prediseñados por Applied Biosystems (Assay-by-Design) para GTPCH-I (Hs00609198_m1), DDAHII (Hs00967863_g1), PDE5A1 (Hs00153649_m1), eNOS (Hs015746APDH11), prediseñado por Appl1 (nº de cat.: 4352339E) como gen de mantenimiento en un sistema de RT-PCR rápido 7900HT (Applied Biosystem) utilizando *Universal Master Mix* (Applied Biosystems). La cuantificación relativa de estas diferentes transcripciones se determinó con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando β -actina como control endógeno (Applied Biosystems; 4352339E) y normalizado a controles no diabéticos no tratados. Se informaron los resultados de n = 3 experimentos independientes por triplicado.

3.1.4.1.2 Western Blot: Análisis de la expresión proteica

Se realizaron análisis de transferencia de Western para detectar cambios en GTPCH-I, DDAHII, PDE5A1, eNOS. Con este fin, se utilizaron HDMVEC que se lisaron en frío con un tampón de lisis que consta de Tris 20 mM pH 7,4, ácido etilendiaminotetraacético

(EDTA) 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,1%, ditioneitol 1 mM y 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pepstatina A complementado con un cóctel completo de inhibidores de proteasa. Se utilizará el ensayo Bio-Rad (*Bio-Rad Laboratories Ltd., Herts, Reino Unido*), siguiendo las instrucciones del fabricante, para cuantificar el nivel de proteína en cada muestra para asegurar una carga de proteína igual. Se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio para separar las proteínas según su peso molecular. Brevemente, se cargaron 10 μg de proteínas (desnaturalizadas) junto con un marcador de proteína de peso molecular, marcador de caleidoscopio de Bio-Rad (*Bio-Rad Laboratories*), en un gel de acrilamida que consta de un gel de apilamiento de acrilamida al 5% apilado sobre un gel de resolución de acrilamida y pasa a través del gel mediante la aplicación de 100 V durante 1 hora. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno utilizando un método de transferencia en húmedo. La membrana se bloquea con Marvel al 5% en PBS que contiene 0,1% de Tween20 (PBS-T) y luego se probaron con anticuerpo policlonal de conejo anti GTPCH-I humano, anticuerpo policlonal de conejo anti DDAH II humano, anticuerpo monoclonal de ratón anti PDE5A humana (nº: Santa Cruz sc-39874, MW predicho 95 kDa), anticuerpo anti-eNOS humano policlonal de conejo (nº de cat.: Cell Signaling 9572, MW predicho 140 kDa), anticuerpo monoclonal de ratón contra la β -actina (Sigma A- 5316, Clon AC-74), sirviendo este último como control de carga de "limpieza". El método de quimioluminiscencia mejorado de detección de proteínas con ECL plus (*Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido*) se utilizó para detectar proteínas marcadas. Los resultados se presentan como transferencias de Western representativas.

3.1.4.2 Medida de BH4

Las HDMVEC de pacientes diabéticos se sembraron en placas porta para inmunfluorescencia. Cuando se obtuvo una confluencia del 80%, los fármacos TOP 52, TOP N53, sildenafilo, Nitroprusiato sódico o vehículo se añadieron 30 minutos antes de exponer las células a glucosa 30 mM durante 24 horas. BH4 se determinó mediante el *kit Annexin ELISA BH4 (MBS733839, Mybiosource)*. La intensidad del color se mide espectrofotométricamente a 450 nm en un lector de microplacas.

3.1.4.3 Medición de la actividad nos dependiente de Ca^{2+}

En las células endoteliales, la actividad de la NOS dependiente de Ca^{2+} se rige en gran medida por la eNOS. En la diabetes o situaciones con glucosa en sangre alta, la actividad

de la eNOS NO se suprime con el desacoplamiento impulsado por ROS como mecanismo crítico, entre otras cosas. En estas investigaciones se abordaron si los compuestos de prueba (TOP N53, TOP 52) o de referencia (sildenafil y nitroprusiato) pueden restaurar la actividad de eNOS comprometida o bien prevenir el desacoplamiento de eNOS.

Las HDMVEC en cultivo normal a glucosa estándar, y también alta (30 mM), T2DM, se incubaron con compuestos de prueba (TOP N53, TOP 52) y de referencia (sildenafil, nitroprusiato sódico) durante los tiempos apropiados. Las células se homogeneizaron mediante sonicación en un tampón que comprende Tris HCl 25 mM, pH 7,5, EDTA 0,8 mM y EGTA 0,8 mM. La actividad NOS en lisados celulares recién preparados se determinó aprovechando un ensayo no radiactivo disponible comercialmente, ejemplificado por el “ensayo NOS colorimétrico ultrasensible” (nº de cat .: NB78) de *Oxford Biomedical*. El ensayo se basa en la conversión de L-arginina agregada en óxido nítrico que reacciona rápidamente con nitratos y nitritos en los lisados celulares. Se permite que el sistema funcione de manera estable durante varias horas gracias a un sistema de reciclaje de NADPH basado en glucosa 6-fosfato / glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Una vez finalizada la reacción, el nitrato se reduce a nitrito añadiendo nitrato reductasa y el nitrito determinado por reactivos de Griess (sulfanilamida en HCl 3 N, y diclorhidrato de N- (1-naftil) etilendiamina). Para medir la NOS dependiente de Ca^{2+} , la concentración final de Ca^{2+} en el ensayo debe ser de 600 μ M. Se realizarán mediciones en presencia y ausencia de Ca^{2+} para permitir el cálculo de la actividad NOS dependiente de Ca^{2+} . La actividad de NOS también se medirá en presencia de L-N^G- ester metil - nitro arginina (L-NAME) (10 μ M).

3.1.4.4 Medición del contenido de GMPc de las células endoteliales

Las mediciones de GMPc intracelular se realizan usando un sistema de EIA GMPc de GE Healthcare (GEHC), orden # RPN226 siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo tiene una sensibilidad de 2 fmol de GMPc por pocillo. Las incubaciones se terminan agregando tampón de lisis de GEHC y las células se dejan durante 10 minutos en agitación para asegurar la lisis completa. El GMPc en las muestras se acetila luego usando trietilamina y anhídrido acético y se determina mediante un ELISA competitivo. El ELISA se basa en la competencia entre GMPc acetilado en lisados de cultivo celular y un conjugado de GMPc marcado con peroxidasa por sitios de unión limitados en un antisuero específico de GMPc inmovilizado en placas de 96 pocillos prerrevestido. El

GMPc se determina en función de una curva estándar. La incubación con los compuestos de prueba y de referencia se realiza durante diferentes períodos de tiempo (1 hora, 6 horas, 24 horas). Los resultados se expresarán como fmol GMPc en 10^4 células como media +/- SE. Se realizarán tres experimentos independientes cada uno por triplicado.

3.1.5 Células progenitoras endoteliales

Para estudiar los efectos de los compuestos de prueba (TOP N53, TOP 52) y de referencia (sildenafil y nitroprusiato sódico) en la formación de CPE, se cultivaron células mononucleares de sangre periférica humana con medio de crecimiento de células endoteliales en placas recubiertas de colágeno durante 14-21 días en presencia o ausencia de compuestos de prueba y de referencia. Para ello, se siguió el protocolo descrito por *Sahara et al.*¹⁷⁹, con algunas modificaciones. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de voluntarios sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad y se resuspendieron en medio de crecimiento de células endoteliales complementado con 1 μg / ml de hidrocortisona, 3 μg / ml de extracto de pituitaria bovina, 10 ng / ml de recombinante humano VEGF y FBS al 10% (medio EGM-2 completo). Se cultivaron PBMC a una densidad de 10^7 células por pocillo de una placa de 6 pocillos recubierta previamente con colágeno de cola de rata tipo 1 (*BD Biosciences*) a 37 ° C, 5% de CO₂, en una incubadora humidificada. Después de 24 horas, las células no adherentes y los residuos se eliminaron por aspiración, las células adherentes se lavaron una vez y se volvió a agregar el medio EGM-2 completo a cada pocillo. El medio se cambió diariamente durante 7 días y luego cada dos días. Durante este período de incubación, las células se estimularon simultáneamente con el compuesto o vehículo de prueba (TOP N53 y TOP 52) y de referencia (sildenafil y nitroprusiato sódico) y vehículo (DMSO al 0,1%). En los días 14 a 21, se espera que aparezcan colonias de células endoteliales que se originaron a partir de células adherentes. El número de colonias de células endoteliales se contaron mediante inspección visual utilizando un microscopio invertido. El día 21, las células adherentes que formaban colonias de células endoteliales se incubaron con 10 μg / ml de DiI; 1,1'-dioctadecil-3,3,3', 3'-tetrametilindo-carbocianina perclorato (DiI-Ac-LDL) (Molecular Sondas) durante 2 horas. Luego, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se tiñeron con aglutinina I de *Ulex europaeus* marcada con FITC (UEA I; laboratorios EY). Los núcleos se contratiñeron con Hoechst 33258 (Sigma). Las células adherentes que se tiñen positivamente tanto para DiI-Ac-LDL como para FITC-UEA I se consideraron células progenitoras endoteliales.

3.2 Estudios funcionales de órgano aislado en aorta de rata

3.2.1 Enfoque metodológico del estudio

3.2.1.1 Objetivos

Explorar si TOP N53 Y TOP 52 mejoran las relajaciones inducidas por inhibidores de PDE5 en condiciones de ausencia de endotelio o en presencia de inhibidores de la NO sintasa como L-NAME.

3.2.1.2 Enfoque experimental

Los estudios se realizarán en anillos aórticos aislados de rata, precontractados con fenilefrina (FE) control (con endotelio intacto) y sin endotelio o L-NAME (para bloquear la generación de NO endotelial) como modelo de órgano aislado de disfunción endotelial. Se compararán las relajaciones dependientes de la concentración de TOP N53, TOP 52 y sildenafil (referencia). Este protocolo tiene como referencia los estudios *de Komaz et al.*¹⁸⁰ y *Klein et al.*¹⁸¹ en los que se informó de una respuesta de relajación comprometida a un inhibidor de PDE5 solo en ausencia de endotelio.^{180,181} Además, se estudiarán los efectos de TOP N53, TOP 52, sildenafil sobre el deterioro inducido por glucosa alta (25 mM).

3.2.2 Baño de órganos

3.2.2.1 Descripción del sistema de baño de órganos

El sistema empleado está formado por una doble copa de vidrio que consta de:

- Una cámara externa, parte de un circuito cerrado, el cual mantiene constante la temperatura de la cámara interna mediante una rápida circulación de agua a una temperatura de 37°C mediante la ayuda de un termocirculador (Termocirculador Harvard).
- Una cámara interna de 5 ml de capacidad donde colocamos la solución nutritiva de Krebs tamponada la cual estará continuamente burbujeada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) a través de un filtro o conexión conectado al fondo de la cámara, donde además existe una salida para el drenaje del líquido nutritivo. En su interior se aloja una varilla de acero inoxidable acodada donde se fijará por uno de sus extremos las tiras de músculo liso bronquiales.

Todo el sistema, está sujeto a la mesa de laboratorio mediante un emparrillado vertical reforzado, quedando así aislado de las vibraciones y golpes en el suelo o en la misma mesa donde están colocados los aparatos de registro, habida cuenta de la extrema sensibilidad necesaria para el registro de las contracciones o relajaciones del músculo liso de aorta de rata. Las copas de vidrio del baño, las varillas de sujeción y el transductor isométrico se hallan sujetos mediante pinzas y nueces al emparrillado. Habitualmente se trabaja en cada experiencia con 8 copas de baños de órganos diferentes.

3.2.2.2 Montaje del preparado.

El anillo de aorta de rata empleado se introduce en la cámara interna de la copa del baño, la cual está llena de solución nutritiva de Krebs mantenida a 37°C a través del termocirculador antes mencionado (*Thermocirculator Harvard*) y burbujeada con carbógeno. A lo largo del experimento, se toman muestras del líquido nutritivo para medir el pH y comprobar si se mantiene dentro de los límites razonables (no debe exceder 7.6 al final del experimento). Los anillos de aorta de rata están sujetos por dos varillas finas que se introducen en el interior del anillo. Una de las varillas está unida a un punto fijo en el interior del baño (varilla acodada), y la otra varilla está conectada a un transductor isométrico provisto de un tornillo micrométrico de precisión que permite transmitir pequeños cambios de tensión del tejido. El transductor isométrico, a su vez, se halla conectado a un amplificador PowerLab 800 (*ADInstruments, Grand Junction, CO*) provisto de un mecanismo de supresión cero y señal interna de calibración. Los cambios en la tensión isométrica de las tiras bronquiales procesadas por el amplificador quedan registradas en un ordenador que emplea el programa *Chart for Windows versión 3.4 (ADInstruments)* que permite obtener un registro gráfico donde podremos analizar posteriormente. Los cambios de fuerza se expresan en gramos.



Figura 3.2. Imagen de baño de órganos con un anillo arterial montado

3.2.3 Condiciones experimentales

3.2.3.1 *Animales*

Se utilizó un total de 131 ratas Sprague-Dawley macho de 11 semanas (peso corporal medio de 250 ± 15 g) de Harland (Barcelona). El estudio se ajustó a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (1996). Tras una semana de aclimatación, las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas. Cuando la anestesia alcanzó la profundidad suficiente, determinada por la ausencia de la respuesta de flexión de la pierna y el reflejo del párpado, el tórax se abrió rápidamente mediante una incisión en la línea media y las ratas se sacrificaron cortando el corazón y desangrando. La aorta se extrajo rápidamente sin dañar el endotelio y se colocó en un vaso de precipitados lleno de solución de Krebs y se burbujó con carbógeno (95% O₂ / 5% CO₂).

Condiciones de mantenimiento de animales: Una vez llegadas del proveedor (Harlan, Barcelona) las ratas fueron ubicadas en la Casa de Animales de la Unidad Central de Investigación Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia en condiciones estándar (15 cambios de aire / h; humedad ~ 60%, ciclo de luz / oscuridad 12 / 12 horas, ~ 22 ° C). Las ratas tomaban alimento Panlab A04 (dieta estándar en Animal House) y tenían acceso a agua corriente ad libitum. [Declaración sobre el bienestar animal]

El estudio en animales que se describe a continuación se realizó con la licencia No 2016 / VSC / PEA / 00139 Tipo 2 del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Generalitat de Valencia (Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca).

3.2.3.2 *Preparación de suspensiones y soluciones de prueba*

Los compuestos de prueba (TOP N53, TOP 52) y de referencia (sildenafil) (polvo seco) se disolvieron en DMSO al 100% para dar como resultado una solución madre 10 mM considerando sus pesos moleculares de 604.5 g / mol para TOP N53, 559.5 g / mol para TOP 52 y 474 g / mol para Sildenafil. Como ejemplo, se disolvieron 6.045 mg de TOP N53, 5.595 mg de TOP 52 o 4.74 mg de Sildenafil en 1 ml de DMSO. Se almacenaron alícuotas de 100 μ l de estas soluciones madre a -20 ° C. Todas las diluciones posteriores se prepararon a partir de las soluciones madre 10 mM del ensayo o de los elementos de referencia el mismo día del experimento.

- *Primera dilución intermedia:* Se etiquetaron ocho tubos Eppendorf de la siguiente forma: 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M y 0 (vehículo) y se agregaron 90 μ l de DMSO a cada uno de los tubos. A continuación, se añadió un volumen de 10 μ l de la solución madre 10 mM de los elementos de prueba o de referencia en DMSO al 100% al tubo etiquetado como 10^{-4} M mezclado con vórtex durante 30 segundos. Luego se extrajo un volumen de 10 μ l del tubo etiquetado como 10^{-4} M y se añadió al tubo etiquetado como 10^{-5} M seguido de un mezclado (30 segundos) y así sucesivamente. Del último tubo etiquetado como 10^{-10} M se retiró y desechó un volumen de 10 μ l. Las concentraciones intermedias resultantes de la dilución 1/10 de los fármacos de prueba o de referencia fueron 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M en DMSO al 100% (v / v).
- *Segunda dilución intermedia:* A continuación, a los ocho tubos se añadió un volumen de 810 μ l de solución de Krebs (composición (mM); NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl₂ 1.9, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0 y glucosa 5.0) seguido de mezclado con vortex inmediato durante 30 segundos. Las concentraciones resultantes de los elementos de prueba o de referencia fueron 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M y vehículo, todo en 10% DMSO (v / v) en un volumen final de 900 μ l. Todas las diluciones resultaron ser soluciones claras y sin precipitados a la inspección visual.

- *Diluciones finales en el baño de órganos:* Para la construcción acumulativa de la curva de concentración-respuesta, en los baños de órganos con copas de 5 ml, se añadió en primer lugar 50 μ l de la solución etiquetada como 10^{-10} M de la segunda dilución intermedia 10% DMSO (v / v), lo que dio como resultado la primera concentración de 10^{-12} M de fármaco en DMSO al 0,1%. Una vez que la respuesta de relajación fue estable, la siguiente concentración final en el baño fue de 10^{-11} M de fármaco y se logró agregando un volumen de 45 μ l de la segunda solución intermedia 10^{-9} M con la prueba o elemento de referencia con DMSO al 10% de la dilución intermedia. Una vez que la respuesta de relajación fue estable, la siguiente concentración fue de 10^{-10} M de fármaco y se logró agregando un volumen de 45 μ l de la solución 10^{-8} M de fármaco con DMSO al 10% de la segunda dilución intermedia. Y así sucesivamente hasta la última concentración final en el baño de 10^{-6} M en DMSO al 0,1%. Las concentraciones objetivo de los fármacos de prueba (TOP N53 y TOP 52) o de referencia (sildenafil) en los baños de órganos fueron 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M en 0.1% DMSO.

Teniendo en cuenta un aumento en el volumen de la solución de Krebs en el baño de órganos desde inicialmente 5000 μ l por 50 μ l para la concentración de 10^{-12} M y 45 μ l por paso de concentración ascendente hasta un volumen final de 5320 μ l a 10^{-6} M, la concentración real en el baño de órganos fue ligeramente menor que la concentración objetivo como se muestra en la Tabla contigua. A la concentración objetivo más alta de 1000 nM (10^{-6} M), la concentración real fue de 939,85 nM, que es un 6% menos que la concentración objetivo. Esta desviación se consideró aceptable.

Concentración objetivo en el baño de órganos		Concentración dilución intermedia		Volumen añadido	Volumen en baño	Conc. Final en baño	Porcentaje desviación
log M	nM	log M	nM	μl	μl	nM	%
-12	0,001	-10	0,1	50	5050	0,00099	0,99
-11	0,01	-9	1	45	5095	0,0098	1,86
-10	0,1	-8	10	45	5140	0,097	2,72
-9	1	-7	100	45	5185	0,964	3,57
-8	10	-6	1000	45	5230	9,56	4,40
-7	100	-5	10000	45	5275	94,79	5,21
-6	1000	-4	100000	45	5320	939,85	6,02

Tabla 3.1. Concentraciones objetivo, concentraciones reales y el porcentaje de desviación de la concentración real de la concentración objetivo en el baño de órganos (5 ml) para los fármacos estudiados (TOP N53 y TOP 52) y de referencia (sildenafil) diluidos para la secuencia acumulativa ascendente de concentraciones siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

El inhibidor de óxido L-NAME (# 483125M) y el inhibidor de la GC soluble sensible al NO: 1H- [1,2,4] Oxadiazolo [4,3- a] quinoxalin-1-ona (ODQ) (# O3636) se adquirieron de Sigma-Aldrich Quimica Madrid España. Para L-NAME, se preparó una solución stock de 10 mM en solución de Krebs inmediatamente antes de su uso en el experimento y se diluyó 100 veces en solución de Krebs para el baño de órganos para una concentración final de 100 μM. En términos de ODQ, se preparó una solución madre de 10 mM en DMSO al 100% y se almacenó a -20°C. A partir de la solución madre, se diluyó ODQ 1000 veces en solución de Krebs para el baño de órganos para una concentración final de 10 μM (DMSO al 0,1%). En los experimentos con ODQ, la concentración final de DMSO en el baño de órganos ascendió al 0,2% (v / v).

3.2.3.3 *Estudios de tensión isométrica en anillos de aorta de rata aislados.*

3.2.3.3.1 *Preparación de anillos de aorta de rata*

3.2.3.3.1.1 *Endotelio intacto*

Se montaron anillos aórticos torácicos (3-4 mm de diámetro) en unidades separadas de baños de órganos de 5 ml (Aparato *Panlab Harvard*, Cornellà, Barcelona, España) que contenían solución de Krebs con la siguiente composición (mM) NaCl 118,0, KCl 4,7, CaCl₂ 1,9, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0 y glucosa 5.0 y mantenidos a 37 ° C y burbujeados con carbógeno. Se añadió indometacina (1 µM) a la solución salina. Los anillos arteriales se fijaron a transductores isométricos de la serie *UFI* (Aparato de *Harvard*, Cornellà, Barcelona, España), mediante tornillo micrométrico se estableció una tensión inicial en reposo de 1-1,5 g. A continuación, se determinó la integridad endotelial de las preparaciones verificando la capacidad de respuesta a Ach 1 µM en vasos precontraídos con FE 300 nM, correspondiente al 80-90% de su efecto máximo, basándonos en experimentos anteriores. La prueba de Ach consistió en:

- Cuando la relajación por Ach 1 µM fue inferior al 60% de la tensión conseguida con FE 300 nM, se descartó la preparación.¹⁸⁰ Los anillos elegidos se lavaron varias veces para restaurar la tensión al nivel inicial.
- Después de este procedimiento, se dejó que las preparaciones se equilibraran durante 60 min antes de contraerlas a una nueva concentración única de FE (300 nM).

3.2.3.3.1.2 *Disfunción endotelial por remoción mecánica endotelial*

La capa de células endoteliales se eliminó mecánicamente de los anillos de la aorta torácica raspando suavemente la superficie luminal con una varilla de vidrio de 1,5 mm. Los tejidos se unieron a transductores transductor isométricos, estirados hasta una tensión inicial de 1-1,5 g como se describe en el apartado anterior. A continuación, se confirmó la ausencia del endotelio verificando la falta de respuesta a la Ach (1 µM) en vasos precontraídos con FE (300 nM). Luego, los anillos aórticos se lavaron varias veces para restaurar la tensión al nivel inicial en la solución de Krebs con (mM) NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl₂ 1.9, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0 y glucosa 5.0 y se mantuvieron a 37 ° C, 95 % O₂ / 5% CO₂. Se permitió que las preparaciones se equilibraran en solución

de Krebs durante 60 min antes de contraerlas con una nueva concentración única de FE (300 nM; EC 80-90% de su propio efecto máximo).

3.2.3.3.1.3 Disfunción endotelial secundaria a L-NAME

Se prepararon y seleccionaron anillos aórticos torácicos a partir de la "prueba de ACh" como se describe en la sección "Endotelio intacto". Los anillos aórticos torácicos elegibles se lavaron y equilibraron varias veces para restaurar la tensión al nivel inicial en solución de Krebs con (mM) NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl₂ 1.9, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0 y glucosa 5.0 y se mantuvieron a 37 ° C, 95% O₂ / 5% CO₂. Se permitió que las preparaciones se equilibraran en solución de Krebs durante 60 min y se añadió L-NAME (100 µM) 30 min antes de la contracción a una nueva concentración única de FE (300 nM). Se confirmó la relajación dependiente del endotelio comprometida verificando la falta de respuesta a la Ach (1 µM) en vasos precontraídos con FE (300 nM).

3.2.3.3.1.4 Disfunción endotelial secundaria a glucosa alta

Se prepararon y seleccionaron anillos aórticos torácicos a partir de la "prueba de ACh" como se describe en la sección "Endotelio intacto". Los anillos aórticos torácicos elegibles se lavaron y equilibraron varias veces para restaurar la tensión al nivel inicial en solución de Krebs con (mM) NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl₂ 1.9, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0 y glucosa 25.0 y se mantuvieron a 37 ° C, 95% O₂ / 5% CO₂. Se permitió que las preparaciones se equilibraran durante 60 min en solución de Krebs con glucosa alta (25 mM) antes de contraerlas a una nueva concentración única de FE (300 nM).¹⁸² Se confirmó la relajación dependiente del endotelio comprometida verificando la falta de respuesta a la Ach (1 µM) en vasos precontraídos con FE (300 nM). Durante todo el experimento se mantuvo la glucosa alta (25 mM).

3.2.3.3.2 *Relajación dependiente de la concentración por TOP N53, TOP 52 y sildenafil*

Para explorar la relajación dependiente de la concentración de TOP N53, TOP 52 (elementos de prueba) y sildenafil (elemento de referencia) en un rango de concentración de 10^{-12} M a 10^{-6} M en anillos aórticos de rata precontraídos con FE 300 nM. Cuando se encuentra en la meseta de contracción se añaden de forma acumulativa concentraciones crecientes de los fármacos estudiados (TOP N53 y TOP 52) y de referencia (sildenafil) en los baños de órganos hasta lograr la relajación máxima. Cada concentración sucesiva de fármaco se administraba una vez el efecto se había estabilizado (30 min). Finalmente, se añadió nitroprusiato de sodio (100 μ M) con el fin de obtener la máxima relajación de los anillos arteriales. Además, se ejecutaron algunos experimentos en presencia adicional de ODQ (10 μ M), un inhibidor de la GC soluble sensible al NO que se añadió al baño de órganos 30 min antes de la FE.

Para obtener curvas completas de relajación dependientes de la concentración para las siete concentraciones se requirió un período de 3,5 horas (30 min por concentración). Durante este período, se realizaron grupos de control de vehículo en los que la tensión se montó con FE (300 nM) y anillos aórticos de rata expuestos al vehículo (DMSO al 0,1% en solución de Krebs) durante 3,5 horas. Para tener en cuenta una pérdida gradual de tensión (mg) a lo largo del tiempo, el cálculo de la "relajación (%)" para una concentración dada de elemento de prueba / referencia (en presencia de FE) probado en un momento dado se basó en la tensión con FE y vehículo al mismo tiempo. Como ejemplo, se midió la concentración 1 nM del elemento de prueba / referencia 90 min después de agregar FE. Por tanto, para el cálculo de la relajación (%) se tomó la tensión con FE y vehículo a los 90 min. El valor de la concentración inhibitoria 50 [CI50] se expresó en nM y se calculó a partir de la regresión no lineal de las curvas de concentración frente a relajación (%). La tensión isométrica se midió con transductores de fuerza isométrica con el software Chart versión 2.1.0 y el equipo *Powerlab ADInstruments* (Cornella, Barcelona, España).

3.2.3.3 Experimentos de valoración del efecto en el curso del tiempo

En una serie separada de experimentos, se investigó el curso temporal de la relajación que emana de los elementos de prueba (TOP N53, TOP 52) y de referencia (sildenafil) a concentraciones únicas preseleccionadas. Se prepararon anillos aórticos de rata, se montaron en los transductores de desplazamiento de fuerza a una tensión de 1-1,5 g y se seleccionaron respondedores de ACh exactamente como se describe anteriormente.

Los fármacos TOP 52 (0,1 nM), TOP N53 (0,1 nM) o sildenafil (1 nM) (concentraciones finales en los baños de órganos entre paréntesis). se añadieron a los baños de órganos en la meseta de tensión con FE 300 nM. La relajación se midió a los 7, 15 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. Finalmente, se agrega nitroprusiato sódico (100 µM) para obtener la máxima relajación de los anillos arteriales.

En una segunda serie separada de experimentos, se investigó el curso temporal de la relajación que emana de los elementos de prueba (TOP N53, TOP 52) y de referencia (sildenafil) a concentraciones acumulativas dejando transcurrir 7 o 15 minutos entre la adición de concentraciones diferentes. De esta forma, junto a los experimentos ya realizados, y descritos anteriormente, se valoró las diferencias en la cinética de relajación de los distintos fármacos a 7, 15 y 30 min.

3.2.3.4 Fármacos y productos químicos utilizados

Los productos utilizados y el laboratorio de procedencia son los siguientes:

- Bicarbonato sódico (NaHCO₃): procedencia E. Merck Darmstadt.
- Bifosfato potásico (KH₂PO₄): procedencia E. Merck Darmstadt.
- Cloruro de calcio (CaCl₂): procedencia E. Merck Darmstadt.
- Cloruro de potasio (KCl): procedencia E. Merck Darmstadt.
- Cloruro de sodio (NaCl): procedencia E. Merck Darmstadt.
- D(+)-Glucosa: procedencia Panreac.
- Dietilmetilsulfato (DMSO): procedencia Sigma-Aldrich Química S.A.
- Sulfato de magnesio (MgSO₄): procedencia E. Merck Darmstadt.
- phenylephrine (FE, P1240000), procedencia Sigma-Aldrich Química S.A
- acetylcholine (ACh, A6625), procedencia Sigma-Aldrich Química S.A
- Indomethacin (I7378), procedencia Sigma-Aldrich Química S.A

- sodium nitroprusside (SNP) dihydrate (71778); procedencia Sigma-Aldrich Química S.A.
- *L-NAME*: *N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; CAS Number: 51298-62-5 procedencia Sigma-Aldrich Química S.A.
- TOP N53; (E)-2-(1-((3-(6-((hydroxyimino)methyl)-5-methyl-4-oxo-7-propyl-3,4-dihydropyr-rolo[2,1-f][1,2,4]triazin-2-yl)-4-propoxyphenyl)sulfonyl)piperidin-4-yl)ethyl nitrate) Lot: C2104861P. procedencia TOPADUR.
- TOP 52; (E)-2-(5-((4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl)sulfonyl)-2-propoxyphenyl)-5-methyl-4-oxo-7-propyl-3,4 dihydropyrrolo[2,1f][1,2,4]triazine-6-carbaldehyde oxime. Lot: C210434P. procedencia TOPADUR.
- Sildenafil; procedencia CAYMAN CHEMICAL #10008671

3.2.3.5 *Análisis de resultados*

Los datos se presentan como la media \pm SEM del número “N” de experimentos independientes. La regresión no lineal se realizó mediante el software GraphPad Prism 7.2.0 (GraphPad San Diego, CA, EE. UU.) Utilizando la función "Sigmoidal, 4PL, X es log (concentración)". Esta función se utilizó para calcular EC50, IC40 y Emax. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE. UU.). Se aceptó la significancia cuando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Estudios en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas

4.1.1 Efectos sobre la angiogénesis de TOP N53, TOP 52, sildenafil y nitroprusiato sódico

4.1.1.1 Proliferación celular células endoteliales (incorporación de BrdU)

La exposición de las HDMVEC obtenidas de diabéticos a glucosa alta (30 mM) reduce la proliferación de células endoteliales microvasculares dérmicas de pacientes diabéticos en un 36% respecto a los valores de proliferación obtenidos sin la presencia de glucosa alta. Esta diferencia fue estadísticamente significativa.

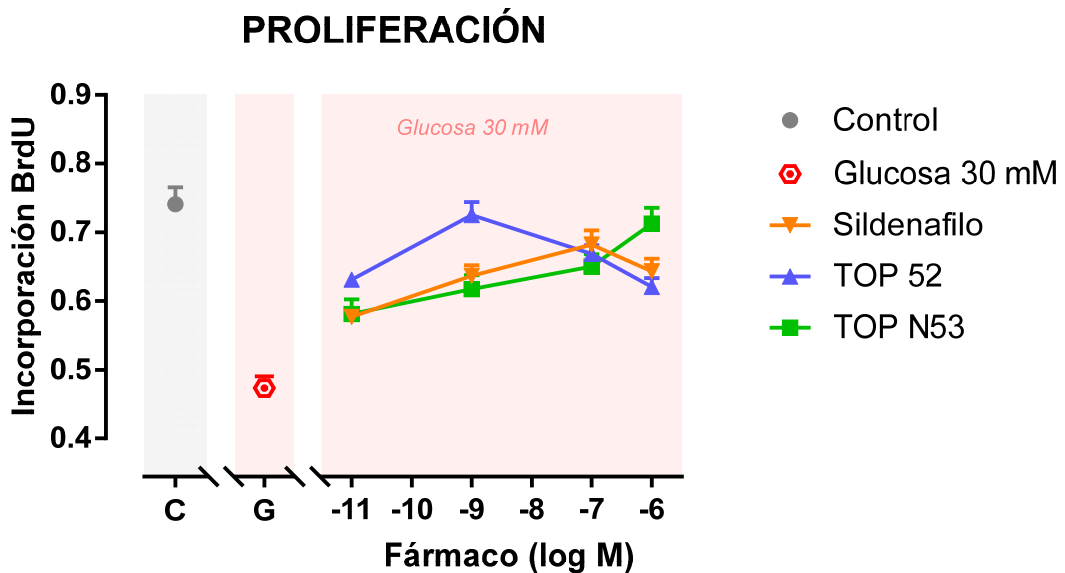


Figura 4.1. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre la proliferación de células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestas a glucosa alta (30 mM) *in vitro*. La proliferación se midió como incorporación de BrdU durante 44 horas. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de los valores de absorbancia de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

Sildenafil, TOP 52 y TOP N53 en todo el rango de concentraciones empleadas (10 pM hasta 1 μ M) aumentaron significativamente los niveles de proliferación en presencia de glucosa alta. Si bien niveles de proliferación equiparables a los obtenidos en medio de cultivo normal se alcanzaron con sildenafil (100 nM), TOP 52 (1 nM y 100 nM) y TOP N53 (100 nM y 1 μ M). Top 52 mostró un potente efecto consiguiendo su máximo efecto a 1 nM que se redujo en concentraciones superiores, en tanto que con TOP N53 se consiguió un efecto progresivo y concentración dependiente.

Con nitroprusiato sódico se obtuvieron valores de $0,655\pm 0,023$ unidades de absorbancia.

4.1.1.2 Migración de células endoteliales

La exposición de las células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos a glucosa alta (30 mM) conduce a una migración reducida en un 33% respecto a la obtenida en condiciones normales. La incubación con sildenafil, TOP 52 y TOP N53 en medio con glucosa alta recupera niveles de migración similares a los registrados en medio de cultivo sin glucosa alta. Sildenafil y TOP 52 consiguieron su máximo efecto a 1 nM, mientras que los efectos de TOP N53 fueron concentración-dependientes desde 10 pM hasta 1 μ M consiguiendo a esta última concentración el mayor valor de migración. Con nitroprusiato sódico se obtuvieron valores de 1600 ± 87 unidades de fluorescencia.

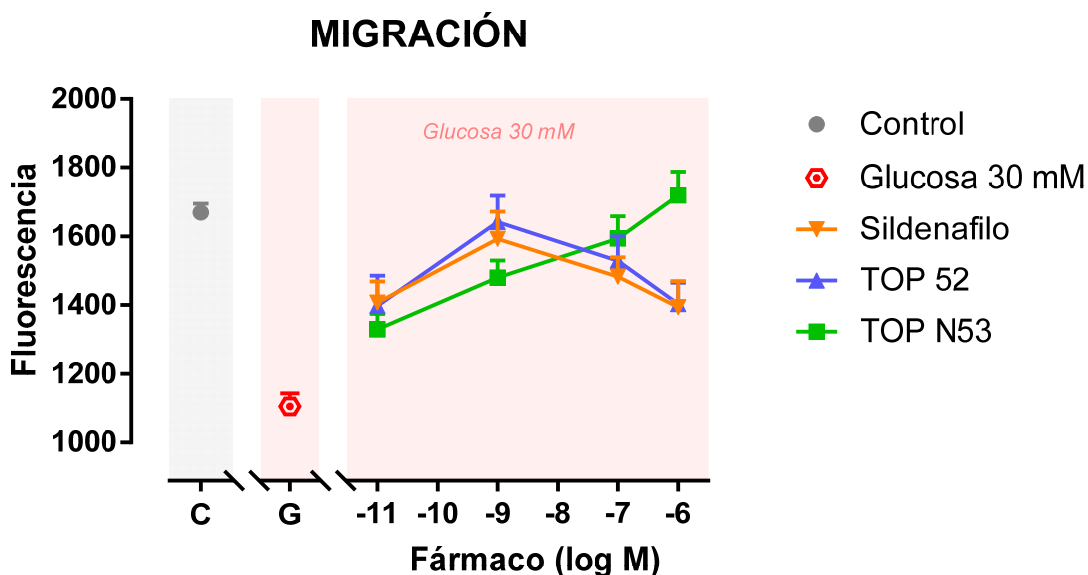


Figura 4.2. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre la migración de células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestas a glucosa alta (30 mM) in vitro. La migración se evaluó mediante un ensayo de quimiotaxis adquirido comercialmente durante 6 horas. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de unidades de fluorescencia de tres donantes con tres experimentos independientes por donante

4.1.1.3 Medición de la liberación de VEGF

La exposición de las células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos a glucosa alta (30 mM) conduce a una liberación de VEGF un 60% menor que en condiciones control. En presencia de glucosa alta la incubación con TOP N53, TOP 52 y sildenafil produce un aumento de la liberación de VEGF dependiente de la concentración. TOP 52 es el fármaco más potente consiguiendo un aumento significativo

en concentraciones entre 1p pM y 100nM, alcanzando el efecto máximo a 1 nM. Sildenafil muestra un efecto máximo a 100 nM, declinando su efecto a concentraciones superiores de 1 μ M. TOP N53 incrementa la liberación de VEGF de forma concentración dependiente a lo largo de todo el rango de concentraciones empleadas con un efecto máximo a 1 μ M. Nitroprusiato sódico incremento los niveles de VEGF en presencia de glucosa alta a niveles de 87 pg/ml.

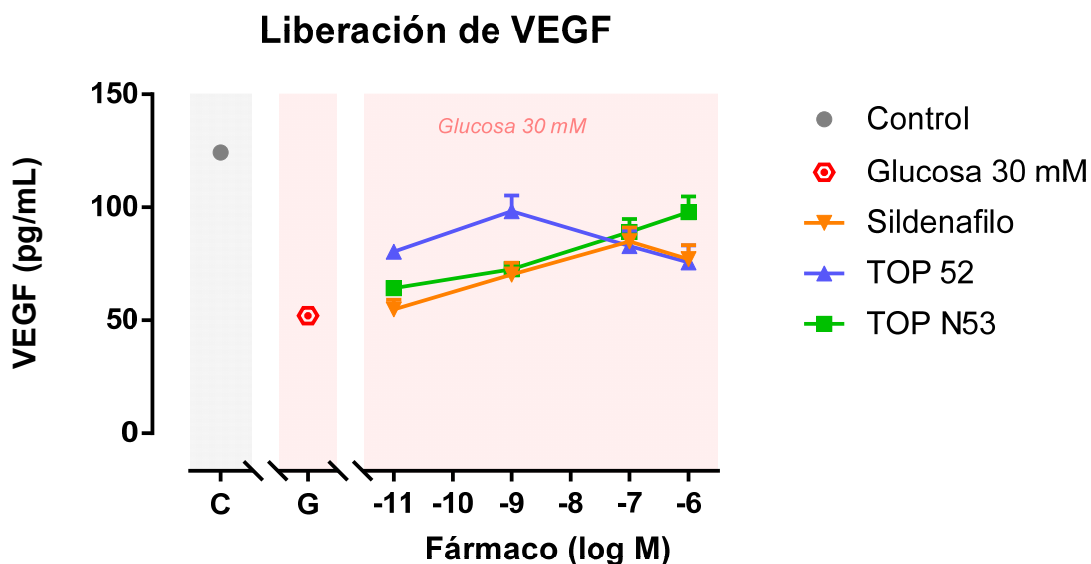


Figura 4.3. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre la liberación de VEGF en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestas a glucosa alta (30 mM) in vitro. La liberación se evaluó mediante un ensayo de ELISA adquirido comercialmente. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

4.1.1.4 Estudios de apoptosis

La exposición de las células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos a glucosa alta (30 mM) conduce a un aumento en el número de células apoptóticas desde el $14,7 \pm 3,8\%$ hasta el $47,6 \pm 3,8\%$.

Sildenafil + Glucosa 30mM

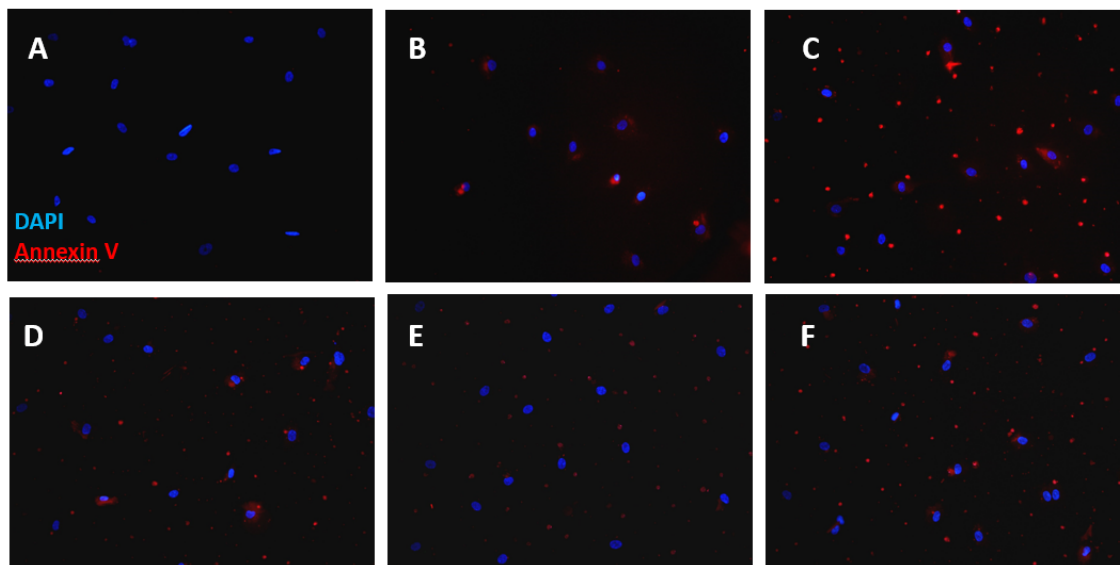


Figura 4.4. Efectos de sildenafil sobre la apoptosis en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestas a glucosa alta (30 mM) durante 24 horas. Los fármacos en diferentes concentraciones se añadieron 30 minutos antes de administrar el estímulo y se mantuvieron el resto del experimento. La cuantificación se realizó por inmunofluorescencia y las células apoptóticas se determinaron por anexina V. A. Control; B. Glucosa 30mM; C. Glucosa 30mM + Sildenafil 10pM; D. Glucosa 30mM+ Sildenafil 1nM; E. Glucosa 30mM + Sildenafil 100nM; F. Glucosa 30mM + Sildenafil 1µM.

TOP 52 + Glucosa 30mM

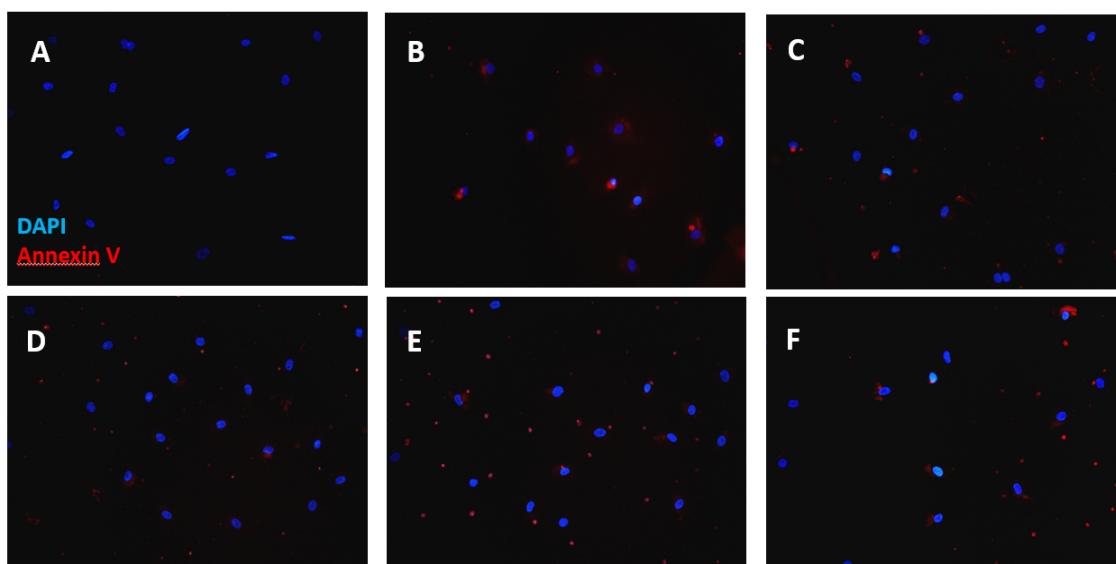


Figura 4.5. Efectos de TOP 52 sobre la apoptosis en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestas a glucosa alta (30 mM) durante 24 horas. Los fármacos en diferentes concentraciones se añadieron 30 minutos antes de administrar el estímulo y se mantuvieron el resto del experimento. La cuantificación se realizó por inmunofluorescencia y las células apoptóticas se determinaron por anexina V. A. Control; B. Glucosa 30mM; C. Glucosa 30mM + TOP 52 10pM. D. Glucosa 30mM+ TOP 52 1nM; E. Glucosa 30mM + TOP 52 100nM; F. Glucosa 30mM + TOP 52 1µM

TOP N53 + Glucosa 30mM

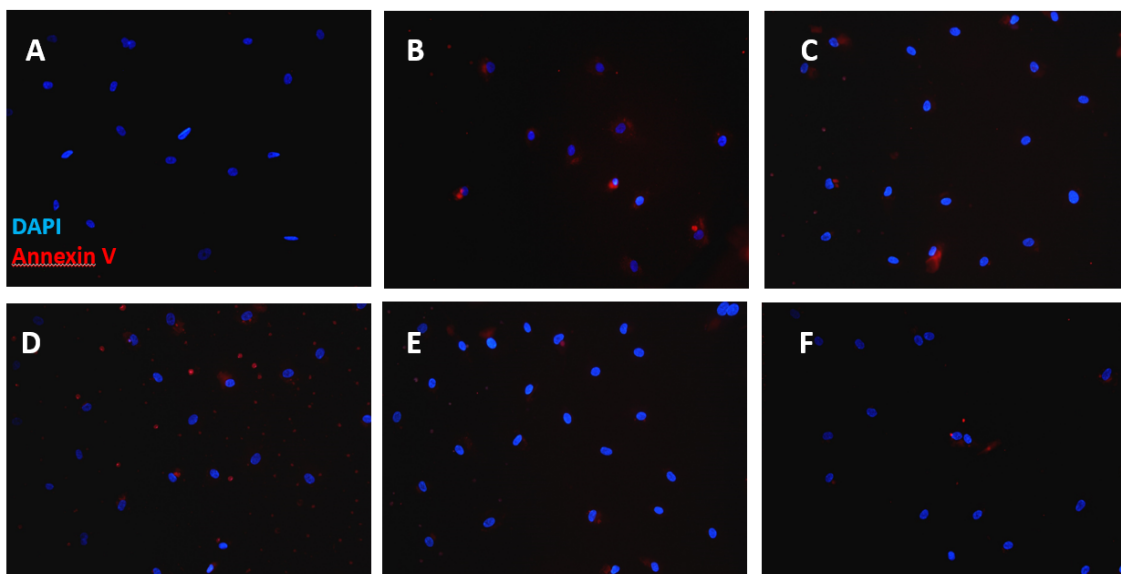


Figura 4.6. Efectos de TOP N53 sobre la apoptosis en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestas a glucosa alta (30 mM) durante 24 horas. Los fármacos en diferentes concentraciones se añadieron 30 minutos antes de administrar el estímulo y se mantuvieron el resto del experimento. La cuantificación se realizó por inmunofluorescencia y las células apoptóticas se determinaron por anexina V. A. Control; B. Glucosa 30mM; C. Glucosa 30mM + TOP N53 10pM; D. Glucosa 30mM+ TOP N53 1nM; E. Glucosa 30mM + TOP N53 100nM; F. Glucosa 30mM + TOP N53 1µM

Nitroprusiato sódico + Glucosa 30mM

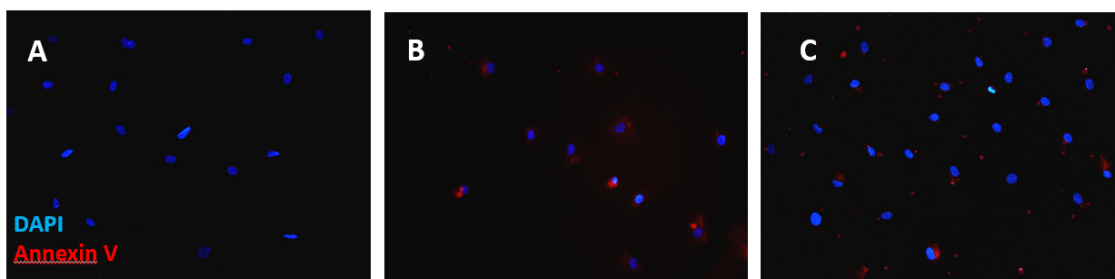


Figura 4.7. Efectos de nitroprusiato sódico (NPS) sobre la apoptosis en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestas a glucosa alta (30 mM) durante 24 horas. Los fármacos en diferentes concentraciones se añadieron 30 minutos antes de administrar el estímulo y se mantuvieron el resto del experimento. La cuantificación se realizó por inmunofluorescencia y las células apoptóticas se determinaron por anexina V. A. Control; B. Glucosa 30mM; C. Glucosa 30mM + TOP NPS 1µM.

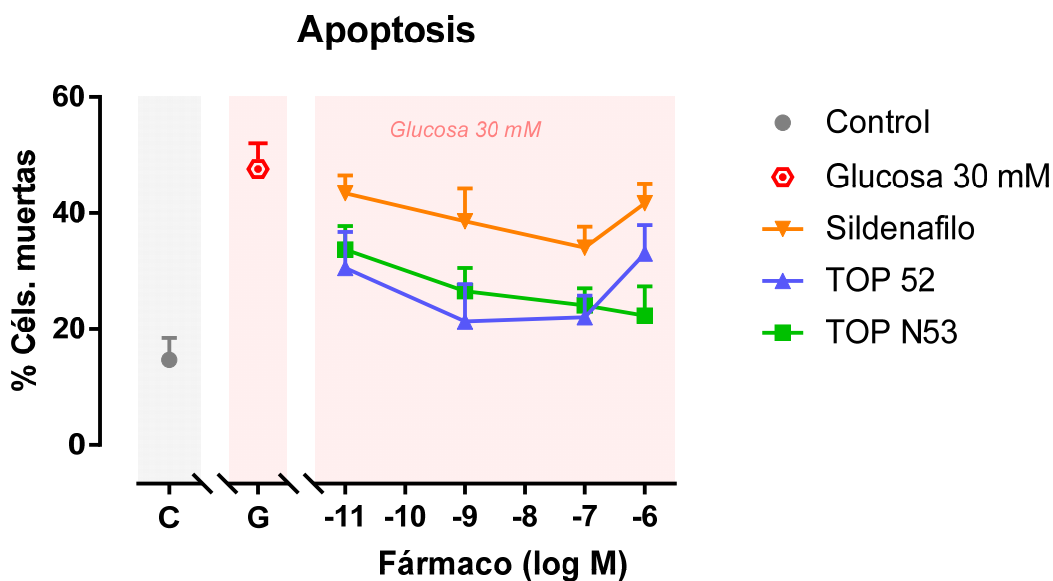


Figura 4.8. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre la apoptosis en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestas a glucosa alta (30 mM) in vitro. La apoptosis se evaluó mediante un Kit de Anexina V e inmunofluorescencia adquirido comercialmente. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. del porcentaje de células apoptóticas de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

En presencia de glucosa alta, TOP 52 redujo el porcentaje de células apoptóticas de forma concentración dependiente a 1 nM y a 100 nM; sin embargo, con una concentración mayor (1 μ M) disminuyó. Sildenafil, inhibidor puro de PDE5, mostró un perfil similar en la curva concentración respuesta, si bien su efectividad fue menor y no alcanzó un efecto significativo con ninguna concentración. TOP N53, en presencia de glucosa 30 Mm, provocó una reducción en la apoptosis concentración-dependiente en todas las concentraciones empleadas en el ensayo, alcanzando diferencias significativas desde 100 nM y con el efecto máximo a 1 μ M. El nitroprusiato sódico (1 μ M) redujo el número de células apoptóticas en presencia de glucosa 30 mM hasta el $34,5 \pm 7,6\%$.

4.1.1.5 Medición de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La glucosa alta provocó un aumento en las ROS algo mayor al 50% de los niveles obtenidos en condiciones normales.

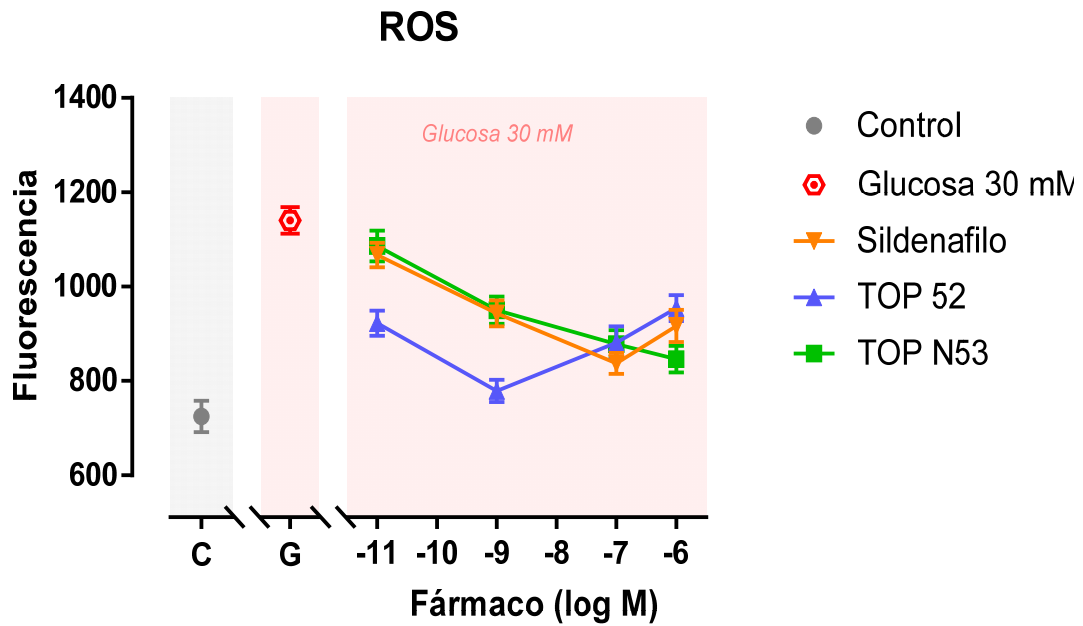


Figura 4.9. Efectos de TOP N53, TOP 52 y Sildenafil sobre la liberación de Especies reactivas de oxígeno (ROS) en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestas a glucosa alta (30 mM) in vitro. La liberación se evaluó por fluorescencia mediante la sonda H2DCF-DA (Molecular Probes). Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

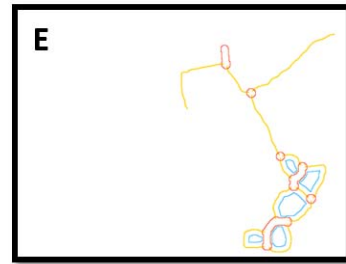
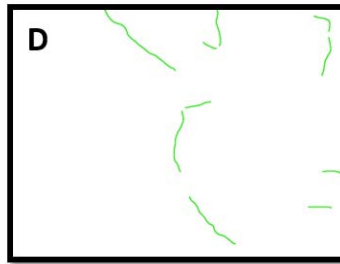
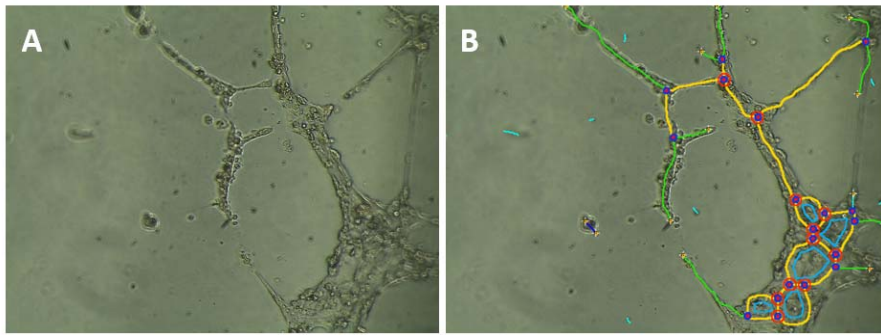
Este aumento de ROS se redujo de forma dependiente de la concentración y de forma significativa por sildenafil y TOP N53 en concentraciones igual o superiores a 1 nM. Tal y como se puede observar en la figura adjunta, TOP 52 fue el fármaco más efectivo en concentraciones de 10 pM y 1 nM. Con nitroprusiato sódico se produjo una reducción de la producción de ROS hasta niveles de fluorescencia de $989 \pm 29,5$

4.1.1.6 Ensayo de formación de tubos

La exposición de las células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos a glucosa alta (30 mM) conduce finalmente a una formación de tubos comprometida, que puede considerarse como un "criterio de valoración compuesto" de los marcadores expuestos anteriormente.

A partir de las imágenes de microscopía obtenidas se realizó el análisis de la angiogénesis cuantificando los nodos, tubos/ramas y redes/mallas. También se cuantificaron la longitud de las ramas y las uniones.

CONTROL



GLUCOSA 30 mM

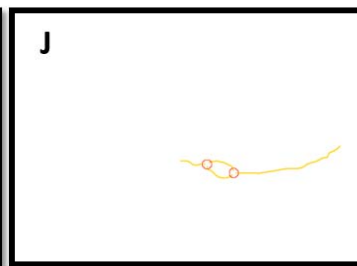
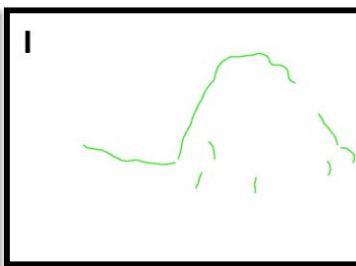
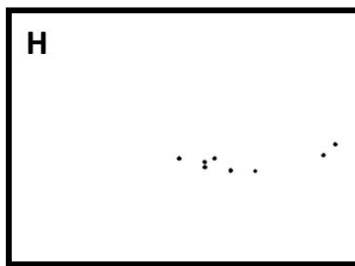
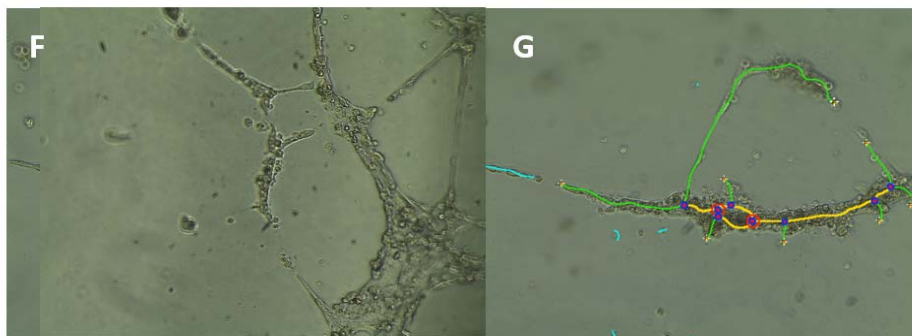
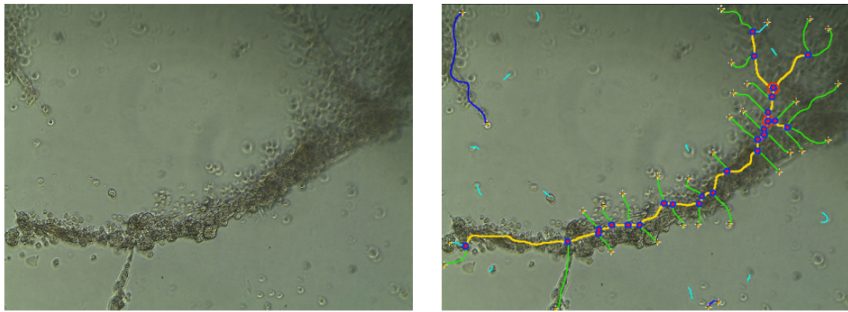
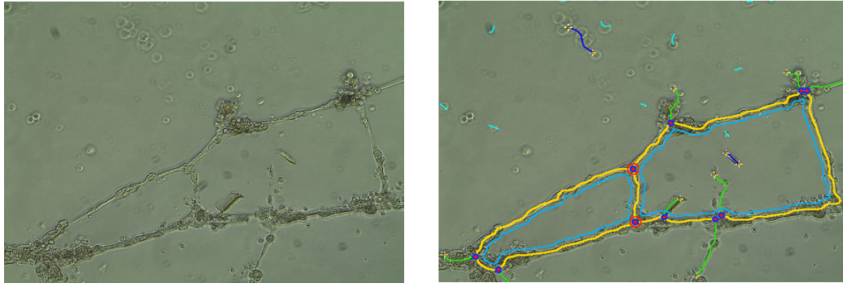


Figura 4.10. Imágenes representativas de ensayos de formación de tubos obtenidas de células microvasculares dérmicas humanas sobre placas opacas previamente revestidas con matrigel, en ausencia (A,B,C,D y E) o presencia de glucosa 30 mM (F,G,H, I y J). Las imágenes son analizadas por el programa Image J con el plugin *Angiogenesis analyzer* obteniendo imágenes donde se representan por separado los nodos (C,H) en negro, las ramas (D,I) en verde y segmentos en azul, segmentos maestros en amarillo, uniones en rojo y redes/mallas en azul (E,J). En las imágenes B y G se superponen todas las imágenes.

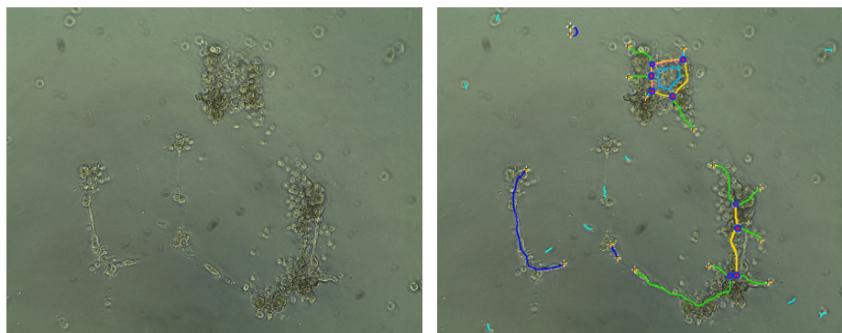
TOP 52 10 pM + GLUCOSA 30 mM



TOP 52 1 nM + GLUCOSA 30 mM



TOP 52 100 nM + GLUCOSA 30mM



TOP 52 1 μM + GLUCOSA 30 mM

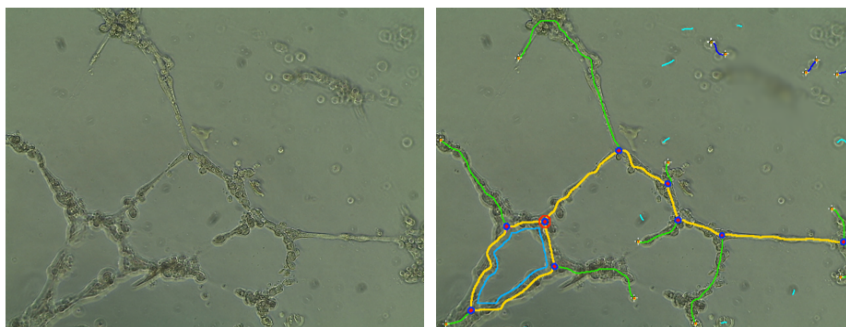
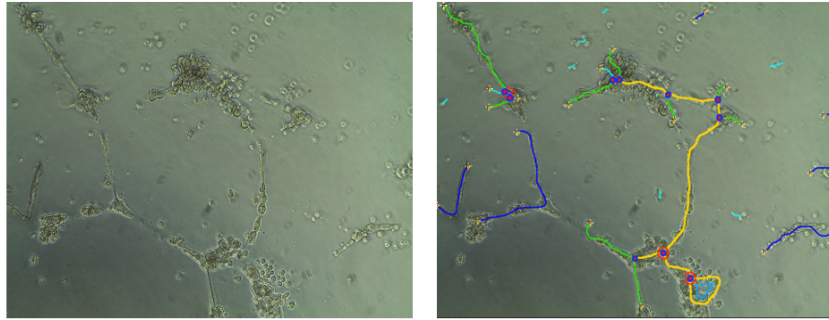
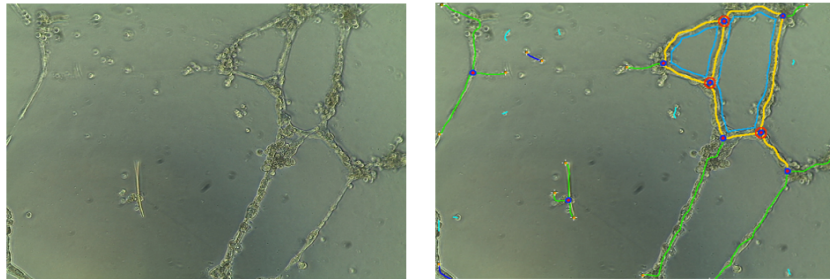


Figura 4.11. Imágenes representativas de ensayos de formación de tubos obtenidas de células microvasculares dérmicas humanas sobre placas opacas previamente revestidas con matrigel, presencia de glucosa 30 mM e incubadas con diferentes concentraciones de TOP 52 . Las imágenes son analizadas por el programa Image J con el plugin *Angiogenesis analyzer* obteniendo imágenes donde se superponen la imagen obtenida por microscopía con los nodos (negro), las ramas (verde), segmentos (azul), segmentos maestros (amarillo), uniones (rojo) y redes/mallas (azul).

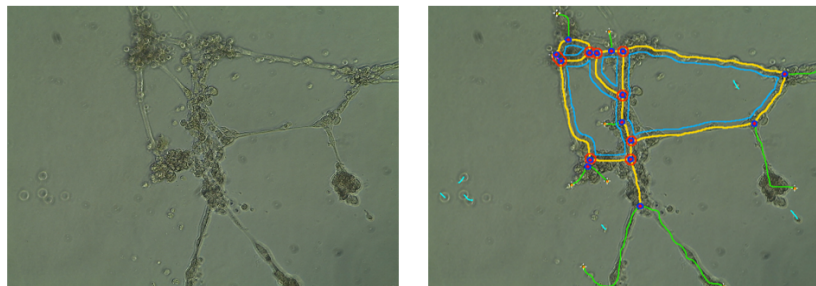
TOP N53 1 μ M + GLUCOSA 30 mM



TOP N53 1 nM + GLUCOSA 30 mM



TOP N53 100 nM + GLUCOSA 30 mM



TOP N53 1 μ M + GLUCOSA 30 mM

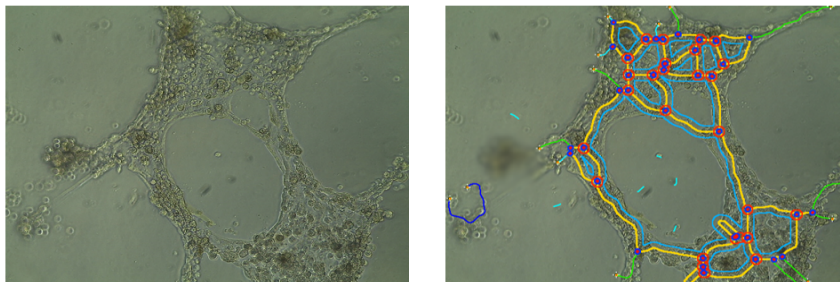
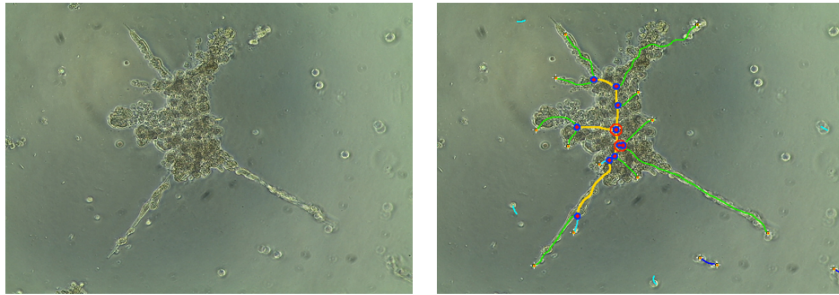
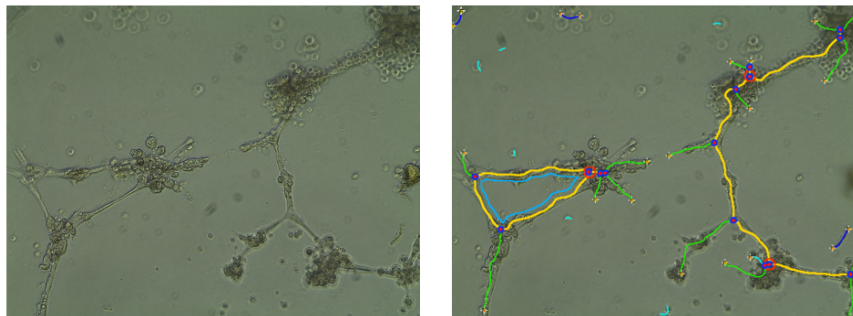


Figura 4.12. Imágenes representativas de ensayos de formación de tubos obtenidas de células microvasculares dérmicas humanas sobre placas opacas previamente revestidas con matrigel, presencia de glucosa 30 mM e incubadas con diferentes concentraciones de TOP N53 . Las imágenes son analizadas por el programa Image J con el plugin *Angiogenesis analyzer* obteniendo imágenes donde se superponen la imagen obtenida por microscopía con los nodos (negro), las ramas (verde), segmentos (azul), segmentos maestros (amarillo), uniones (rojo) y redes/mallas (azul).

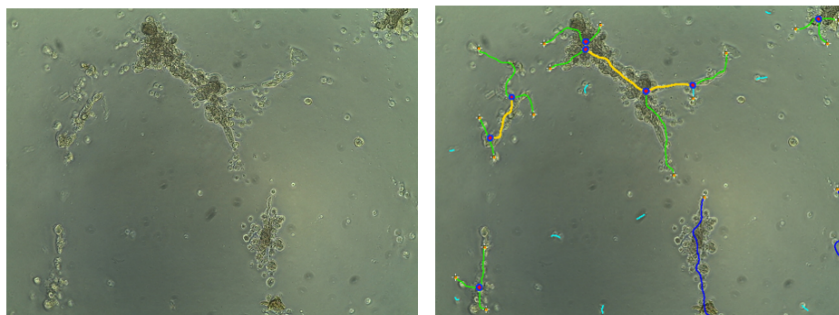
Sildenafil 10 pM + GLUCOSA 30 mM



Sildenafil 1 nM + GLUCOSA 30 mM



Sildenafil 100 nM + GLUCOSA 30 mM



Sildenafil 1 μM + GLUCOSA 30 mM

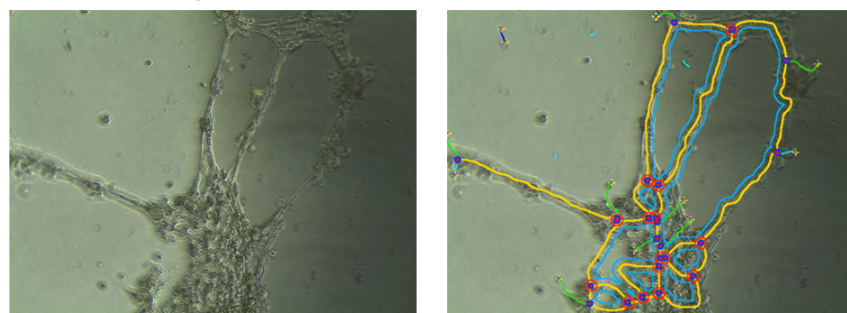


Figura 4.13. Imágenes representativas de ensayos de formación de tubos obtenidas de células microvasculares dérmicas humanas sobre placas opacas previamente revestidas con matrigel, presencia de glucosa 30 mM e incubadas con diferentes concentraciones de sildenafil . Las imágenes son analizadas por el programa Image J con el plugin *Angiogenesis analyzer* obteniendo imágenes donde se superponen la imagen obtenida por microscopía con los nodos (negro), las ramas (verde), segmentos (azul), segmentos maestros (amarillo), uniones (rojo) y redes/mallas (azul).

NPS 1 μ M + GLUCOSA 30 mM

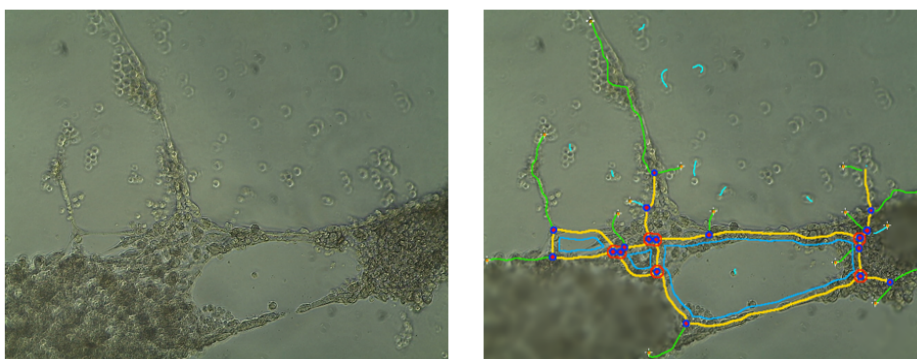


Figura 4.14. Imágenes representativas de ensayos de formación de tubos obtenidas de células microvasculares dérmicas humanas sobre placas opacas previamente revestidas con matrigel, presencia de glucosa 30 mM e incubadas con diferentes concentraciones de nitroprusiato sódico. Las imágenes son analizadas por el programa Image J con el plugin *Angiogenesis analyzer* obteniendo imágenes donde se superponen la imagen obtenida por microscopía con los nodos (negro), las ramas (verde), segmentos (azul), segmentos maestros (amarillo), uniones (rojo) y redes/mallas (azul).

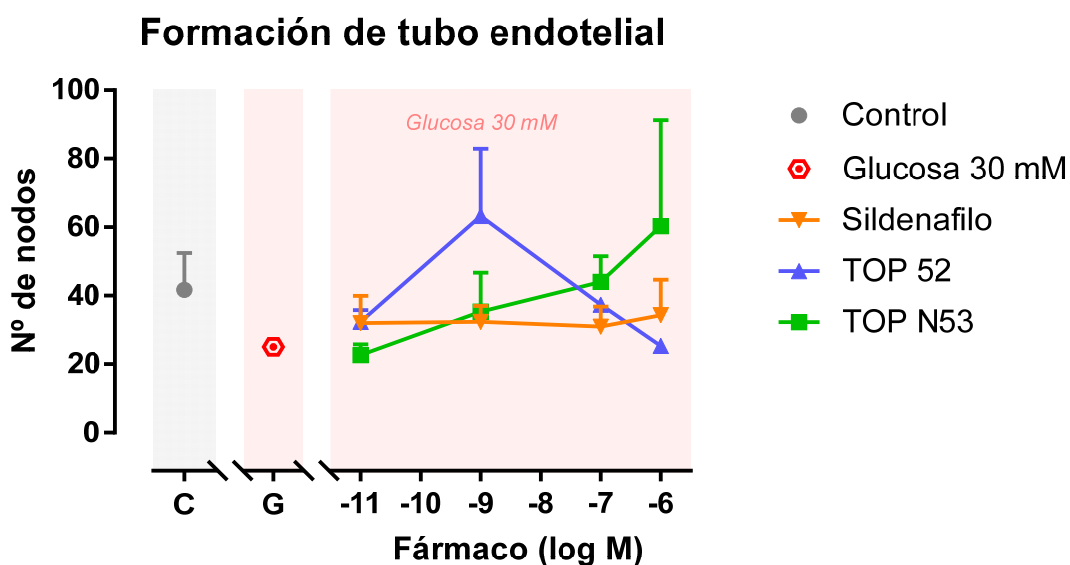


Figura 4.15. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre el número de nodos en el ensayo de formación de tubos en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestos a glucosa alta (30 mM) in vitro. Los tubos endoteliales se determinaron en el ensayo Matrigel. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

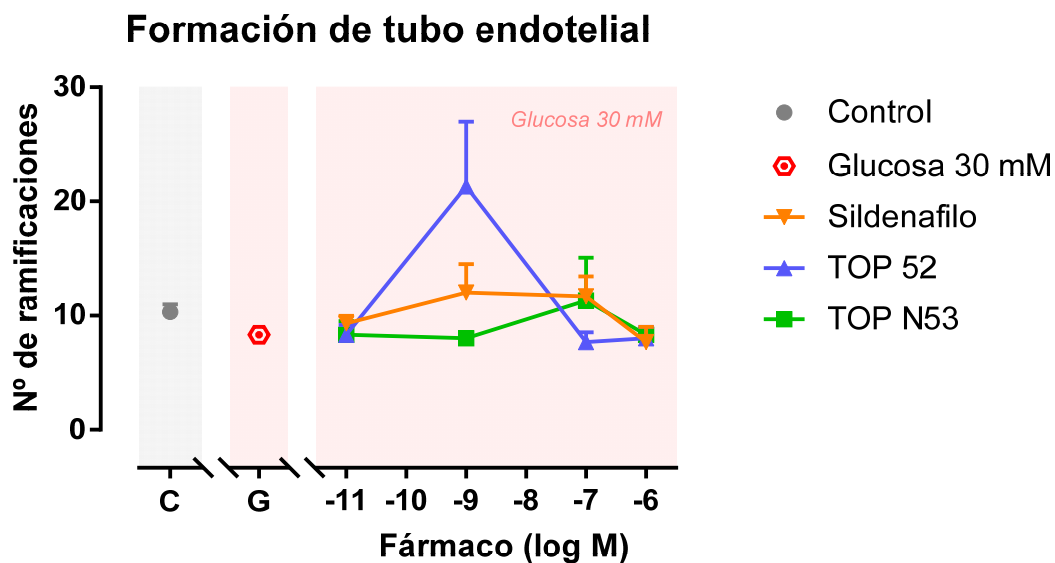


Figura 4.16. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre el número de ramificaciones en el ensayo de formación de tubos en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestos a glucosa alta (30 mM) in vitro. Los tubos endoteliales se determinaron en el ensayo Matrigel. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

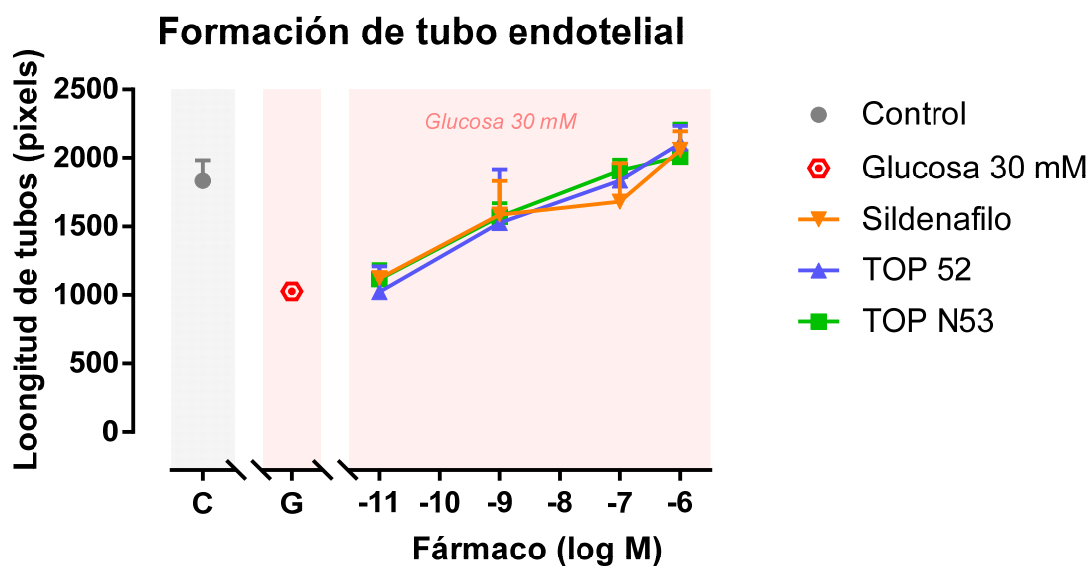


Figura 4.17. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre la longitud de las ramificaciones medidas en pixels en el ensayo de formación de tubos en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestos a glucosa alta (30 mM) in vitro. Los tubos endoteliales se determinaron en el ensayo Matrigel. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

Formación de tubo endotelial

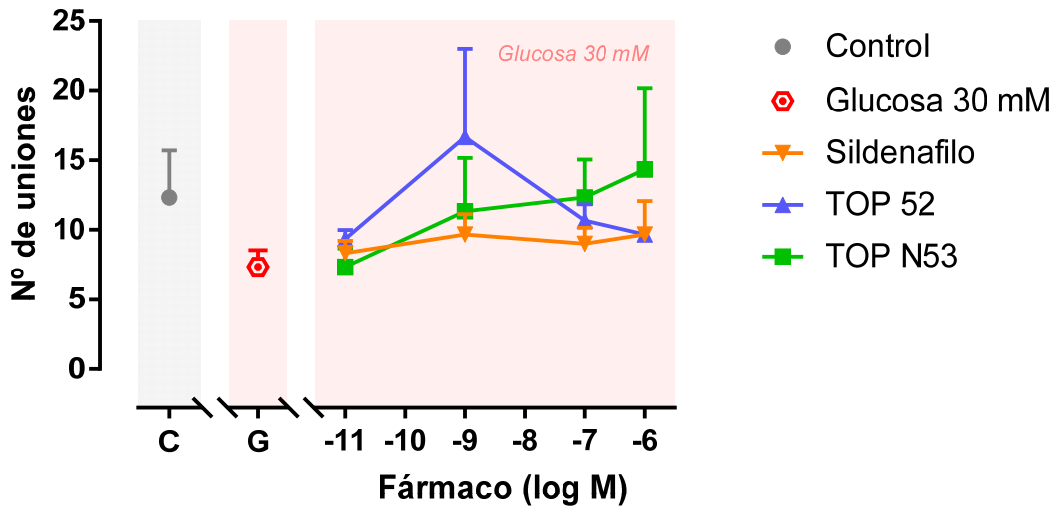


Figura 4.18. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre el número de uniones en el ensayo de formación de tubos en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestos a glucosa alta (30 mM) in vitro. Los tubos endoteliales se determinaron en el ensayo Matrigel. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

Formación de tubo endotelial

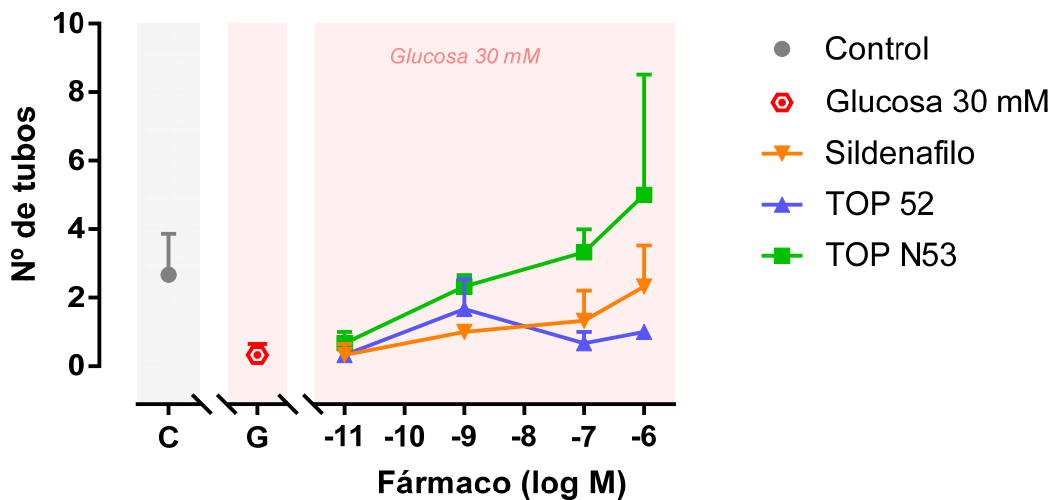
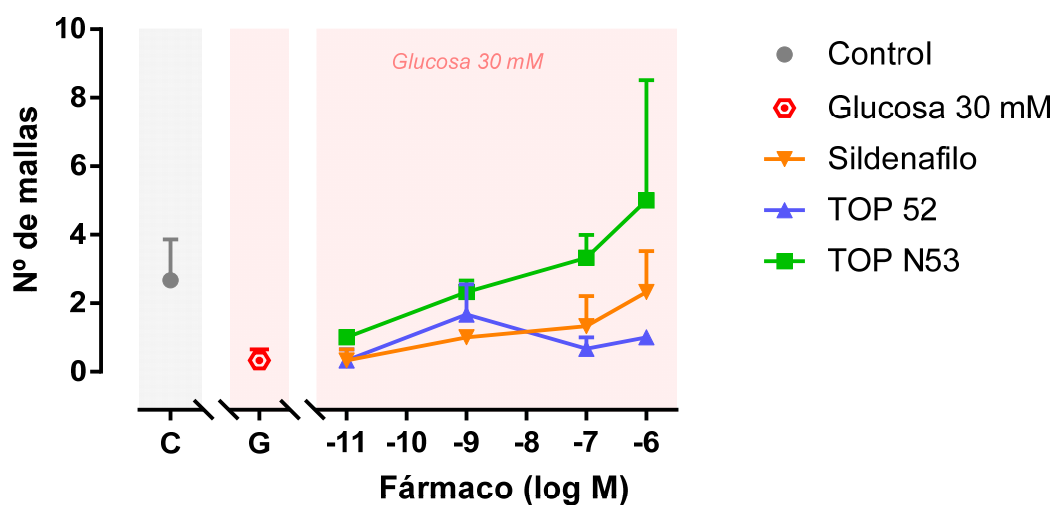


Figura 4.19. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre el número de tubos/segmentos en el ensayo de formación de tubos en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestos a glucosa alta (30 mM) in vitro. Los tubos endoteliales se determinaron en el ensayo Matrigel. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

Formación de tubo endotelial



Formación de tubo endotelial

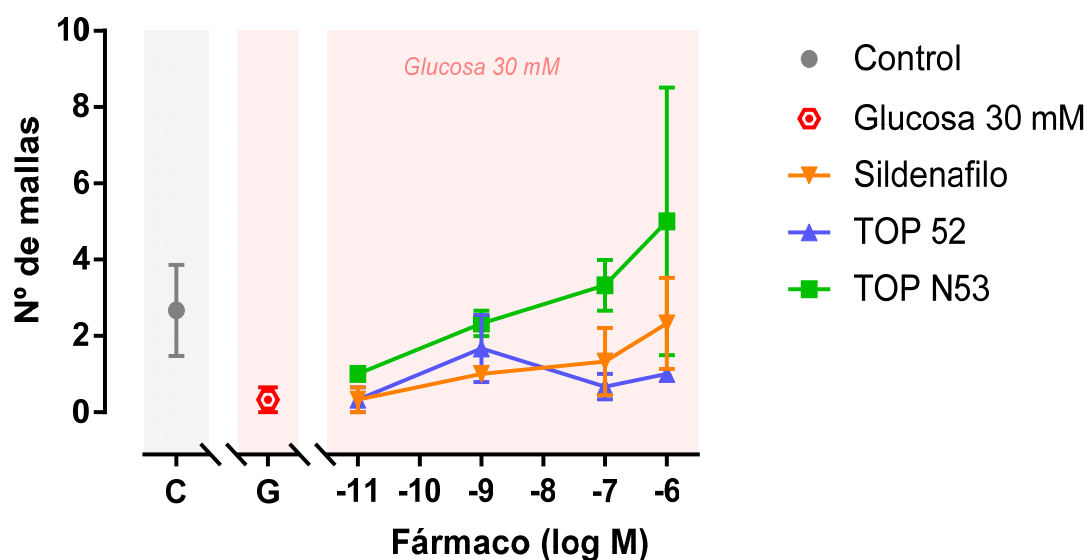


Figura 4.20. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre el número de mallas o redes en el ensayo de formación de tubos en células endoteliales microvasculares humanas obtenidas de diabéticos expuestos a glucosa alta (30 mM) in vitro. Los tubos endoteliales se determinaron en el ensayo Matrigel. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

En conjunto se puede observar que tanto TOP 52, con un efecto mayor a 1 Nm, como TOP N53, de forma concentración dependiente con efectos máximos en 1 μ M, mostraron una tendencia a mejorar la formación de tubos en HDMVEC de pacientes diabéticos en presencia de glucosa alta (30 mM).

4.1.2 Efectos de TOP N53, TOP 52 y fármacos de referencia sobre mecanismos de disfunción endotelial

4.1.2.1 Expresión de componentes del eje NO-sGC-GMPc: GTPCH I, DDAH II, PDE5 y eNOS.

4.1.2.1.1 RT-PCR: Análisis de la expresión génica.

Los experimentos de expresión génica se iniciaron con la realización de experimentos en grupos con tres periodos de incubación distintos de 6, 12 y 24 horas. Para ello, se realizaron tres experimentos independientes en células procedentes de un único donante sano y de un único donante diabético. Los resultados muestran que 6 horas fue el periodo ideal de incubación para analizar tanto las modificaciones inducidas por la incubación de glucosa 30 mM como los efectos de los fármacos.

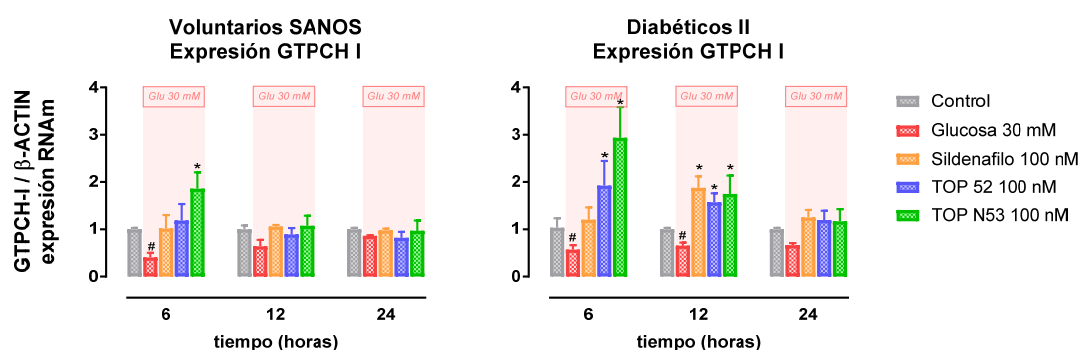


Figura 4.21. Estudio de la expresión (ARNm) de GTPCH1 en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas procedentes de voluntarios sanos y de pacientes diabéticos. La figura muestra las modificaciones en la expresión génica inducidas por la incubación con glucosa alta (30 mM) y el efecto de los fármacos TOP N53, TOP 52 y sildenafil (todos a 100 nM) sobre células expuestas a altas glucosa (30 mM). Las células se incubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Los experimentos se llevaron a cabo en tres grupos con incubaciones de 6, 12 y 24 horas, las células se rasparon en tampón de lisis de ARN y el ARN se aisló usando Trizol, se transcribió de forma inversa en ADNc y se cuantificó el ARNm específico mediante PCR TaqMan en tiempo real. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres experimentos independientes de un donante.

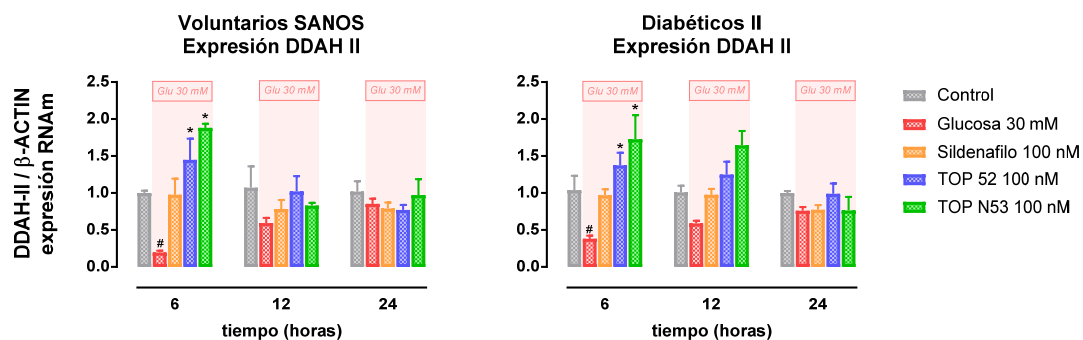


Figura 4.22. Estudio de la expresión (ARNm) de DDAH-II en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas procedentes de voluntarios sanos y de pacientes diabéticos. La figura muestra las modificaciones en la expresión genética inducidas por la incubación con glucosa alta (30 mM) y el efecto de los fármacos TOP N53, TOP 52 y sildenafil (todos a 100 nM) sobre células expuestas a altas glucosa (30 mM). Las células se incubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Los experimentos se llevaron a cabo en tres grupos con incubaciones de 6, 12 y 24 horas, las células se rasparon en tampón de lisis de ARN y el ARN se aisló usando Trizol, se transcribió de forma inversa en ADNc y se cuantificó el ARNm específico mediante PCR TaqMan en tiempo real. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres experimentos independientes de un donante.

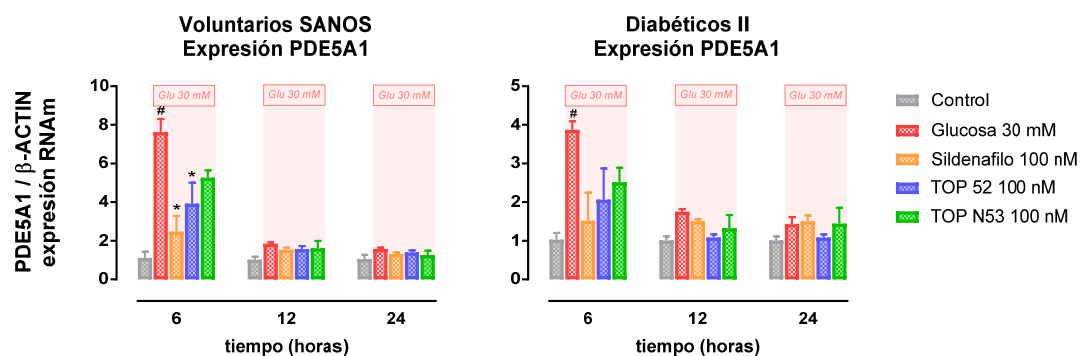


Figura 4.23. Estudio de la expresión (ARNm) de PDE5A1 en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas procedentes de voluntarios sanos y de pacientes diabéticos. La figura muestra las modificaciones en la expresión genética inducidas por la incubación con glucosa alta (30 mM) y el efecto de los fármacos TOP N53, TOP 52 y sildenafil (todos a 100 nM) sobre células expuestas a altas glucosa (30 mM). Las células se incubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Los experimentos se llevaron a cabo en tres grupos con incubaciones de 6, 12 y 24 horas, las células se rasparon en tampón de lisis de ARN y el ARN se aisló usando Trizol, se transcribió de forma inversa en ADNc y se cuantificó el ARNm específico mediante PCR TaqMan en tiempo real. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres experimentos independientes de un donante.

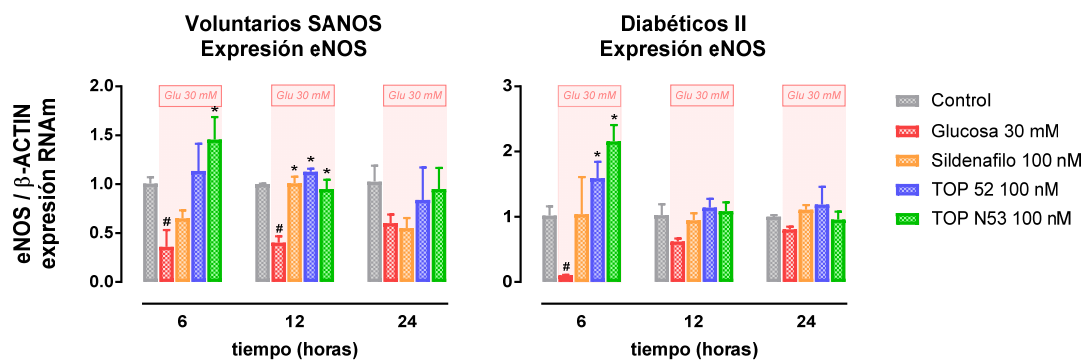


Figura 4.24. Estudio de la expresión (ARNm) de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas procedentes de voluntarios sanos y de pacientes diabéticos. La figura muestra las modificaciones en la expresión genética inducidas por la incubación con glucosa alta (30 mM) y el efecto de los fármacos TOP N53, TOP 52 y sildenafil (todos a 100 nM) sobre células expuestas a altas glucosa (30 mM). Las células se incubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Los experimentos se llevaron a cabo en tres grupos con incubaciones de 6, 12 y 24 horas, las células se rasparon en tampón de lisis de ARN y el ARN se aisló usando Trizol, se transcribió de forma inversa en ADNc y se cuantificó el ARNm específico mediante PCR TaqMan en tiempo real. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres experimentos independientes de un donante.

Por ese motivo, se completaron los estudios con incubación de 6 horas con un total de tres experimentos independientes de tres donantes de donantes sanos y diabéticos.

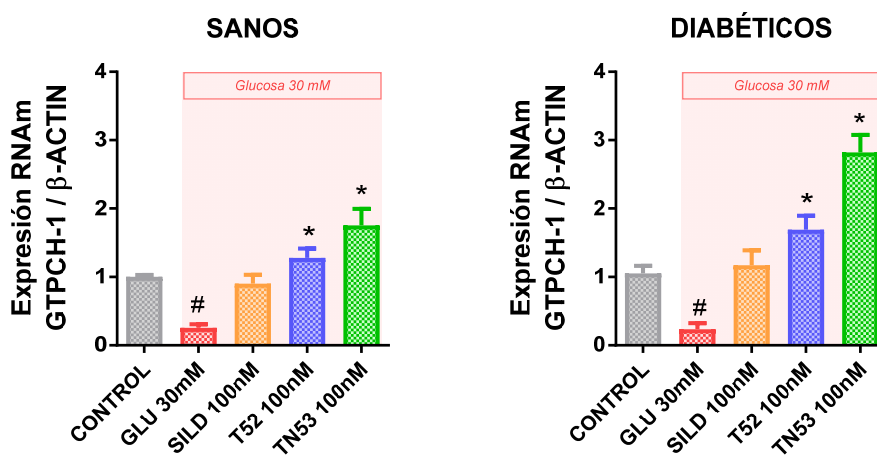


Figura 4.25. Estudio de la expresión (ARNm) de GTPCH1 en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas procedentes de voluntarios sanos y de pacientes diabéticos. La figura muestra las modificaciones en la expresión genética inducidas por la incubación con glucosa alta (30 mM) y el efecto de los fármacos TOP N53 (TN53), TOP 52 (T52) y sildenafil (SILD), todos empleados en una concentración de 100 nM, sobre células expuestas a alta glucosa (30 mM). Las células se incubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Después de 6 horas, las células se rasparon en tampón de lisis de ARN y el ARN se aisló usando Trizol, se transcribió de forma inversa en ADNc y se cuantificó el ARNm específico mediante PCR TaqMan en tiempo real. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante. # $p < 0.05$ respecto a control. * $p < 0.05$ respecto a glucosa 30 mM.

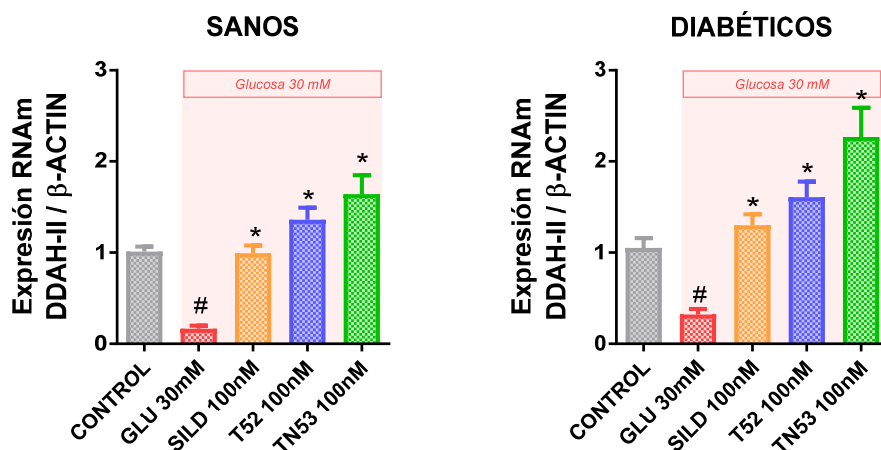


Figura 4.26. Estudio de la expresión (ARNm) de DDAH-II en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas procedentes de voluntarios sanos y de pacientes diabéticos. La figura muestra las modificaciones en la expresión genética inducidas por la incubación con glucosa alta (30 mM) y el efecto de los fármacos TOP N53 (TN53), TOP 52 (T52) y sildenafil (SILD), todos empleados en una concentración de 100 nM, sobre células expuestas a alta glucosa (30 mM). Las células se incubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Después de 6 horas, las células se rasparon en tampón de lisis de ARN y el ARN se aisló usando Trizol, se transcribió de forma inversa en ADNc y se cuantificó el ARNm específico mediante PCR TaqMan en tiempo real. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante. # $p < 0.05$ respecto a control. * $p < 0.05$ respecto a glucosa 30 mM.

La glucosa 30 mM durante 6 horas redujo la expresión de GTPCHI, DDAHII y eNOS. La incubación con TOP N53, pero también con los inhibidores de la PDE5 TOP 52 y sildenafil (todos a 100 nM) restauró completamente los niveles de expresión de estas enzimas. TOP N53 pareció más eficaz que TOP 52 y sildenafil a este respecto y aumentó los niveles de expresión de estas enzimas por encima de la línea de base.

La glucosa alta aumentó la expresión de PDE5A1 de forma más marcada en células de donantes sanos que de diabéticos. Este incremento se moderaba en presencia de los fármacos empleados que en el caso de las células de pacientes diabéticos volvieron a niveles de expresión del grupo control no expuesto a glucosa alta.

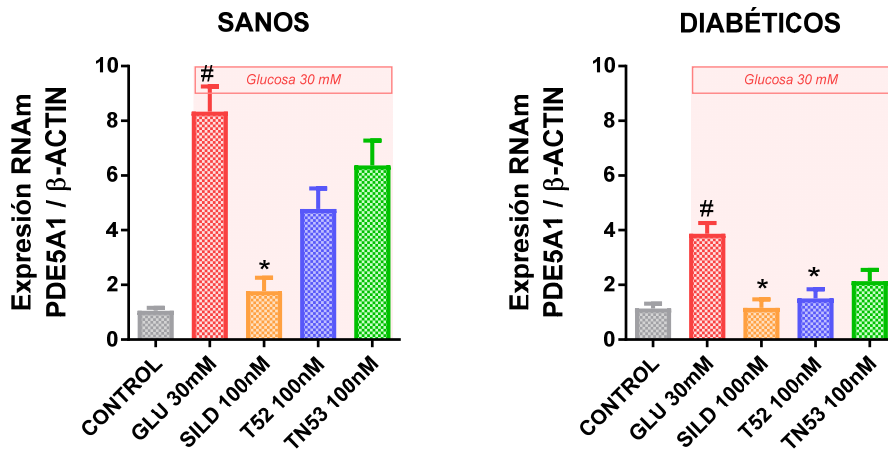


Figura 4.27. Estudio de la expresión (ARNm) de PDE5A1 en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas procedentes de voluntarios sanos y de pacientes diabéticos. La figura muestra las modificaciones en la expresión genética inducidas por la incubación con glucosa alta (30 mM) y el efecto de los fármacos TOP N53 (TN53), TOP 52 (T52) y sildenafil (SILD), todos empleados en una concentración de 100 nM, sobre células expuestas a alta glucosa (30 mM). Las células se incubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Después de 6 horas, las células se rasparon en tampón de lisis de ARN y el ARN se aisló usando Trizol, se transcribió de forma inversa en ADNc y se cuantificó el ARNm específico mediante PCR TaqMan en tiempo real. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante. # $p < 0.05$ respecto a control. * $p < 0.05$ respecto a glucosa 30 mM.

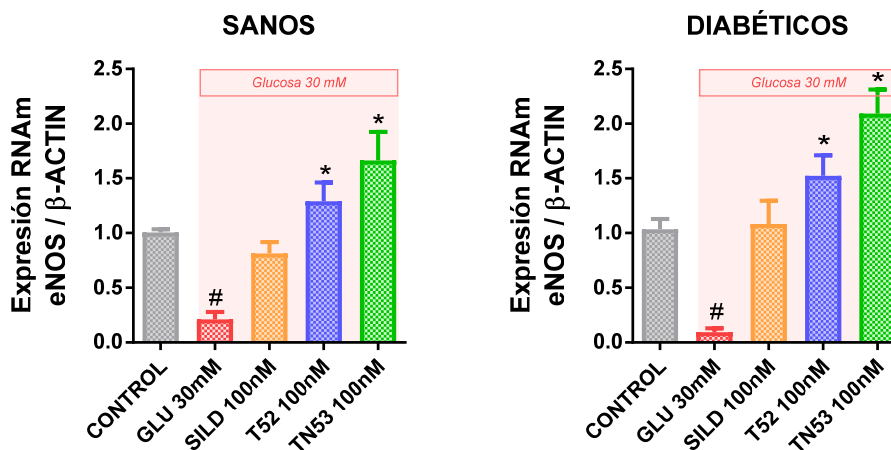


Figura 4.28. Estudio de la expresión (ARNm) de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas procedentes de voluntarios sanos y de pacientes diabéticos. La figura muestra las modificaciones en la expresión genética inducidas por la incubación con glucosa alta (30 mM) y el efecto de los fármacos TOP N53 (TN53), TOP 52 (T52) y sildenafil, todos empleados en una concentración de 100 nM, sobre células expuestas a alta glucosa (30 mM). Las células se incubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Después de 6 horas, las células se rasparon en tampón de lisis de ARN y el ARN se aisló usando Trizol, se transcribió de forma inversa en ADNc y se cuantificó el ARNm específico mediante PCR TaqMan en tiempo real. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante. # $p < 0.05$ respecto a control. * $p < 0.05$ respecto a glucosa 30 mM.

4.1.2.1.1.1 4.1.2.1.2 Western Blot: Análisis de la expresión proteica

El estudio de western blot mostró resultados coherentes con los expuestos en el apartado de expresión génica.

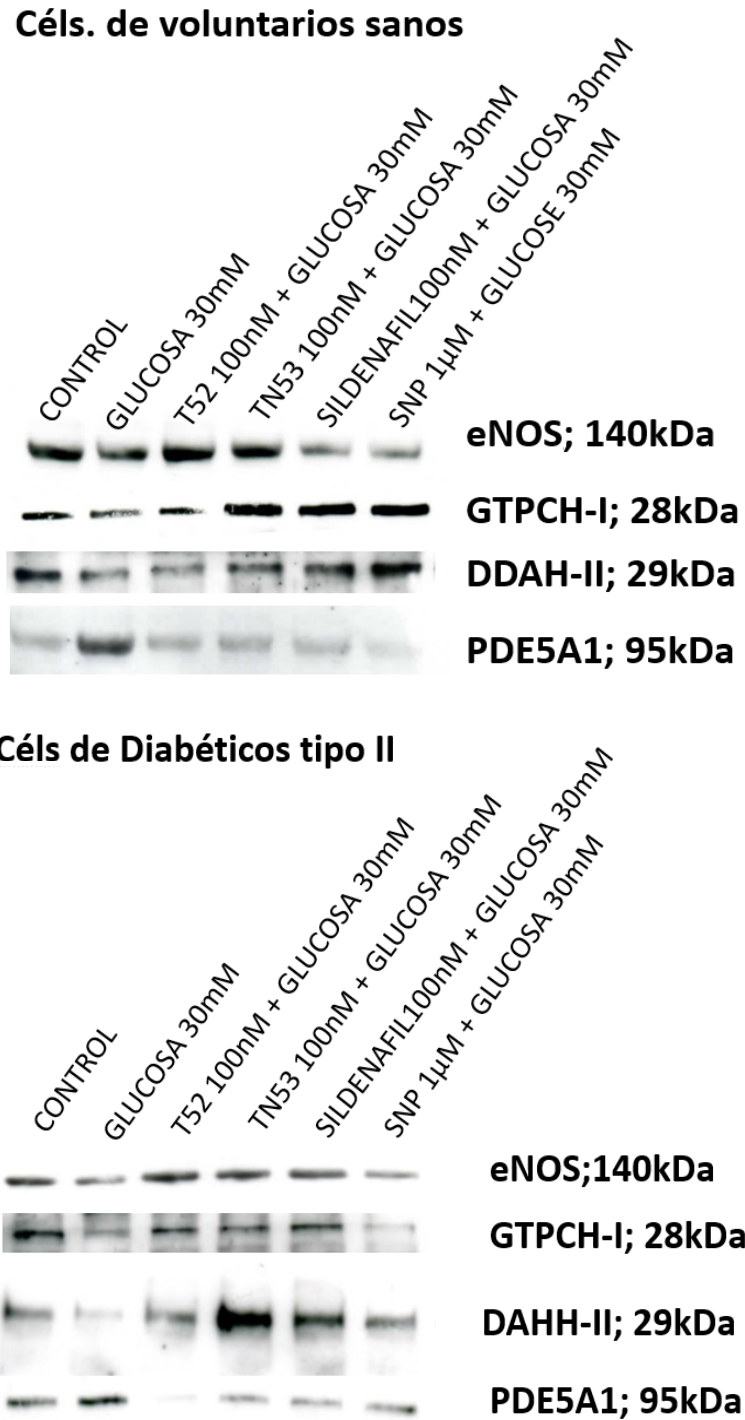


Figura 4.29. Western blot de la expresión de las proteínas del eje NO-sGC-GMPc: GTPCH I, DDAH II, PDE5 y Enos, en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas diabética

4.1.2.2 Medida de BH4

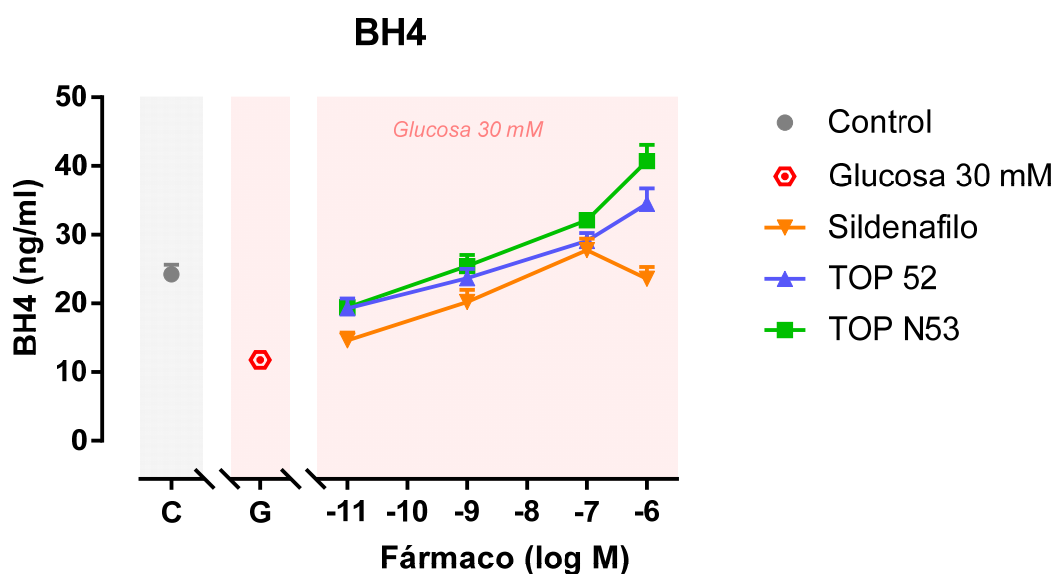


Figura 4.30. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil (todos a 10 pM, 1 nM, 100 nM, 1 μ M) sobre la liberación de BH4 en el sobrenadante del cultivo de células endoteliales microvasculares humanas de diabéticos expuestas a niveles altos de glucosa (30 mM) in vitro. Las células se preincubaron con compuestos de prueba o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Después de un tiempo de incubación de 24 horas, se midió BH4 mediante ELISA. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

La glucosa alta indujo una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la liberación de BH4 que fue revertida de manera dependiente de la concentración por TOP N53, TOP 52 y sildenafil. Específicamente, después de TOP N53 (y en menor medida con TOP 52), BH4 subió por encima de la línea de base. Nitroprusiato sódico también incrementó la liberación de BH4 en presencia de glucosa alta a niveles de $23,8 \pm 2,2$ ng/ml. Todos los fármacos y en todas las concentraciones alcanzaron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a la liberación en presencia de glucosa alta (sin fármacos).

4.1.2.3 Medición de la actividad de la óxido nítrico sintasa dependiente de Ca²⁺

La incubación de las células con glucosa alta (30 mM) reduce la actividad de la NO sintasa, con una disminución en la formación de NO del orden de un 30% de los obtenidos en condiciones normales.

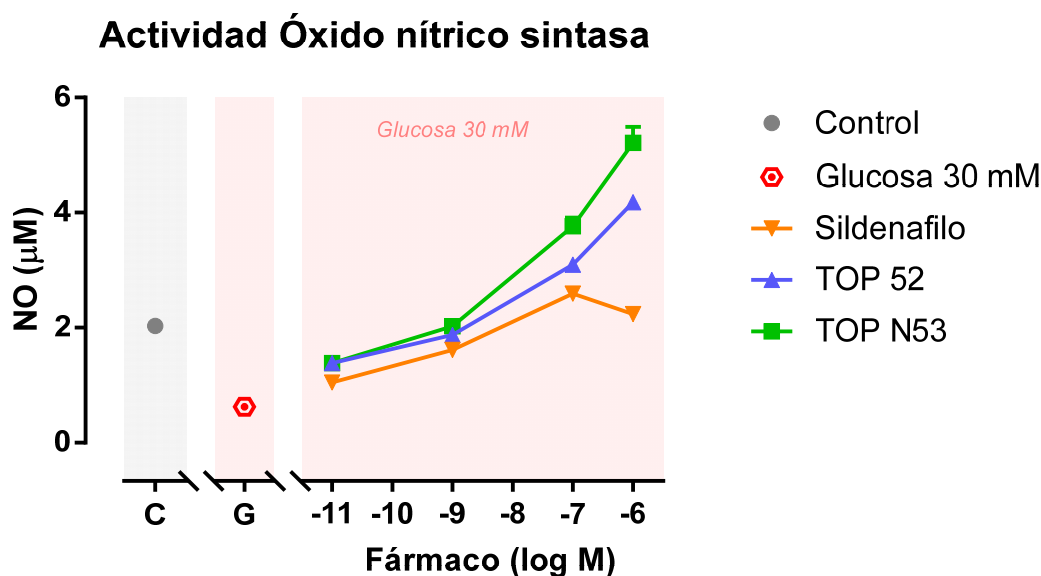


Figura 4.31. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil (todos a 10 pM, 1 nM, 100 nM, 1 μM) sobre actividad de la NOS, medida por la producción de nitritos en lisados de células endoteliales microvasculares humanas de diabéticos expuestos a niveles altos de glucosa (30 mM) in vitro. Las células se incubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Después de un tiempo de incubación de 24 horas, la actividad NOS mediante un ensayo enzimático. Los resultados se muestran como media ± s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

TOP N53, TOP 52 y sildenafil recuperaron la actividad endotelial de la NOS de la importante disminución inducida por glucosa 30 mM (diferencia estadísticamente significativa de los tres compuestos, en todas y cada una de las concentraciones empleadas). Se evidenció una tendencia de que TOP N53 era el compuesto más eficaz a este respecto. Nitroprusiato sódico aumentó también la formación de NO en presencia de glucosa alta de forma significativa, consiguiendo valores de $1,97 \pm 0,06 \mu\text{M}$.

En conjunto, a partir de estos estudios in vitro, se puede postular que TOP N53, y en un grado similar o algo menor los inhibidores de la PDE5 puros, protegerían de una pérdida de NO derivado del endotelio microvascular dérmico causada por niveles altos de glucosa, un sello distintivo de la disfunción endotelial.

Actividad Óxido nítrico sintasa

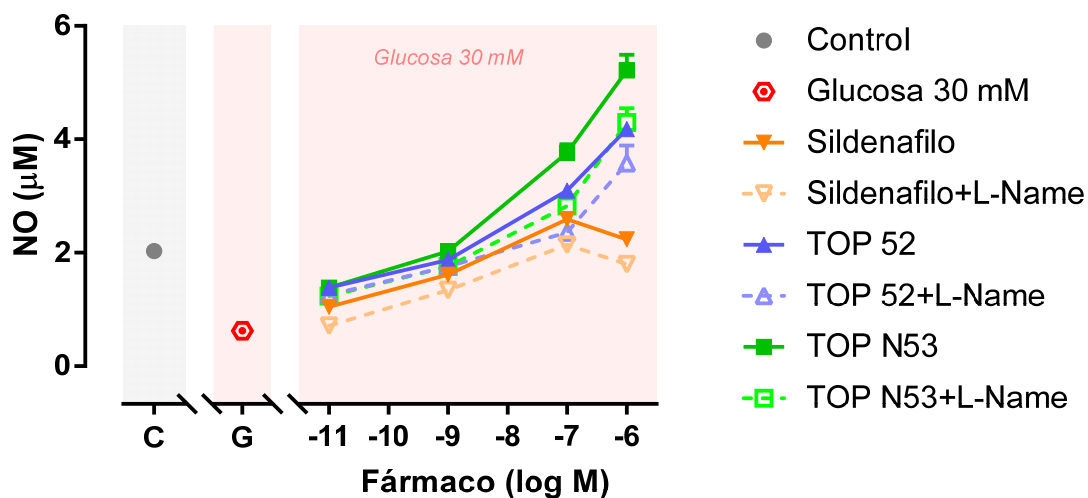


Figura 4.32. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil (todos a 10 pM, 1 nM, 100 nM, 1 μM) solos o en presencia de L-NAME 10 μM, sobre actividad de la NOS, medida por la producción de nitritos en lisados de células endoteliales microvasculares humanas de diabéticos expuestos a niveles altos de glucosa (30 mM) in vitro. Las células se incubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 30 minutos antes de la exposición a glucosa 30 mM. Después de un tiempo de incubación de 24 horas, la actividad NOS mediante un ensayo enzimático. Los resultados se muestran como media ± s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

La presencia de un inhibidor del inhibidor de óxido nítrico sintasa L-NAME redujo la formación de NO, con un desplazamiento de la curva de formación de NO hacia la derecha proporcional a la concentración empleada (10 μM).

4.1.2.4 Medición del contenido de GMPc de las células endoteliales

La glucosa alta durante 60 minutos redujo el contenido de GMPc inicial en aproximadamente un 85%. TOP N53 revirtió esta pérdida en GMPc de forma continuada y concentración-dependiente. TOP N53 fue además más eficaz que el inhibidor de la PDE5, sildenafil. Curiosamente, TOP 52 resultó en un efecto bifásico sobre GMPc con un aumento máximo a 1 nM (Figura adjunta). Cabe destacar que en los experimentos con 60 minutos de incubación se pudo observar que TOP 52 y, sobre todo, TOP N53 aumentaban los niveles de GMPc por encima de los valores obtenidos por células no sometidas a una concentración elevada de glucosa (30 mM).

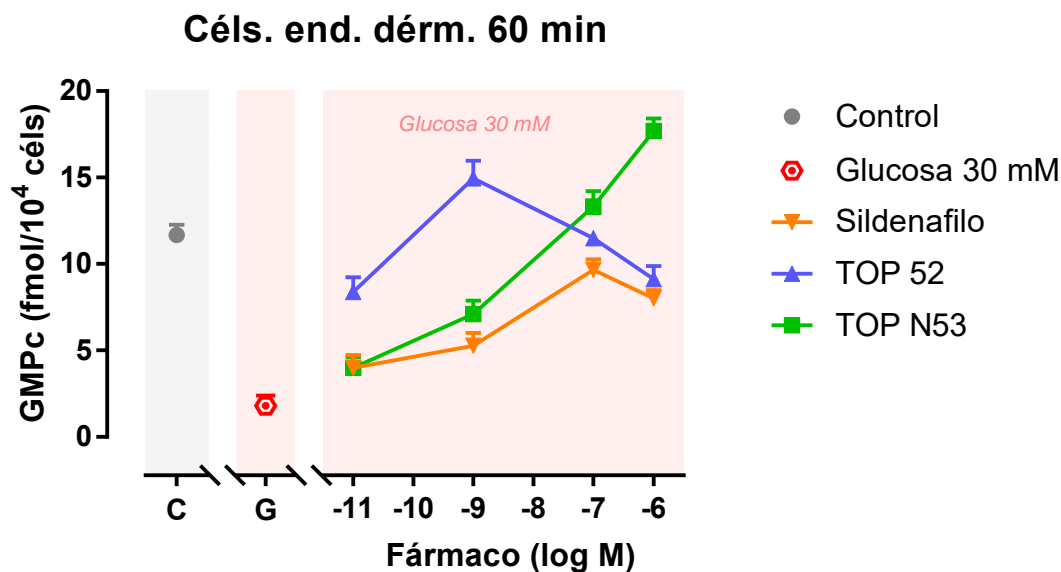


Figura 4.33. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafilo (todos a 10 pM, 1 nM, 100 nM, 1 μ M) sobre el contenido de GMPc intracelular en células endoteliales microvasculares humanas expuestas a glucosa alta (30 mM) in vitro. Las células se preincubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 10 minutos antes de la exposición a glucosa alta (30 mM). Las incubaciones se terminaron después de 60 minutos de tiempo de incubación. El GMPc se evaluó en extractos celulares mediante ELISA disponible comercialmente. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

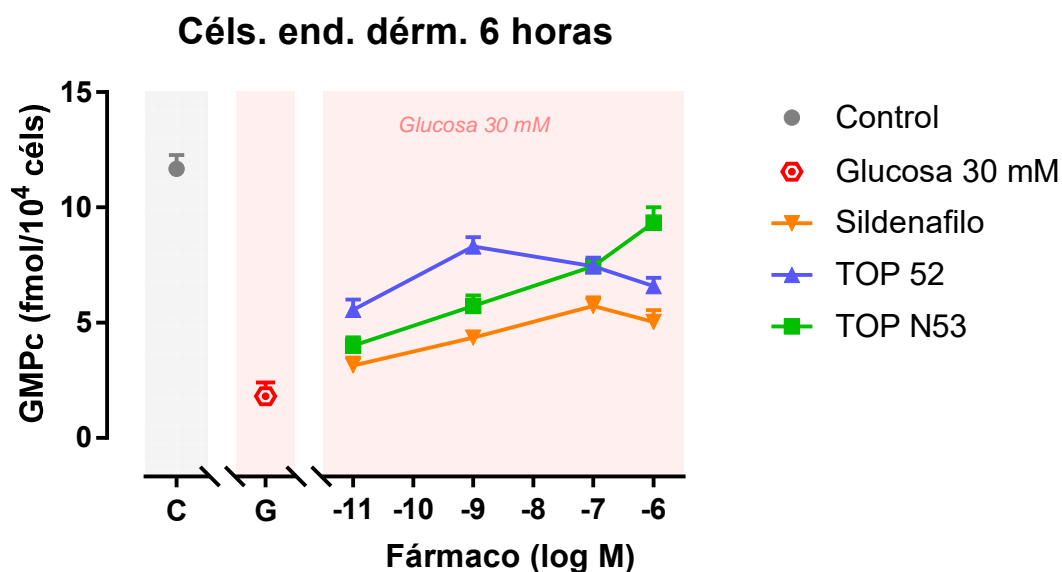


Figura 4.34. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafilo (todos a 10 pM, 1 nM, 100 nM, 1 μ M) sobre el contenido de GMPc intracelular en células endoteliales microvasculares humanas expuestas a glucosa alta (30 mM) in vitro. Las células se preincubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 10 minutos antes de la exposición a glucosa alta (30 mM). Las incubaciones se terminaron después de 6 horas de tiempo de incubación. El GMPc se evaluó en extractos celulares mediante ELISA disponible comercialmente. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

Cuando se procedió a realizar los experimentos con incubaciones de 6 y 24 horas, se observaron efectos cualitativamente similares aunque de menor magnitud, no alcanzando en ningún momento efectos por encima del nivel obtenido en condiciones normales (sin glucosa alta).

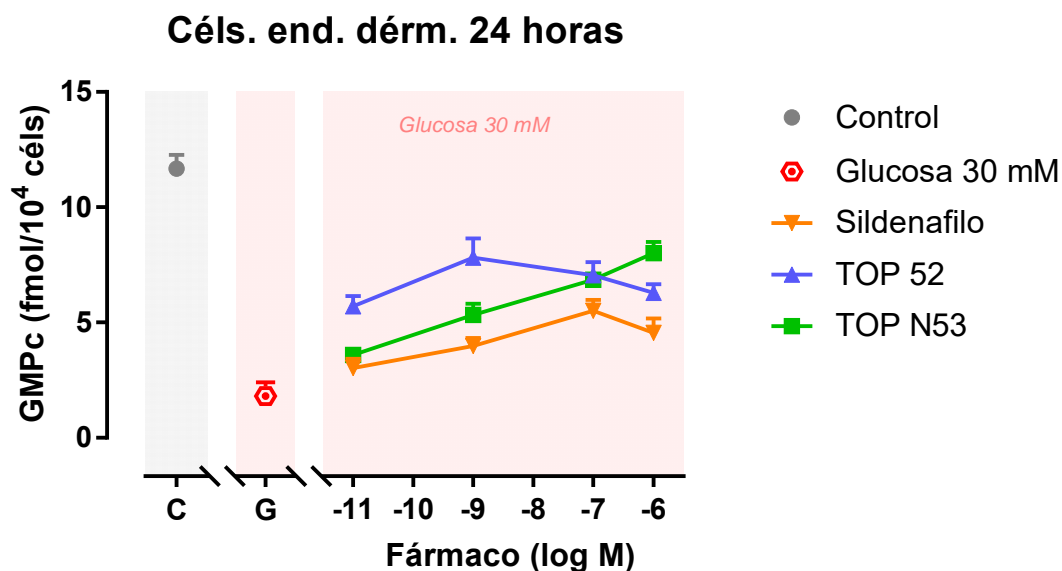


Figura 4.35. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil (todos a 10 pM, 1 nM, 100 nM, 1 μM) sobre el contenido de GMPc intracelular en células endoteliales microvasculares humanas expuestas a glucosa alta (30 mM) in vitro. Las células se preincubaron con fármacos o vehículo (DMSO al 0,1%) durante 10 minutos antes de la exposición a glucosa alta (30 mM). Las incubaciones se terminaron después de 24 horas de tiempo de incubación. El GMPc se evaluó en extractos celulares mediante ELISA disponible comercialmente. Los resultados se muestran como media ± s.e.m. de tres donantes con tres experimentos independientes por donante.

4.1.3 Células progenitoras endoteliales

La formación in vitro de células progenitoras endoteliales (EPC) a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas durante 21 días, aumentó en presencia de TOP N53 y sildenafil. Si bien TOP 52 mostró tendencia a aumentar también la formación de EPC en las concentraciones más altas, este incremento no llegó a ser significativo. Por su parte, la incubación con nitroprusiato sódico (1 μ M) no modificó la formación de EPC respecto a los experimentos control, $45,6 \pm 3,9$ del control versus $52,4 \pm 1,8$ con NPS.

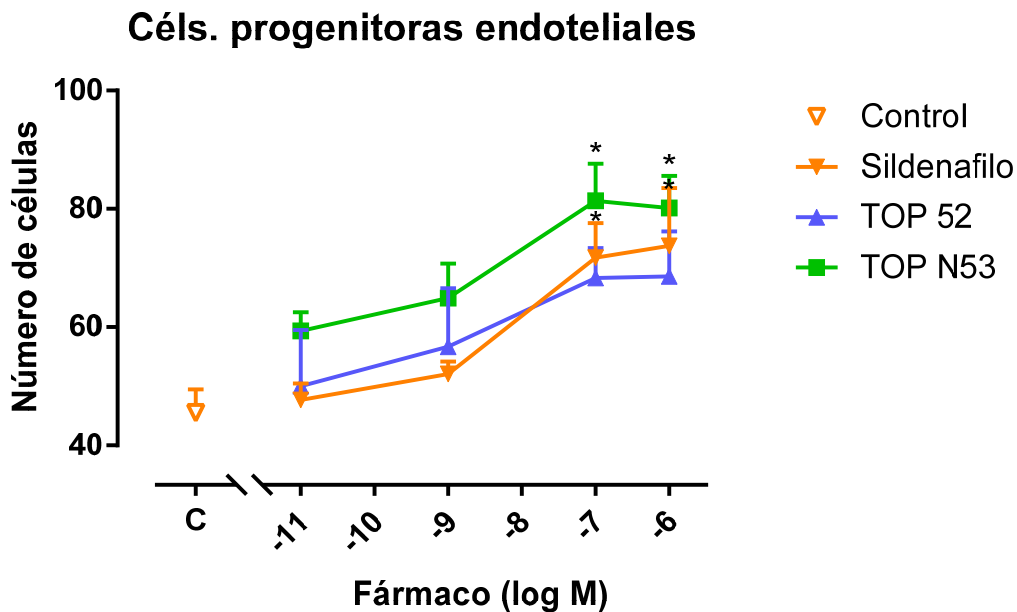


Figura 4.36. Efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil (todos a 10 pM, 1 nM, 100 nM, 1 μ M) sobre el contenido la formación de células endoteliales progenitorias a partir de células mononucleares de sangre periférica. * $p < 0.05$ respecto al control. Los resultados se muestran como media \pm s.e.m. de 5 experimentos independientes en cada caso.

A continuación se muestran imágenes representativas de los experimentos (figuras 4.37 a 4.50.).

Control

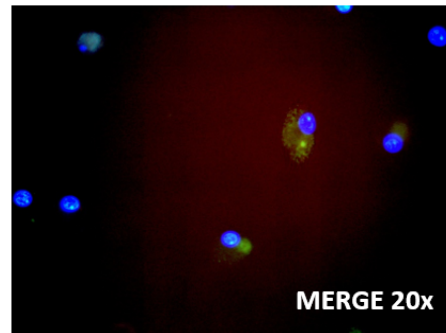
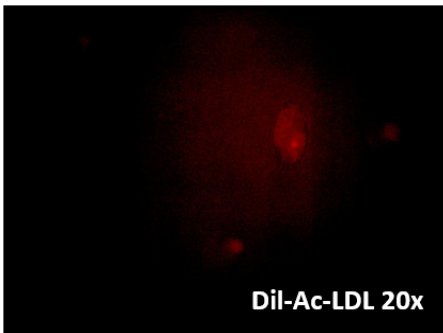
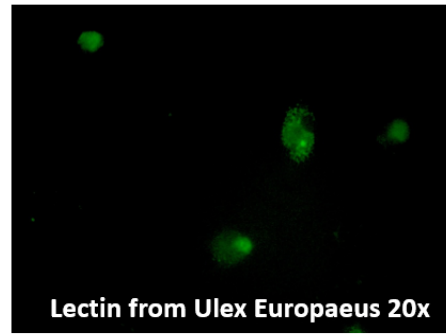
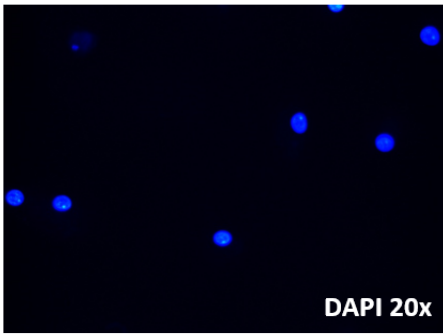


Figura 4.37

NPS 1 μ M

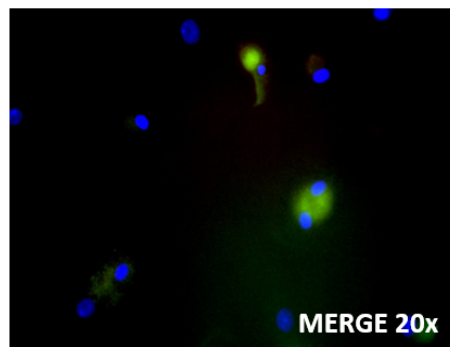
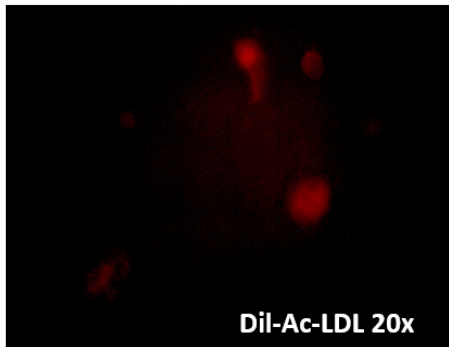
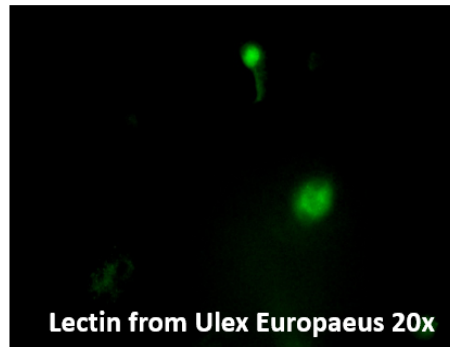
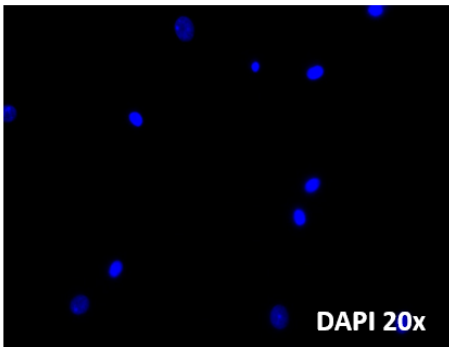


Figura 4.38

TOP 52 10 pM

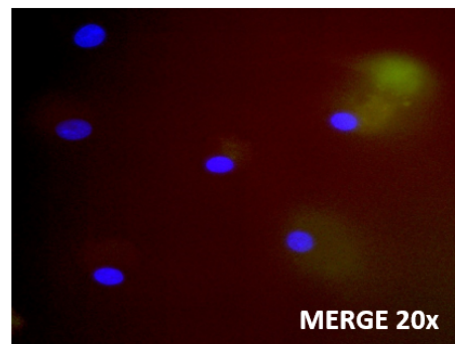
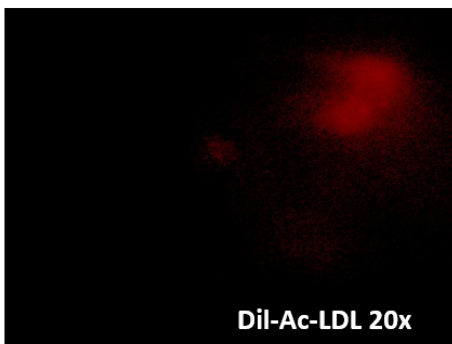
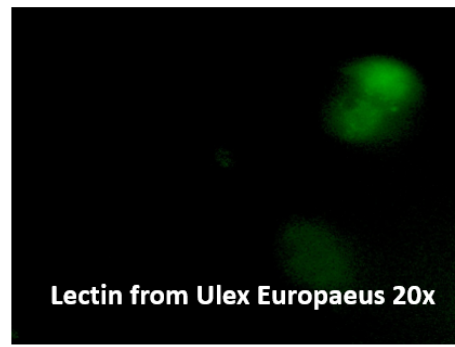
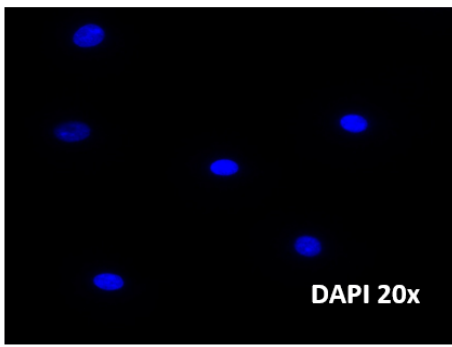


Figura 4.39

TOP 52 1 nM

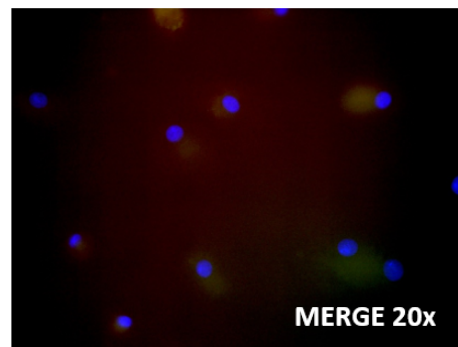
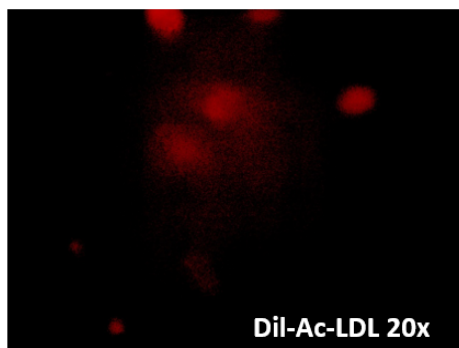
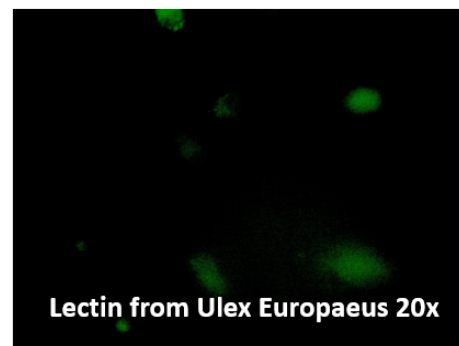
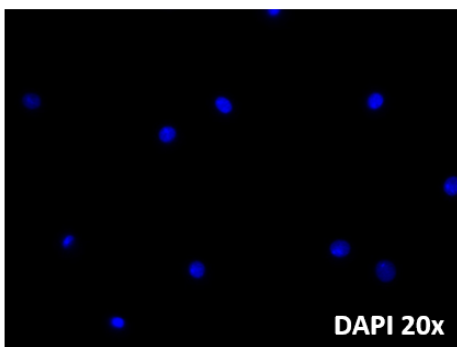


Figura 4.40

TOP 52 100 nM

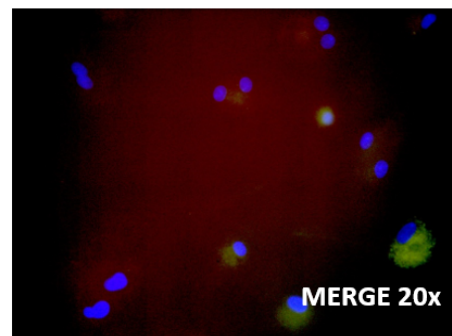
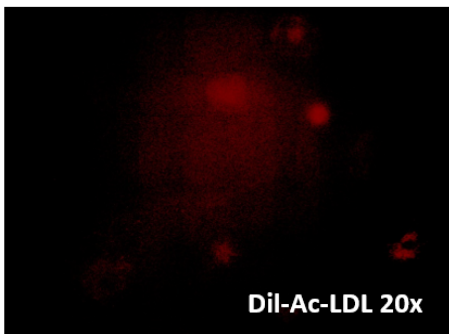
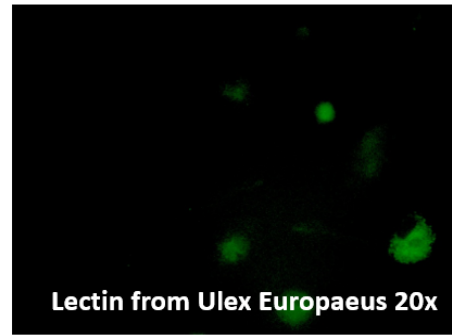
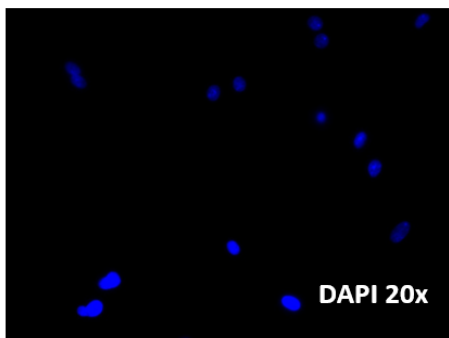


Figura 4.41

TOP 52 1 μ M

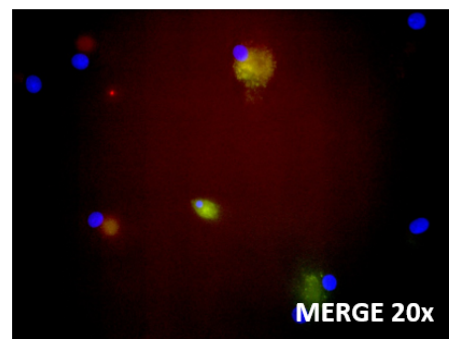
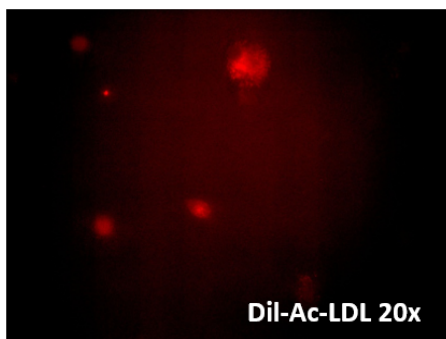
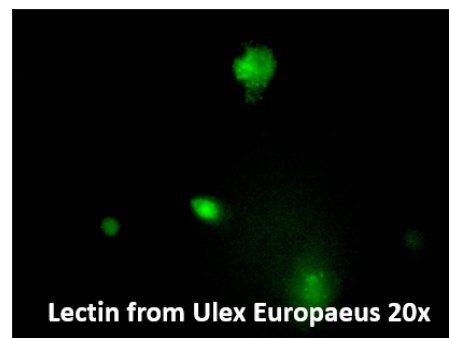
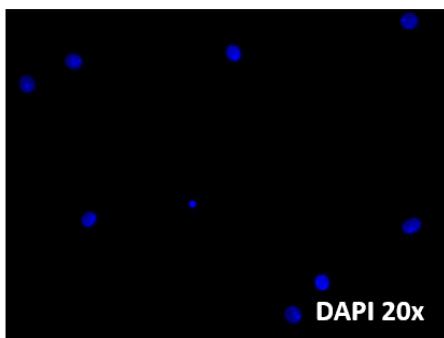


Figura 4.42

TOP N53 10 pM

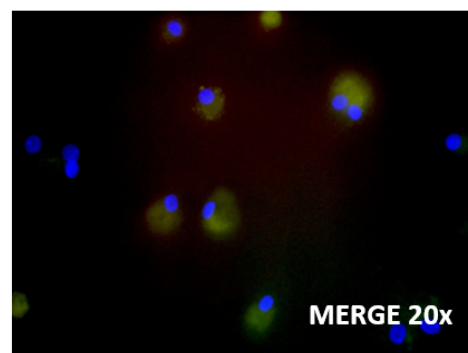
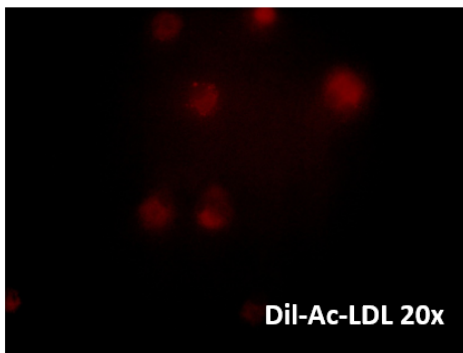
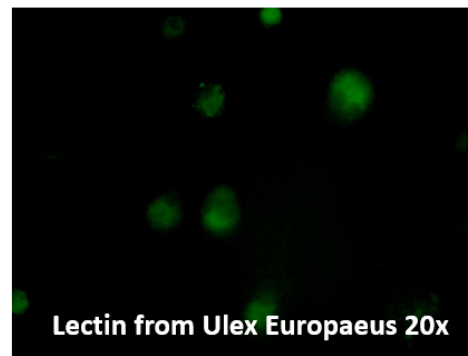
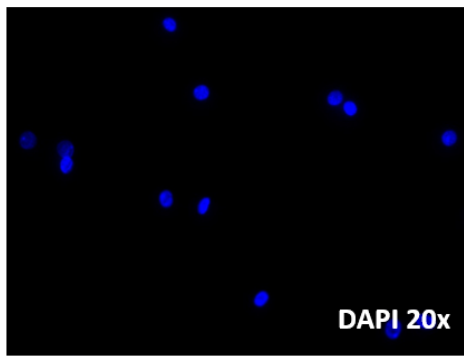


Figura 4.43

TOP N53 1 nM

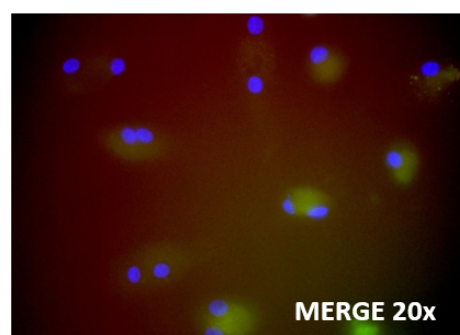
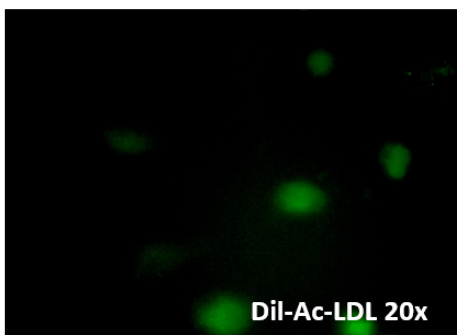
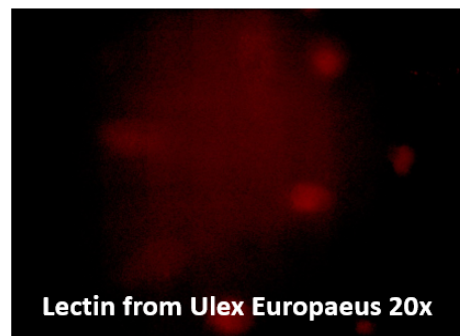
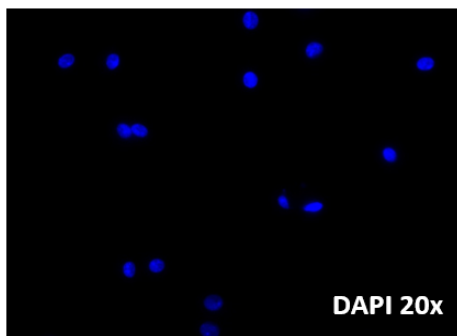


Figura 4.44

TOP N53 100 nM

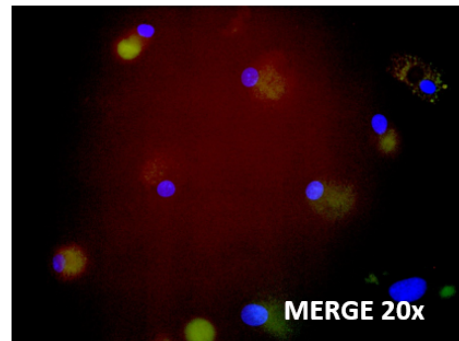
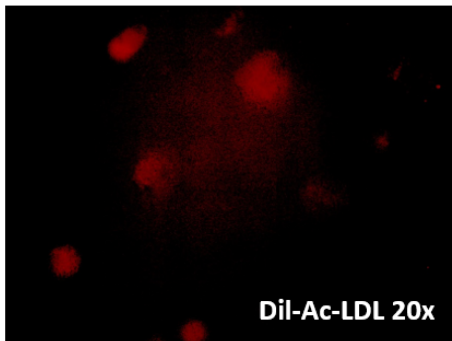
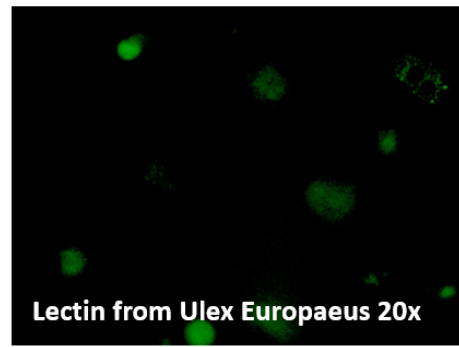
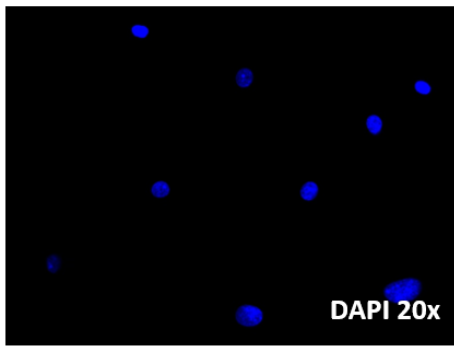


Figura 4.45

TOP N53 1 μ M

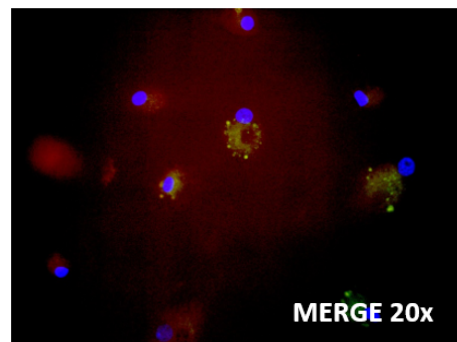
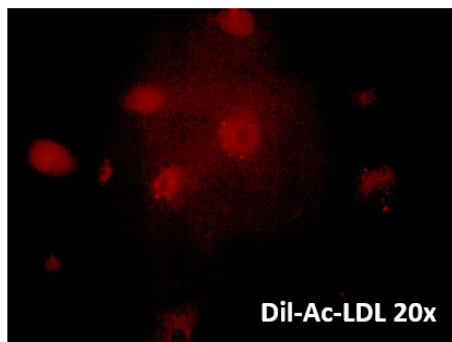
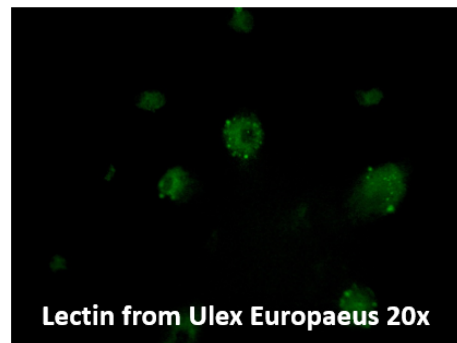
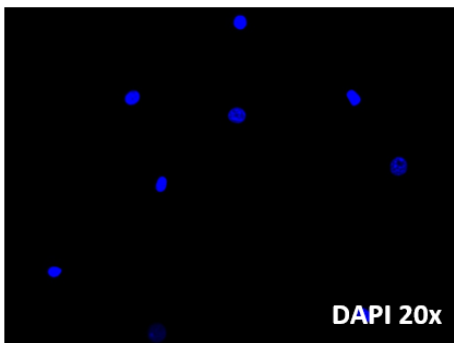


Figura 4.46

Sildenafil 10 pM

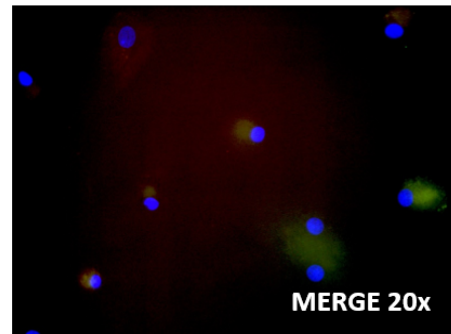
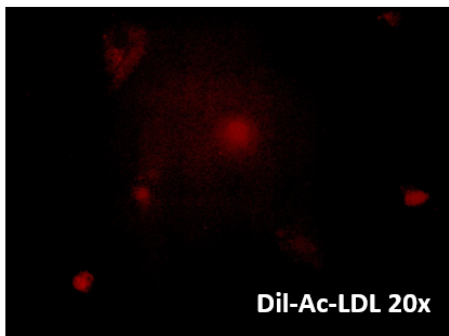
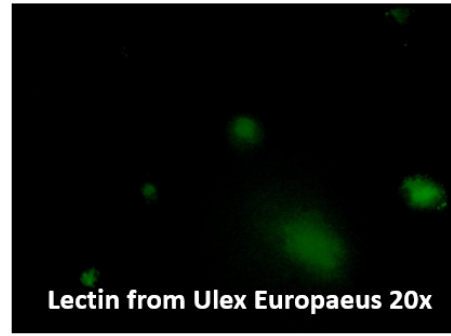
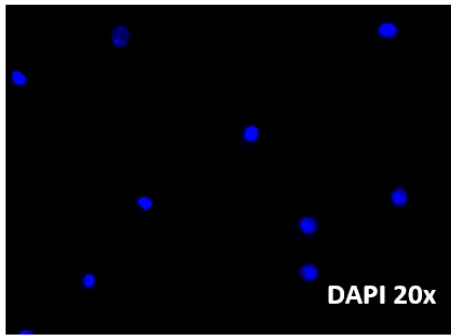


Figura 4.47

Sildenafil 1 nM

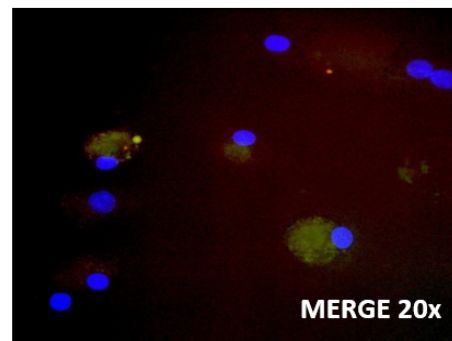
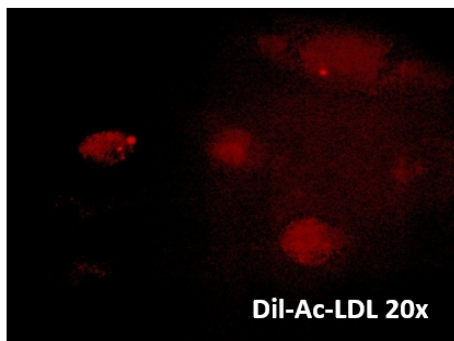
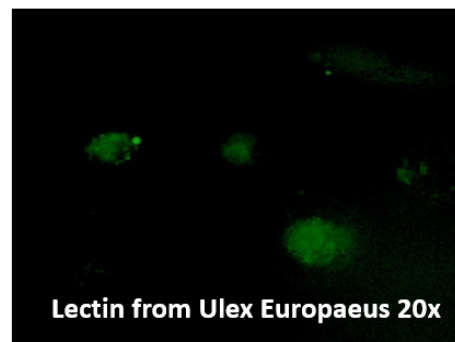
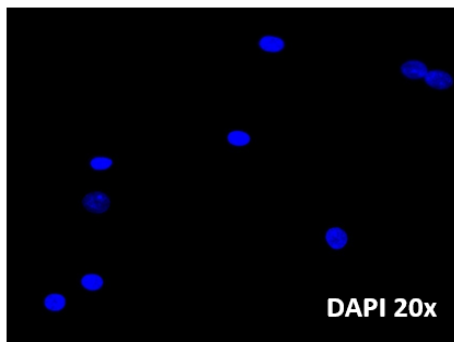


Figura 4.48

Sildenafil 100 nM

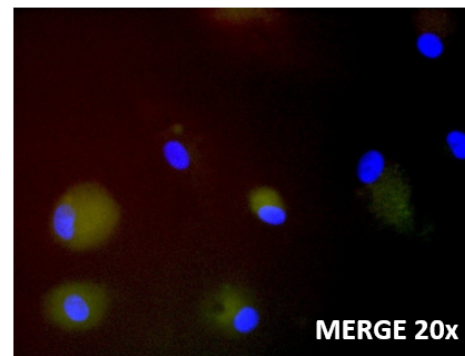
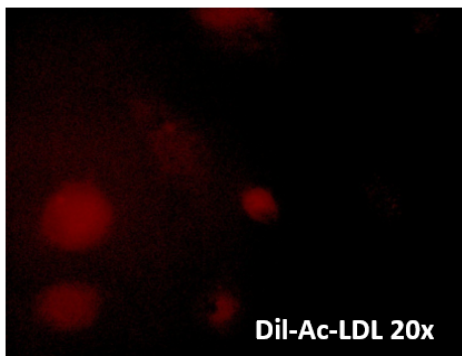
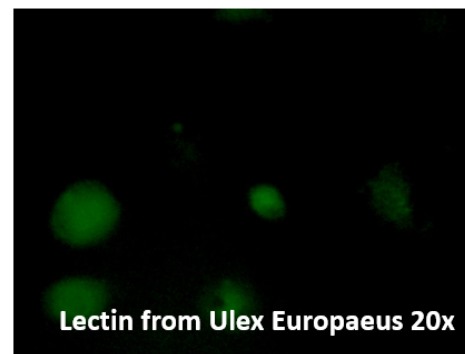
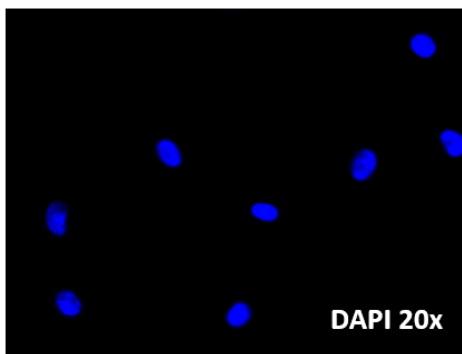


Figura 4.49

Sildenafil 1 μ M

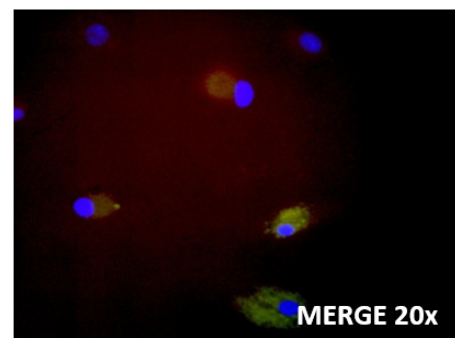
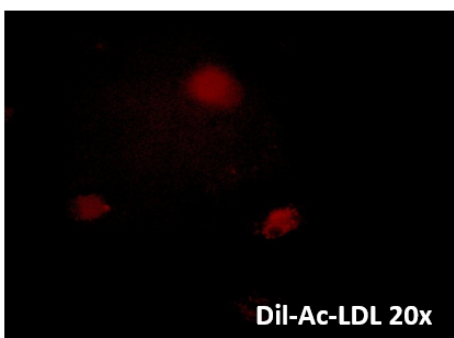
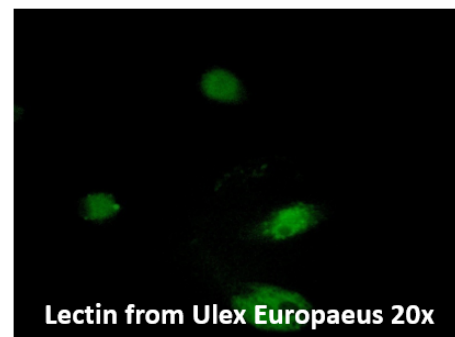
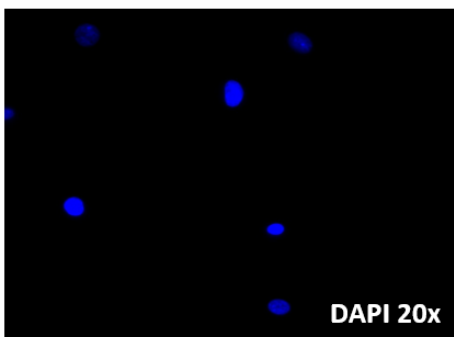


Figura 4.50

4.2 Estudios funcionales de órgano aislado en aorta de rata

4.2.1 Relajación dependiente de la concentración por TOP N53, TOP 52 y sildenafil

4.2.1.1 Anillos de aorta de rata con endotelio intacto

Los fármacos en estudio (TOP N53 y TOP 52) y el fármaco de referencia (sildenafil) indujeron relajaciones concentración dependientes en anillos de aorta de rata aislados con el endotelio intacto y sobre los cuales se ha desencadenado una meseta de contracción con FE (300 nM).

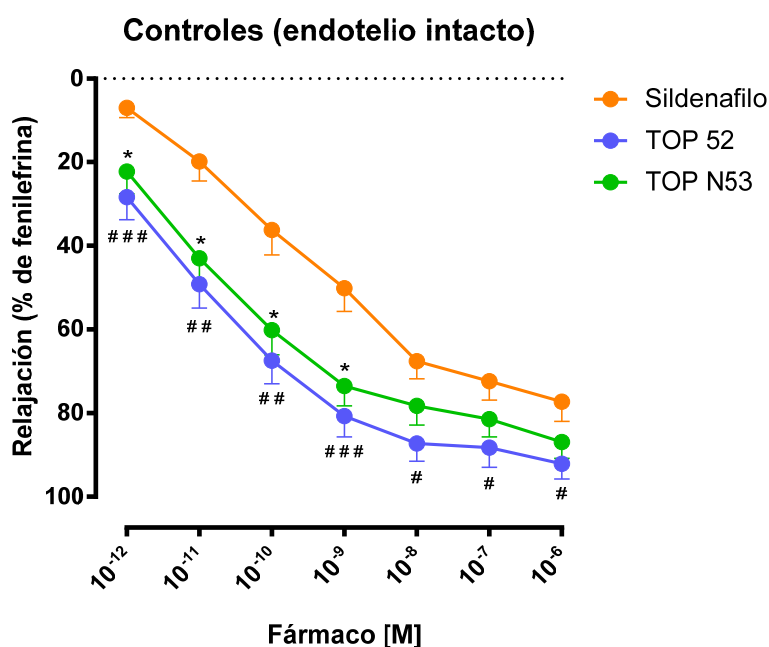


Figura 4.51. Relajación concentración dependiente inducida por TOP N53, TOP 52 y sildenafil en anillos de aorta de rata aislados con el endotelio intacto y sobre los cuales se ha desencadenado una meseta de contracción con FE (300 nM). Los fármacos TOP N53, TOP 52, y sildenafil se adicionan al baño de forma acumulativa alcanzando concentraciones finales de 1 pM (10^{-12} M) hasta 1 μ M (10^{-6} M). Cada vez que se adicionaba fármaco al baño se multiplicaba la concentración final 10 veces y se dejaba actuar durante 30 min. Paralelamente, en un grupo de preparados “control temporal” o “vehículo”, sobre la meseta de contracción inducida con FE, se añadió en cada paso de la curva el mismo volumen de solución con igual concentración de DMSO que en los baños tratados con los fármacos. En todos los baños se midió la tensión contráctil (mg de fuerza), durante 3,5 horas justo antes de añadir la siguiente concentración (cada 30 min). Los resultados se expresan como porcentaje de relajación de la tensión inducida por FE. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de 16 experimentos independientes de sildenafil, 19 de TOP 52 y 20 de TOP N53. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de las pruebas de Dunn. *, # $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$; ***, ### $p < 0,001$. * TOP N53 versus sildenafil, # TOP 52 versus sildenafil.

El efecto relajante concentración dependiente de estos fármacos se observó cuando en un protocolo acumulativo se agregaron cantidades crecientes a los baños de órganos para conseguir concentraciones finales en el baño de órganos de 1 pM a 1 μ M. Los efectos relajantes de TOP N53 en concentraciones comprendidas entre 1 pM y 1 nM fueron mayores que las relajaciones conseguidas por las correspondientes concentraciones de sildenafil, dicha diferencia fue estadísticamente significativa. Por otra parte, TOP 52 fue un poco más efectivo que TOP N53, si bien en este caso las diferencias no alcanzaron la significatividad.

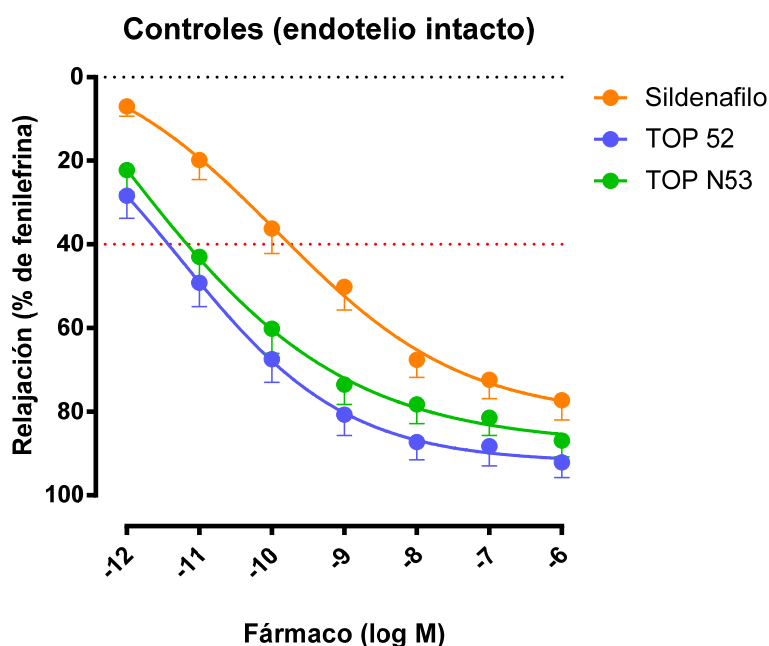


Figura 4.52. Relajación concentración dependiente por TOP N53, TOP 52 y sildenafil de la meseta de contracción inducida por FE (300 nM) en anillos de aorta de rata aislados con endotelio intacto. La figura muestra la regresión no lineal de los datos mostrados en la Figura 4.51. Se ha insertado una línea que muestra un 40% de relajación. Los resultados se muestran como las medias \pm SEM de 16 experimentos independientes de sildenafil, 19 de TOP 52 y 20 de TOP N53.

A partir de la regresión no lineal, TOP N53 indujo una relajación con un efecto máximo (Emax) de la tensión máxima desarrollada por FE 300 nM del 85,1% y se obtuvo un 50% de la relajación máxima (CE50, Concentración eficaz 50%) con 11 pM y una relajación del 40% de la tensión máxima (CI40, concentración inhibitoria 40%) con 8 pM (Fig. 4.52, Tabla 4.2).

En este mismo protocolo con endotelio intacto, la respuesta de relajación con TOP 52 fue solo ligeramente superior a TOP N53 con Emax de 91,9%, CE50 de 7 pM y una CI40 de 4 pM.

Test Fármaco	ENDOTELIO INTACTO								
	Sildenafil			TOP 52			TOP N53		
log M	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n
-12	6,97	2,25	16	28,35	5,33	19	22,19	5,27	20
-11	19,79	4,60	16	49,12	5,65	19	42,96	6,05	20
-10	36,22	5,91	16	67,42	5,45	19	60,15	5,86	20
-9	50,15	5,47	16	80,71	4,91	19	73,53	4,69	20
-8	67,57	4,16	16	87,27	4,19	19	78,21	4,50	20
-7	72,36	4,51	16	88,27	4,69	19	81,42	4,18	20
-6	77,24	4,64	16	92,14	3,61	19	86,87	3,82	20

Tabla 4.1. Relajación concentración dependiente por TOP N53, TOP 52 y sildenafil de la meseta de contracción inducida por FE (300 nM) en anillos de aorta de rata aislados con endotelio intacto. Los datos corresponden a la figura 4.51. Se detallan la media aritmética del porcentaje de relajación de la tensión obtenida con FE, el error estándar de la media y el número de experimentos independientes realizados. Para más detalles consultar la descripción de la figura 4.51.

Fármaco	ENDOTELIO INTACTO			SIN ENDOTELIO			L-NAME			GLUCOSA 25 mM		
	CE 50	CI40	E _{max}	CE 50	CI40	E _{max}	CE 50	CI40	E _{max}	CE 50	CI40	E _{max}
	nM	nM	%	nM	nM	%	nM	nM	%	nM	nM	%
Sildenafil	0,186	0,194	79,3	20,6	>1000	36,4	5,8	95,7	51,4	20,4	863	49,1
TOP 52	0,007	0,004	91,9	5,9	>1000	39,8	0,935	2,98	60,4	2,79	89,3	51
TOP N53	0,011	0,008	85,1	0,218	7,53	48,7	0,267	1,41	62	0,181	0,66	64,2

Tabla 4.2. Relajación concentración dependiente de la meseta de contracción inducida por FE (300 nM) en anillos de aorta de rata aislados con endotelio intacto, anillos sin endotelio, en presencia de L-NAME (100 µM), con glucosa alta (25 mM) producida por sildenafil, TOP 52 y TOP N53. Los datos reflejan la concentración eficaz 50% (CE50), la concentración que induce un 40% de la relajación máxima (CI40) inducida por FE, y el efecto máximo relajador (E_{max}). Los datos se obtuvieron mediante las curvas obtenidas por regresión no lineal, mostradas en las figuras 4.52, 4.54, 4.56 y 4.58, obtenidas mediante el programa GraphPad Prism 7.2

Sildenafil, considerado como inhibidor PDE5 de referencia, originó una relajación de los anillos aórticos de rata contraídos con FE con un E_{max} al 79%, una CE50 de 186 pM y una CI40 de 194 pM.

En estas condiciones experimentales con endotelio intacto, TOP N53 y TOP 52 superaron el efecto de sildenafil. Así la concentración de TOP N53 y TOP 52 requerida para una relajación del 40% de la tensión de los preparados aórticos de rata precontraídos con FE en comparación con sildenafil, fue 24 veces y 48 veces menor, respectivamente (Figura 4.52, Tabla 4.2).

4.2.1.2 Anillos de aorta de rata sin endotelio

Tras la eliminación mecánica del endotelio de los anillos aórticos de rata, la relajación por los inhibidores de la PDE5, sildenafilo y TOP 52 se redujo en comparación con la obtenida en los preparados con el endotelio intacto (Figuras 4.51, 4.52, 4.53 y 4.54; Tablas 4.1, 4.2 y 4.3).

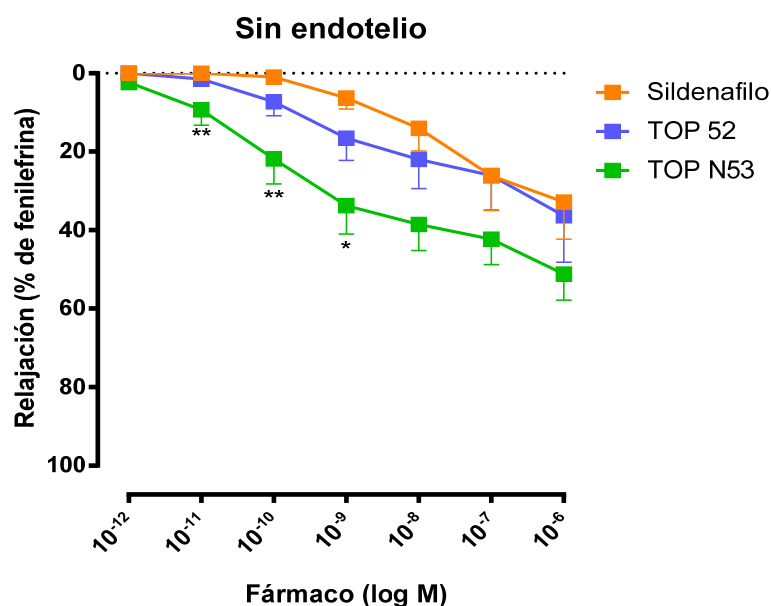


Figura 4.53. Relajación concentración dependiente inducida por TOP N53, TOP 52 y sildenafilo en anillos de aorta de rata aislados sin endotelio y sobre los cuales se ha desencadenado una meseta de contracción con FE (300 nM). Los fármacos TOP N53, TOP 52, y sildenafilo se adicionan al baño de forma acumulativa alcanzando concentraciones finales de 1 pM (10^{-12} M) hasta 1 μ M (10^{-6} M). Cada vez que se adicionaba fármaco al baño se multiplicaba la concentración final 10 veces y se dejaba actuar durante 30 min. Paralelamente, en un grupo de preparados “control temporal” o “vehículo”, sobre la meseta de contracción inducida con FE, se añadió, en cada paso de la curva, el mismo volumen de solución con igual concentración de DMSO que en los baños tratados con los fármacos. En todos los baños se midió la tensión contráctil (mg de fuerza) justo antes de añadir la siguiente concentración (cada 30 min) y durante un total de 3,5 horas. Los resultados se expresan como porcentaje de relajación de la tensión inducida por FE. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de 6 experimentos independientes de sildenafilo, 7 de TOP 52 y 7 de TOP N53. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de las pruebas de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * TOP N53 versus sildenafilo.

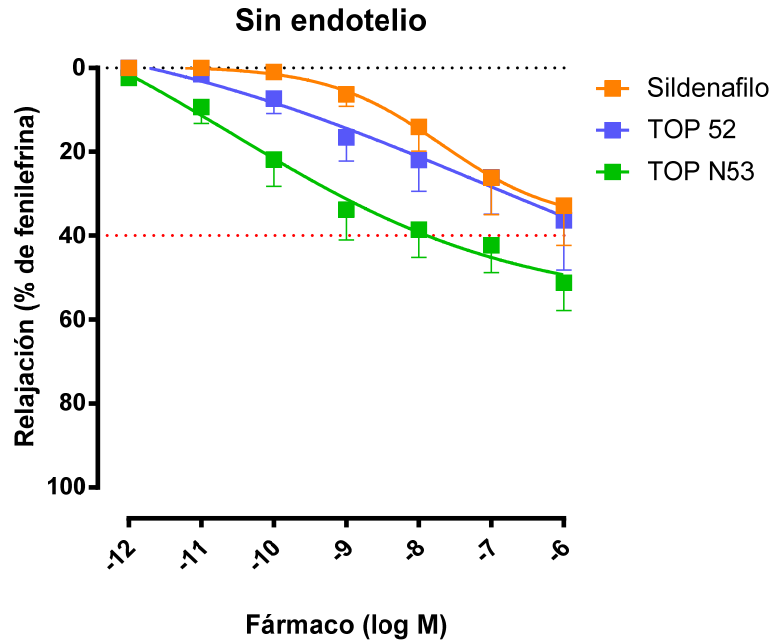


Figura 4.54. Relajación concentración dependiente por TOP N53, TOP 52 y sildenafil de la meseta de contracción inducida por FE (300 nM) en anillos de aorta de rata aislados sin endotelio. La figura muestra la regresión no lineal de los datos mostrados en la Figura 4.53. Se ha insertado una línea que muestra un 40% de relajación. Los resultados se muestran como las medias \pm SEM de 6 experimentos independientes de sildenafil, 7 de TOP 52 y 7 de TOP N53.

Específicamente, a concentraciones menores o iguales a 10 nM de sildenafil o TOP 52, la respuesta de relajación después de la eliminación mecánica del endotelio fue menos de una cuarta parte de la observada con el endotelio intacto (Figura 4.54, Tabla 4.3). Por ejemplo, con TOP 52 a 1 nM, la relajación con endotelio ascendió a una media de 80,7% mientras que cuando se había eliminado el endotelio la media fue de 16,5% (Tablas 4.1 y 4.3). Sin embargo, la relajación de los anillos aórticos de rata sin endotelio por TOP N53 fue superior a la inducida por los inhibidores únicamente de PDE5 TOP 52 y Sildenafil, si bien TOP N53 no llegó a producir una respuesta de relajación de magnitud similar a la observada con endotelio intacto (Figuras 4.53 y 4.54, en comparación con Figuras. 4.51 y 4.52, Tablas 4.1, 4.2 y 4.3).

Cuando se calcularon, para cada uno de los fármacos y concentraciones empleadas, las relaciones o ratios de relajación media (% de FE) observadas en las preparaciones sin endotelio respecto a las obtenidas en preparados con el endotelio intacto, estos cocientes fueron más altos para TOP N53 que para TOP 52 y sildenafil, advirtiendo al mismo tiempo que los ratios para los dos inhibidores exclusivamente de PDE5 (TOP 52 y sildenafil) no mostraron diferencias entre sí a este respecto (Figura 4.60, Tabla 4.6). En particular, a concentraciones menores o iguales a 10 nM, esta relación fue dos o más

veces mayores para TOP N53 (inhibidor de PDE5/dador de NO) en comparación con TOP 52 y sildenafil. Sin embargo, en ausencia de endotelio, TOP N53 no superó el 60% de la respuesta de relajación registrada en presencia de endotelio.

Test Fármaco	SIN ENDOTELIO								
	Sildenafil			TOP 52			TOP N53		
log M	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n
-12	0,00	0,00	6	-	-	7	2,36	1,05	7
-11	0,00	0,00	6	1,49	1,32	7	9,32	3,89	7
-10	0,93	0,59	6	7,29	3,49	7	21,85	6,34	7
-9	6,28	2,73	6	16,54	5,60	7	33,73	7,20	7
-8	14,03	5,70	6	21,92	7,35	7	38,50	6,54	7
-7	26,13	8,78	6	26,04	8,67	7	42,27	6,45	7
-6	32,80	9,39	6	36,29	11,74	7	51,16	6,56	7

Tabla 4.3. Relajación concentración dependiente por TOP N53, TOP 52 y sildenafil de la meseta de contracción inducida por FE (300 nM) en anillos de aorta de rata aislados sin endotelio. Los datos corresponden a la figura 4.53. Se detallan la media aritmética del porcentaje de relajación de la tensión obtenida con FE, el error estándar de la media y el número de experimentos independientes realizados. Para más detalles consultar la descripción de la figura 4.53

La regresión no lineal del registro de relajación (%) (Figura 4.54) permitió calcular una Emax de 48,7, 39,8, 36,4% de relajación para TOP N53, TOP 52 y sildenafil, respectivamente, que es menor que la Emax correspondiente con endotelio intacto en todos los casos. La CE50 para TOP N53 (0.22 nM), TOP 52 (5.9 nM), sildenafil (20.6 nM) son más altas que las calculadas para el endotelio intacto (Tabla 4.2), lo que refleja un cambio hacia la derecha de las curvas de concentración-relajación indicando una potencia menor, aunque estas potencias son difíciles de comparar ya que los Emax son diferentes. Se calculó que la relajación del 40% de la meseta de FE (CI40) se lograba con 7,5 nM de TOP N53 mientras que se necesitaba más de 1 µM de TOP 52 o sildenafil (Tabla 4.2). Por tanto, cuando no hay endotelio se obtiene una relajación del 40% con concentraciones 133 veces menores de TOP N53 en comparación con TOP 52 o sildenafil (Fig. 4.59)

4.2.1.3 Anillos de aorta de rata incubados con L-NAME (100 μ M)

La inhibición farmacológica de la síntesis de óxido nítrico por L-NAME (100 μ M) reprodujo parcialmente la alteración en la relajación de los anillos de aorta de rata inducida por inhibidores de la PDE5 observada en ausencia de endotelio (Figuras 4.55 y 4.56 comparar con 4.53 y 4.54, respectivamente. Tablas 4.2, 4.3 y 4.4).

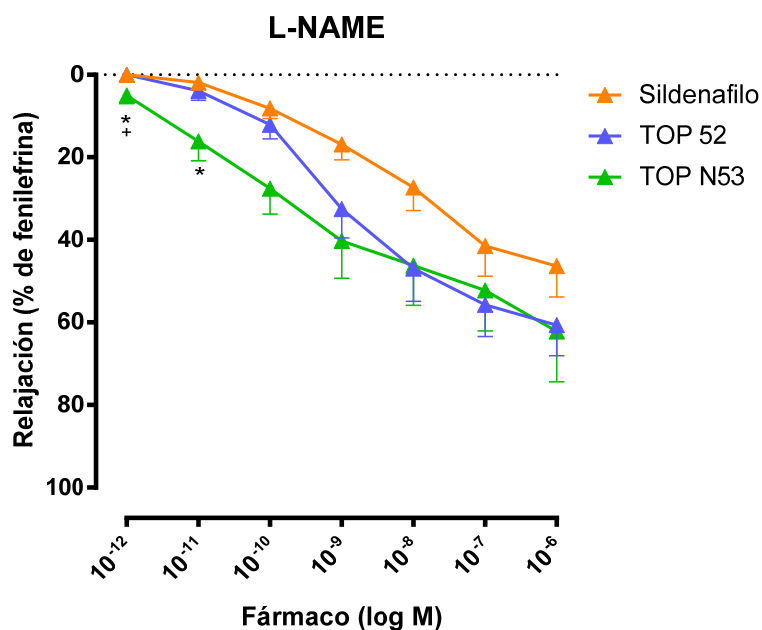


Figura 4.55. Relajación concentración dependiente inducida por TOP N53, TOP 52 y sildenafil en anillos de aorta de rata aislados incubados con L-NAME (100 μ M) y sobre los cuales se ha desencadenado una meseta de contracción con FE (300 nM). Los fármacos TOP N53, TOP 52, y sildenafil se adicionan al baño de forma acumulativa alcanzando concentraciones finales de 1 pM (10^{-12} M) hasta 1 μ M (10^{-6} M). Cada vez que se adicionaba fármaco al baño se multiplicaba la concentración final 10 veces y se dejaba actuar durante 30 min. Paralelamente, en un grupo de preparados “control temporal” o “vehículo”, sobre la meseta de contracción inducida con FE, se añadió, en cada paso de la curva, el mismo volumen de solución con igual concentración de DMSO que en los baños tratados con los fármacos. En todos los baños se midió la tensión contráctil (mg de fuerza) justo antes de añadir la siguiente concentración (cada 30 min) y durante un total de 3,5 horas. Los resultados se expresan como porcentaje de relajación de la tensión inducida por FE. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de 6 experimentos independientes de sildenafil, 6 de TOP 52 y 8 de TOP N53. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de las pruebas de Dunn.

* $p < 0,05$ * TOP N53 versus sildenafil, + $p < 0,05$ TOP N53 versus TOP 52

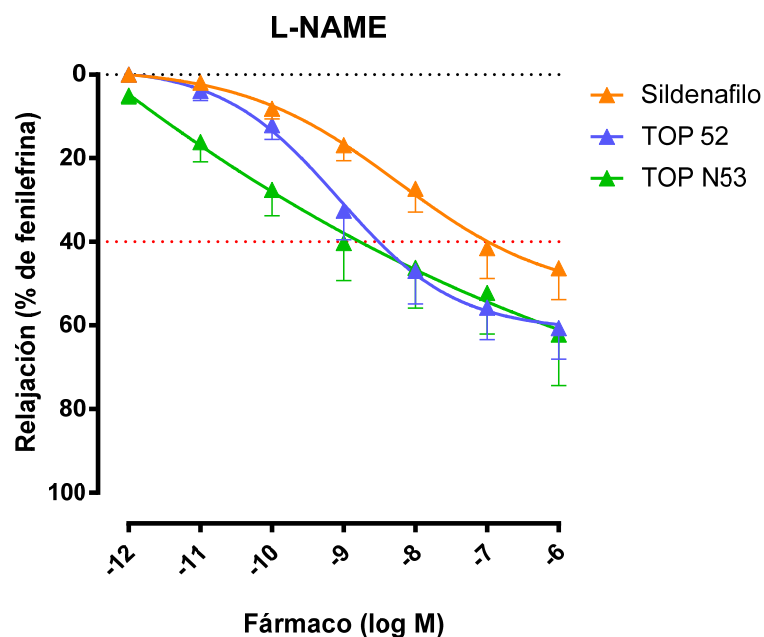


Figura 4.56. Relajación concentración dependiente por TOP N53, TOP 52 y sildenafil de la meseta de contracción inducida por FE (300 nM) en anillos de aorta de rata aislados incubados con L-NAME (100 μ M). La figura muestra la regresión no lineal de los datos mostrados en la Figura 4.55. Se ha insertado una línea que muestra un 40% de relajación. Los resultados se muestran como las medias \pm SEM de 6 experimentos independientes de sildenafil, 6 de TOP 52 y 8 de TOP N53.

Test Fármaco	L-NAME								
	Sildenafil			TOP 52			TOP N53		
log M	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n
-12	0,00	0,00	6	-	-	6	5,01	1,89	8
-11	1,85	1,39	6	3,89	2,20	6	16,11	4,68	8
-10	8,13	2,37	6	12,04	3,33	6	27,54	6,15	8
-9	16,86	3,68	6	32,53	6,97	6	40,22	8,94	8
-8	27,31	5,55	6	46,94	7,88	6	46,22	9,61	8
-7	41,44	7,21	6	55,73	7,66	6	52,22	9,76	8
-6	46,30	7,38	6	60,64	7,38	6	62,18	12,17	8

Tabla 4.4. Relajación concentración dependiente por TOP N53, TOP 52 y sildenafil de la meseta de contracción inducida por FE (300 nM) en anillos de aorta de rata aislados incubados con L-NAME (100 μ M). Los datos corresponden a la figura 4.55. Se detallan la media aritmética del porcentaje de relajación de la tensión obtenida con FE, el error estándar de la media y el número de experimentos independientes realizados. Para más detalles consultar la descripción de la figura 4.55.

Con concentraciones de sildenafil iguales o inferiores a 10 nM y concentraciones de TOP 52 iguales o inferiores a 1 nM, la respuesta de relajación en presencia de L-NAME fue menos del 40% de la obtenida en preparados con endotelio intacto sin inhibición de la óxido nítrico sintasa (Figuras 4.55 y 4.56 comparar con 4.51 y 4.52, respectivamente. Figura 4.59. Tablas 4.1, 4.2 y 4.4). Así, por ejemplo con TOP 52 o sildenafil a 1 nM la relajación con endotelio ascendió a una media de 80,7% y 50,1% mientras que fue en presencia de L-NAME la relajación media fue de 32,5% y 16,9%, respectivamente (Tabla 4.4). TOP N53 en presencia de L-NAME alcanzó un mayor nivel de relajación que el sildenafil en todo el rango de concentraciones (1 pM a 1 μM) pero la superioridad de TOP N53 frente a TOP 52 se limitó a concentraciones menores de 1 nM (Figuras 4.55, 4.56, Tabla 4.4). A concentraciones de 10, 100 y 1000 nM, el grado de relajación de los anillos de aorta de rata contraídos con FE en presencia de L-NAME (100 μM) fue equiparable para TOP 52 y TOP N53.

Tampoco en este caso, en presencia de L-NAME, se consiguió con TOP N53 llegar a los niveles de respuesta relajante que tenía en preparados con endotelio intacto sin L-NAME (Figuras 4.55 y 4.56, en comparación con Figuras 4.51 y 4.52, Tablas 4.1, 4.2 y 4.4).

Comparando los porcentajes de relajación media obtenidos con cada uno de los fármacos y para cada concentración observamos que en las preparaciones con L-NAME respecto a preparados con el endotelio intacto (es decir, en ausencia de L-NAME) fueron más altas para TOP N53 que para sildenafil sobre el rango de concentración completo (1 pM a 1 μM) (Figuras 4.55 y 4.56, en comparación con Figuras 4.51 y 4.52). Para TOP 52, estas proporciones fueron menores que con TOP N53 a <1 nM, pero se acercaron a aquellas con IPDE5/NO a >1 nM. En presencia de L-NAME, TOP N53 no superó el 72% de la respuesta de relajación registrada en presencia de endotelio. Se constató que TOP 52 resultó en una relajación similar a la del sildenafil (y menos que la observada con TOP N53) a concentraciones ≤ 0.1 nM pero una relajación aparentemente más fuerte que el sildenafil de ≥ 1 nM acercándose a la relajación (%) de TOP N53. La regresión no lineal del registro de relajación (%) (Figura 4.56) permitió calcular la Emax de 62, 60, 51,4% de relajación para TOP N53, TOP 52 y sildenafil, respectivamente, que es menor que la Emax correspondiente con endotelio intacto. En presencia de L-NAME EC50 para TOP N53 (0,27 nM), TOP 52 (0,93 nM), sildenafil (5,8 nM) son más altos que los calculados para endotelio intacto (Tabla 4.2), esto ya se observó en ausencia de endotelio

(Figura 4.59). Las concentraciones que se traducen en 40% de relajación de la meseta de FE (IC40) se calcularon como 1,4 nM para TOP N53, 2,98 nM para TOP 52 y 95,7 nM para sildenafil (Tabla 4.2). Con L-NAME, las concentraciones requeridas para la relajación del 40% de los anillos aórticos de rata precontraídos con FE fueron solo ligeramente (2 veces) menores para TOP N53 en comparación con TOP 52, pero 68 veces menores para IPDE5/NO frente al IPDE5 de referencia sildenafil.

4.2.1.4 Anillos de aorta de rata en solución de Krebs con glucosa alta (25 mM)

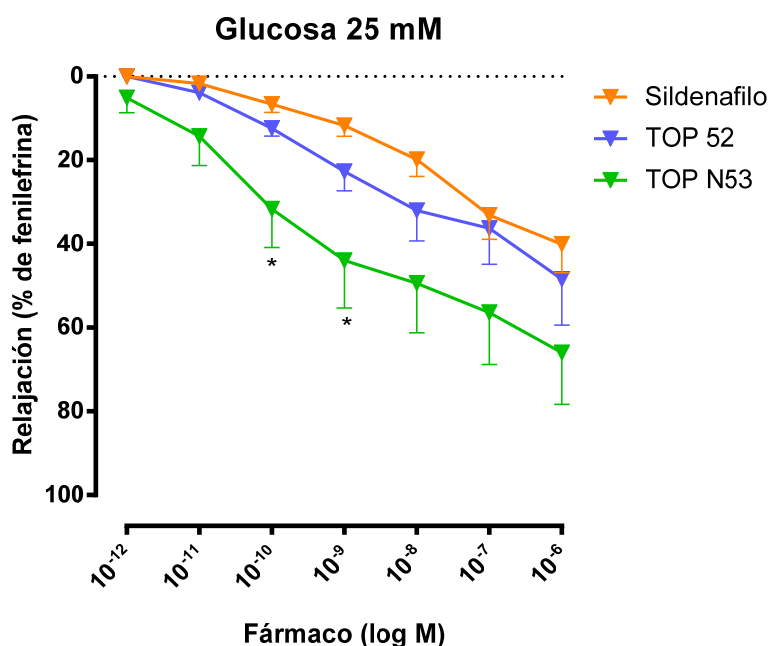


Figura 4.57. Relajación concentración dependiente inducida por TOP N53, TOP 52 y sildenafil en anillos de aorta de rata aislados en una solución de Krebs con glucosa alta (25 mM) y sobre los cuales se ha desencadenado una meseta de contracción con FE (300 nM). Los fármacos TOP N53, TOP 52, y sildenafil se adicionan al baño de forma acumulativa alcanzando concentraciones finales de 1 pM (10⁻¹² M) hasta 1 μM (10⁻⁶ M). Cada vez que se adicionaba fármaco al baño se multiplicaba la concentración final 10 veces y se dejaba actuar durante 30 min. Paralelamente, en un grupo de preparados “control temporal” o “vehículo”, sobre la meseta de contracción inducida con FE, se añadió, en cada paso de la curva, el mismo volumen de solución con igual concentración de DMSO que en los baños tratados con los fármacos. En todos los baños se midió la tensión contráctil (mg de fuerza) justo antes de añadir la siguiente concentración (cada 30 min) y durante un total de 3,5 horas. Los resultados se expresan como porcentaje de relajación de la tensión inducida por FE. Los resultados se muestran como la media ± SEM de 7 experimentos independientes de sildenafil, 8 de TOP 52 y 7 de TOP N53. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de las pruebas de Dunn. * p < 0,05 TOP N53 versus sildenafil.

La exposición de los anillos aórticos de rata a glucosa alta (25 mM) durante 60 minutos antes de la precontracción con FE y durante el tiempo de realización de la curva concentración-respuesta acumulativa de relajación evidenció una respuesta reducida al sildenafil en comparación con la relajación de los anillos aórticos de rata obtenida con

este fármaco en preparados con endotelio intacto (Figuras 4.57 y 4.58, en comparación con Figuras 4.51 y 4.52, Tablas 4.1, 4.2 y 4.5). Por ejemplo, a 1 nM la relajación de sildenafil se agotó en una media del 11,7% en anillos aórticos en glucosa alta mientras que alcanzó una media del 50,1% con endotelio intacto (glucosa 5 mM).

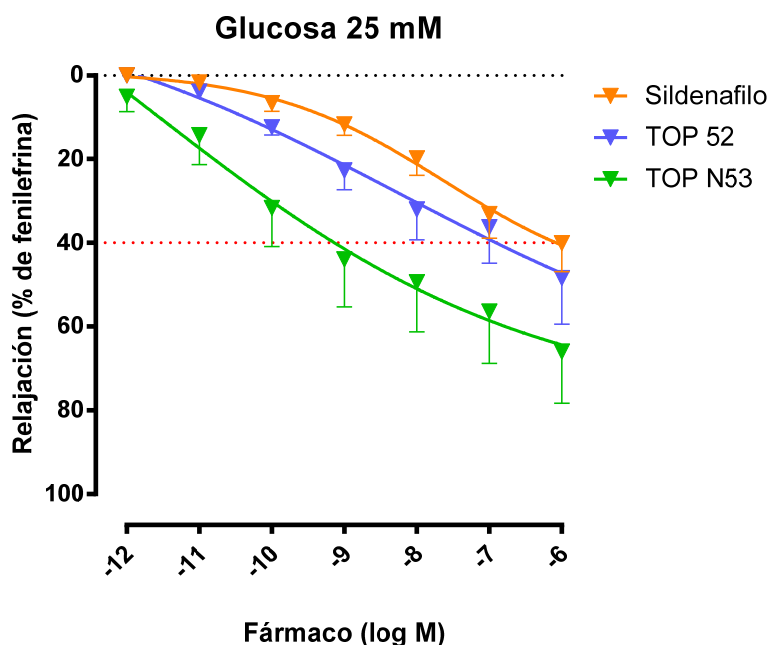


Figura 4.58. Relajación concentración dependiente por TOP N53, TOP 52 y sildenafil de la meseta de contracción inducida por FE (300 nM) en anillos de aorta de rata aislados incubados con Krebs con glucosa alta (25 mM). La figura muestra la regresión no lineal de los datos mostrados en la Figura 4.57. Se ha insertado una línea que muestra un 40% de relajación. Los resultados se muestran como las medias \pm SEM de 7 experimentos independientes de sildenafil, 8 de TOP 52 y 7 de TOP N53.

Test Fármaco	GLUCOSA 25 mM								
	Sildenafil			TOP 52			TOP N53		
log M	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n
-12	0,00	0,00	7	-	-	8	5,04	3,50	7
-11	1,66	1,08	7	3,87	1,74	8	14,30	6,99	7
-10	6,61	1,90	7	12,35	1,76	8	31,62	9,12	7
-9	11,71	2,52	7	22,65	4,51	8	43,92	11,32	7
-8	19,80	3,96	7	31,99	7,16	8	49,37	11,74	7
-7	33,12	5,73	7	36,23	8,51	8	56,37	12,33	7
-6	40,05	6,77	7	48,41	10,95	8	65,95	12,26	7

Tabla 4.5. Relajación concentración dependiente por TOP N53, TOP 52 y sildenafil de la meseta de contracción inducida por FE (300 nM) en anillos de aorta de rata aislados incubados con glucosa alta (25 mM). Los datos corresponden a la figura 4.57. Se detallan la media aritmética del porcentaje de relajación de la tensión obtenida con FE, el error estándar de la media y el número de experimentos independientes realizados.

Estas observaciones también se reflejan en las relaciones de relajación media (% de FE) observadas en las preparaciones expuestas a niveles altos de glucosa respecto a aquellas con el endotelio intacto con niveles de glucosa fisiológicos de 5 mM.

Con glucosa alta, la relajación por sildenafil a concentraciones menores o iguales a 10 nM o TOP 52 en concentraciones menores o iguales a 1 nM fue menos de un tercio en comparación con el endotelio intacto. Para el sildenafil, en todo el rango de concentración, estas relaciones de relajación media (% de FE) fueron más altas que con la eliminación mecánica del endotelio y más bajas que con L-NAME. En las incubaciones con alto contenido de glucosa, estas relaciones de relajación media fueron equiparables entre sildenafil y TOP 52 (1 pM a 1 μ M) (Figuras 4.60 y Tabla 4.2). Cuando los anillos aórticos de rata se expusieron a niveles altos de glucosa, en todo el rango de concentraciones (1 pM a 1 μ M), la respuesta de relajación a TOP N53 fue superior a la de Sildenafil y TOP 52. Con TOP N53 la respuesta de relajación también era deteriorada por la presencia de glucosa alta, no recuperándose los niveles de relajación obtenidos en preparados con el endotelio intacto con glucosa 5 mM (Figuras 4.57 y 4.58, en comparación con Figuras 4.51 y 4.52, Figura 4.59, Tablas 4.1, 4.2 y 4.5).

Las proporciones de relajación media (% de FE) observadas en las preparaciones con alto contenido de glucosa respecto a aquellas con el endotelio intacto (es decir, con glucosa 5 mM) calculadas para cada uno de los elementos de los fármacos y concentraciones fueron más altas para TOP N53 que para sildenafil o TOP 52 en todo el rango de concentraciones. En presencia de glucosa alta, TOP N53 no superó el 76% de la respuesta de relajación registrada en presencia de endotelio.

La regresión no lineal del registro de relajación (%) (Figura 4.58) permitió calcular la E_{max} de 64, 51, 49,1% de relajación para TOP N53, TOP 52 y sildenafil, respectivamente, que es menor que la E_{max} correspondiente con endotelio intacto. En presencia de glucosa alta la CE_{50} para TOP N53 (0.18 nM), TOP 52 (2.79 nM), sildenafil (20.4 nM) fueron más altas que las calculadas con endotelio intacto (Tabla 4.2). Las concentraciones que se traducen en un 40% de relajación de la meseta de FE (CI_{40}) se calcularon como 0,66 nM para TOP N53, 89,3 nM para TOP 52 y 863 nM para sildenafil. En consecuencia, con la exposición a niveles altos de glucosa, las concentraciones requeridas para una relajación del 40% fueron respectivamente 1308 veces y 135 veces mayores con los inhibidores puros de PDE5 sildenafil y TOP 52, en comparación con TOP N53 (inhibidor de PDE5 / dador de NO).

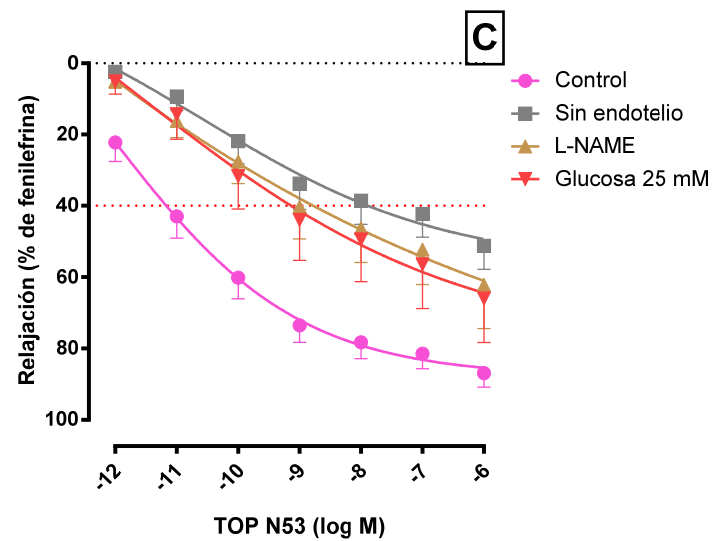
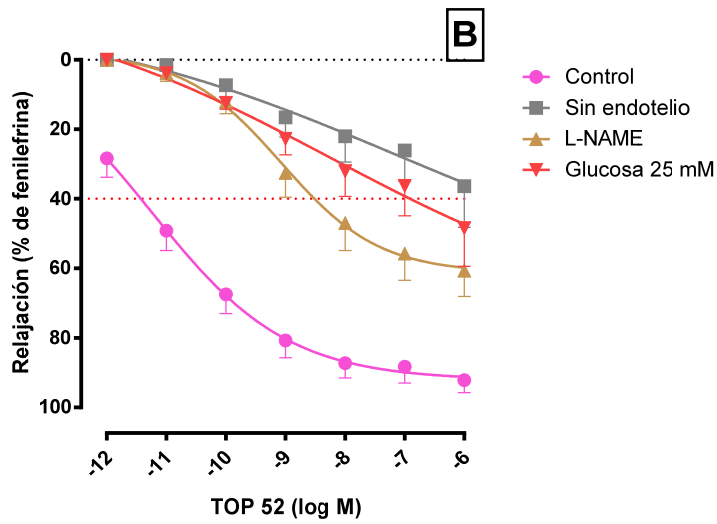
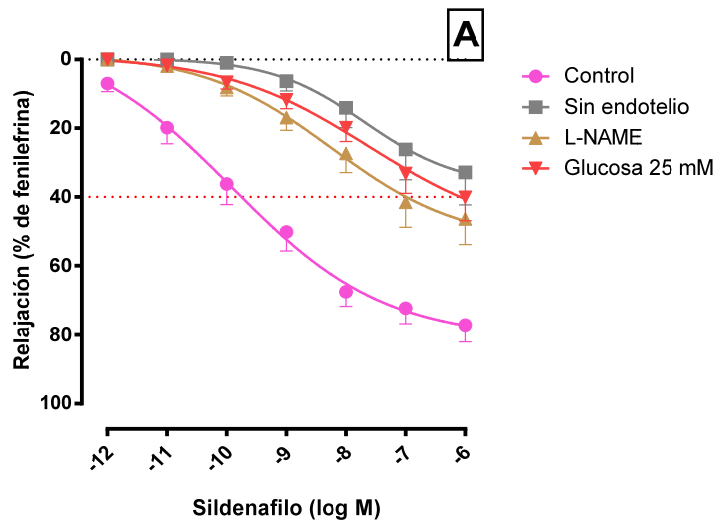


Figura 4.59. Comparación del efecto de los fármacos sildenafil (A), TOP 52 (B) y TOP N53 (C) en arterias con endotelio intacto, sin endotelio, incubadas con L-NAME y con glucosa 25 mM.

4.2.1.4.1 *Ratio de relajación respecto a curva control.*

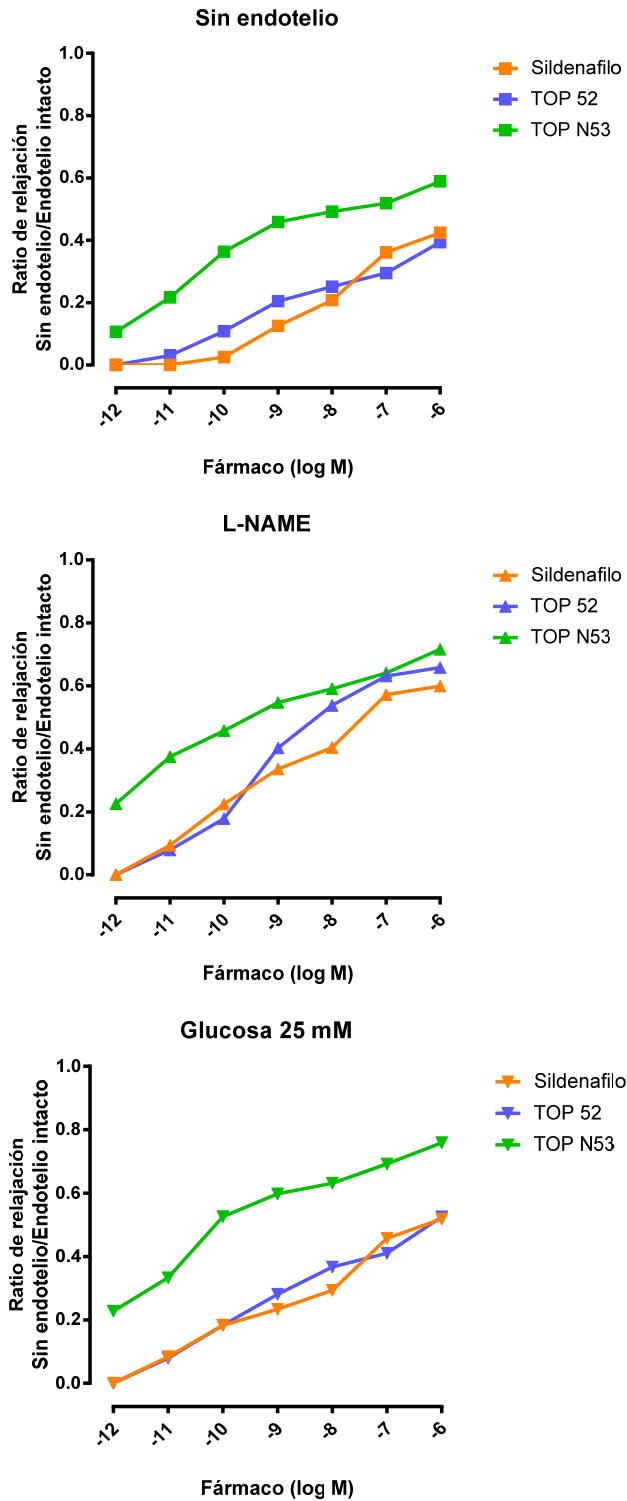


Figura 4.60. Relación de "Relajación (%)" de los anillos aórticos de rata precontraídos con FE entre las diferentes condiciones de disfunción endotelial y endotelio intacto para los elementos de prueba TOP N53 y TOP 52 y el elemento de referencia sildenafil. Las medias de "Relajación (%)" para una concentración dada de ensayo / elemento de referencia obtenido (A) sin endotelio, (B) L-NAME, (C) glucosa alta (Tabla 1) se dividieron por las medias de "Relajación (%)" para la concentración idéntica del elemento de prueba / referencia correspondiente obtenido con endotelio intacto. Estos "ratios de relajación (%)" calculados se representaron frente a la concentración respectiva de los compuestos de prueba / referencia.

Ratio Relajación (%)	Sin endotelio/Endotelio intacto			L-NAME/Endotelio intacto			Glucosa alta/Endotelio intacto		
	Sildenafil	TOP 52	TOP N53	Sildenafil	TOP 52	TOP N53	Sildenafil	TOP 52	TOP N53
Fármaco									
log M									
-12	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	0,23
-11	0,00	0,03	0,22	0,09	0,08	0,37	0,08	0,08	0,33
-10	0,03	0,11	0,36	0,22	0,18	0,46	0,18	0,18	0,53
-9	0,13	0,2	0,46	0,34	0,40	0,55	0,23	0,28	0,60
-8	0,21	0,25	0,49	0,40	0,54	0,59	0,29	0,37	0,63
-7	0,36	0,29	0,52	0,57	0,63	0,64	0,46	0,41	0,69
-6	0,42	0,39	0,59	0,60	0,66	0,72	0,52	0,53	0,76

Tabla 4.6. Relación de "Relajación (%)" de los anillos aórticos de rata precontraídos con FE entre las diferentes condiciones de disfunción endotelial y endotelio intacto para los elementos de prueba TOP N53 y TOP 52 y el elemento de referencia sildenafil.

4.2.1.4.2 Desplazamiento de curvas por incubación con glucosa 25 Mm

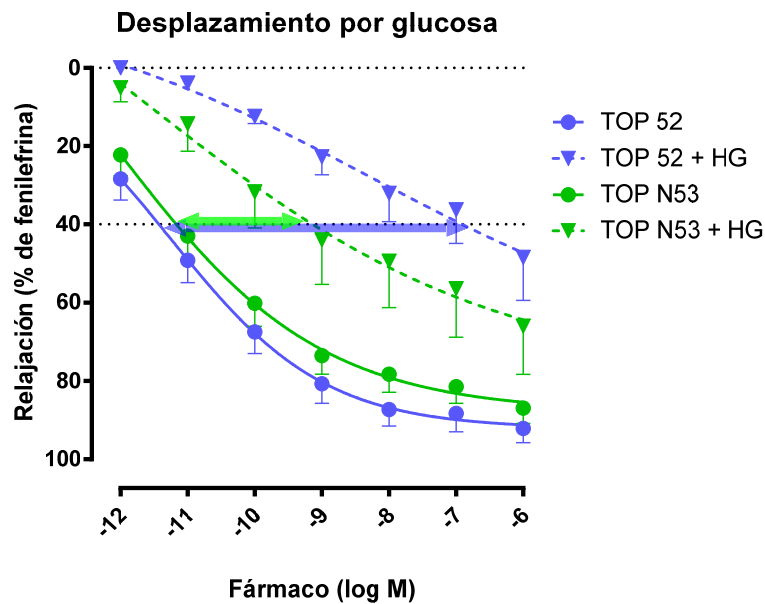


Figura 4.61. Relajación de anillos aórticos de rata precontraídos con FE (con endotelio intacto) preexpuestos a glucosa a 5 mM (glucosa normal) y a 25 mM (glucosa alta) por el IPDE5/NO TOP N53 y su metabolito IPDE5 TOP 52 . Las líneas con puntas de flecha indican el cambio en IC40 de glucosa normal a glucosa alta para TOP 52 y TOP N53.

Los datos de relajación (%) para TOP N53 y TOP 52 en anillos aórticos de rata con endotelio intacto expuesto a glucosa normal (5 mM) y glucosa alta (25 mM) se representan como ajustes de regresión no lineal en la Figura 4.61, con el fin de hacer una comparación directa. El desplazamiento hacia la derecha de las curvas de concentración-

respuesta de relajación en glucosa alta en comparación con las realizadas en glucosa normal fue más fuerte con TOP 52 en comparación con TOP N53. Esto se refleja en un cambio causado por niveles altos de glucosa de 82 veces en la CI40 para TOP N53 en comparación con un cambio de 22325 veces para TOP 52 (Figura 4.61). Por lo tanto, en términos de las concentraciones requeridas para una relajación del 40%, su cambio hacia concentraciones más altas de glucosa normal a condiciones de glucosa alta fue 272 menor con el inhibidor de PDE5/dador de NO TOP N53, en comparación con el inhibidor de PDE5 puro TOP 52.

4.2.1.4.3 Efecto de ODQ sobre efecto de TOP N53

Estos experimentos se realizaron para determinar si la Guanilato ciclasa (GC) soluble sensible al NO está involucrada en la relajación de los anillos aórticos de rata precontraídos con FE con condiciones normales o de glucosa alta. Con este fin, se añadió ODQ, un inhibidor de la GC soluble sensible al NO al baño de órganos a una concentración final de 10 μ M. ODQ casi abolió la relajación por TOP N53 tanto en condiciones normales como altas de glucosa (Figura 4.62, Tabla 4.7).

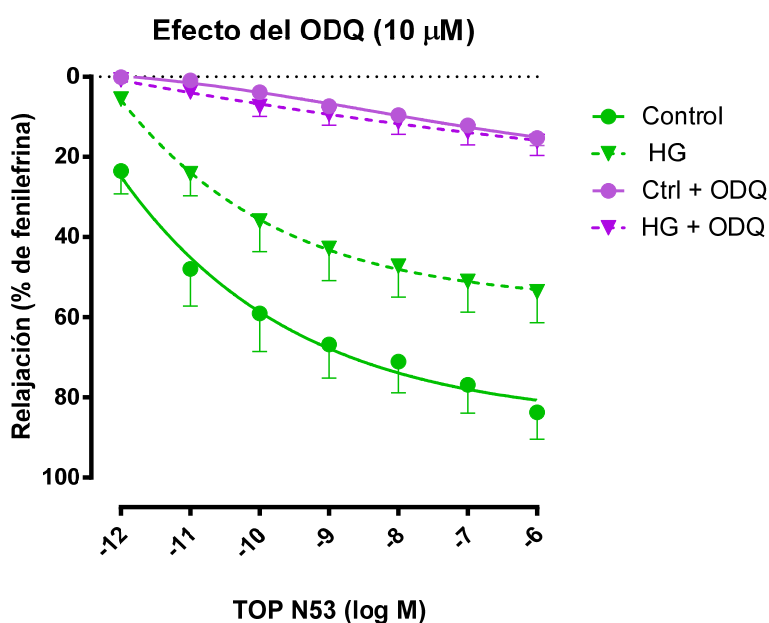


Figura 4.62. ODQ, un inhibidor de la GC soluble sensible al NO anula la relajación de los anillos aórticos de rata precontraídos con FE por TOP N53. Se preincubaron anillos aórticos de rata con endotelio intacto o después de la incubación con glucosa alta (25 mM) durante 60 min con ODQ (10 μ M) seguido de TOP N53 a concentraciones acumulativas ascendentes. Los resultados se dieron como "Relajación (% de FE)" y se representan como la media \pm s.e.m. de 18, 18, 16, 20 experimentos para endotelio intacto, ODQ con endotelio intacto, endotelio expuesto a glucosa alta, ODQ con endotelio expuesto a glucosa alta, respectivamente.

TOP N53	RELAJACIÓN (% de FENILEFRINA)											
	ENDOTELIO INTACTO			ENDOTELIO INTACTO + ODQ			GLUCOSA ALTA			GLUCOSA ALTA + ODQ		
log M	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n
-12	23,47	5,67	18	0,07	0,07	18	5,53	1,67	16	0,79	0,43	20
-11	47,93	9,22	18	0,91	0,49	18	24,18	5,48	16	3,77	1,31	20
-10	59,02	9,44	18	3,82	1,00	18	36,00	7,53	16	7,38	2,35	20
-9	66,78	8,37	18	7,34	1,34	18	42,83	8,00	16	9,32	2,74	20
-8	71,05	7,74	18	9,56	1,52	18	47,26	7,71	16	11,29	3,04	20
-7	76,81	6,96	18	12,11	1,53	18	51,04	7,59	16	13,74	3,19	20
-6	83,73	6,66	18	15,26	1,84	18	53,65	7,68	16	16,10	3,44	20

Tabla 4.7. ODQ, un inhibidor de la GC soluble sensible al NO anula la relajación de los anillos aórticos de rata precontraídos con FE por TOP N53. Datos correspondientes a la figura 4.63. Resultados expresados en porcentaje de relajación y se representan como la media \pm s.e.m.

4.2.2 Experimentos de valoración del efecto en el curso del tiempo

En una serie separada de experimentos, se estudió el curso temporal de la relajación de los anillos aórticos de rata precontraídos con FE (300 nM) mediante concentraciones únicas de TOP N53 (100 pM), TOP 52 (100 pM) y sildenafil (1 nM) en preparaciones con endotelio intacto y glucosa normal (5 mM).

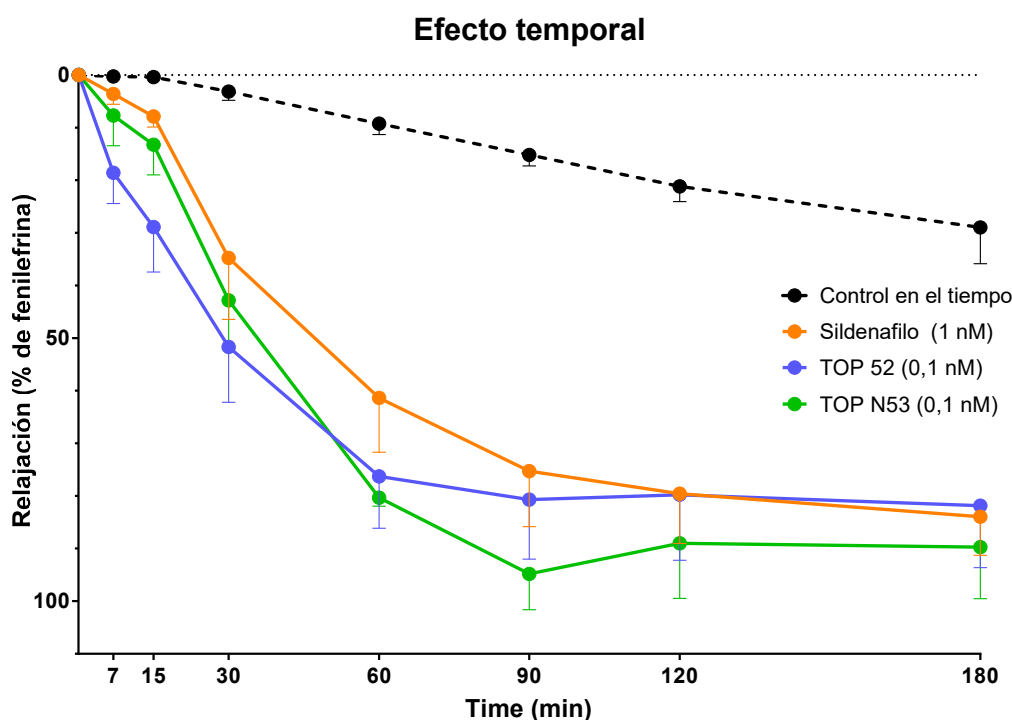


Figura 4.63. Relajación de los anillos aórticos de rata precontraídos con FE mediante concentraciones únicas de los elementos de prueba TOP N53 (0,1 nM), TOP 52 (0,1 nM), sildenafil (1 nM): Transcurso del tiempo. Los anillos aórticos de rata elegibles se precontraeraron con FE 300 nM y una vez que se alcanzó la meseta de desarrollo de la tensión contráctil, se añadieron los compuestos de prueba y de referencia o vehículo (DMSO al 0,1%) a la solución de Krebs en los baños de órganos. La tensión isométrica (mg) se midió en los minutos 7, 15, 30, 60, 90, 120, 180 después de que se añadieran TOP N53, TOP 52 o sildenafil a los baños de órganos. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 5, 9, 7, 5 experimentos con vehículo TOP N53, TOP 52, sildenafil, respectivamente.

Hubo una modesta, casi lineal, pérdida de tensión con el vehículo (0.1% DMSO) en la solución de Krebs que no excedió una media del 30% durante 3 horas. TOP N53, TOP 52 y sildenafil provocaron una relajación dependiente del tiempo con un máximo de aproximadamente 60 min para TOP 52 y 90 min para TOP N53 y sildenafil y ningún cambio adicional hasta 180 min. Hubo una tendencia para que TOP 52 ejerza una relajación más rápida que TOP N53 y sildenafil y para TOP N53 resulte en una relajación máxima más alta (a los 90 min) sobre TOP 52 y Sildenafil (Figura 4.63, Tabla 4.8).

TIEMPO minutos	RELAJACIÓN (% de FENILEFRINA)											
	SILDENAFILO			TOP 52			TOP N53			Vehículo		
	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n	media	s.e.m	n
0,01	0	0	7	0	0	9	0	0	5	0	0	5
7	3,59	1,94	7	18,56	5,77	9	7,68	5,73	5	0,28	0,28	5
15	7,86	1,99	7	28,87	8,49	9	13,25	5,69	5	0,37	0,37	5
30	34,75	11,67	7	51,66	10,49	9	42,82	9,34	5	3,14	1,63	5
60	61,35	10,26	7	76,25	9,81	9	80,35	1,58	5	9,23	2,01	5
90	75,27	10,51	7	80,67	11,24	9	94,84	6,78	5	15,17	2,05	5
120	79,54	9,41	7	79,78	12,40	9	89,01	10,44	5	21,15	2,85	5
180	83,95	7,32	7	81,85	11,72	9	89,73	9,73	5	28,96	6,88	5

Tabla 4.8. Datos correspondientes a la figura 4.64. Resultados expresados en porcentaje de relajación y se representan como la media \pm s.e.m.

Finalmente, con el fin de comprobar la influencia del tiempo de actuación en cada uno de los fármacos y en cada una de las condiciones experimentales, se procedió a comparar en las curvas el efecto de concentraciones crecientes de fármacos con intervalos de tiempo de 7 minutos con las curvas obtenidas con intervalos de tiempo de 30 minutos (figuras 4,51 hasta la 4.57).

En la figura 4.64 se puede apreciar cómo el efecto tiende a aumentar con el tiempo, pero la diferencia de efectos en concentraciones desde 1 pM hasta 1 nM es más pronunciada para TOP N53 que para TOP 52 y sildenafil. Esta diferencia se reproduce en situaciones de endotelio intacto y también en preparados sin endotelio, en presencia de L-NAME y en presencia de glucosa alta (Figura 4.64 y tablas 4.9 hasta 4.12).

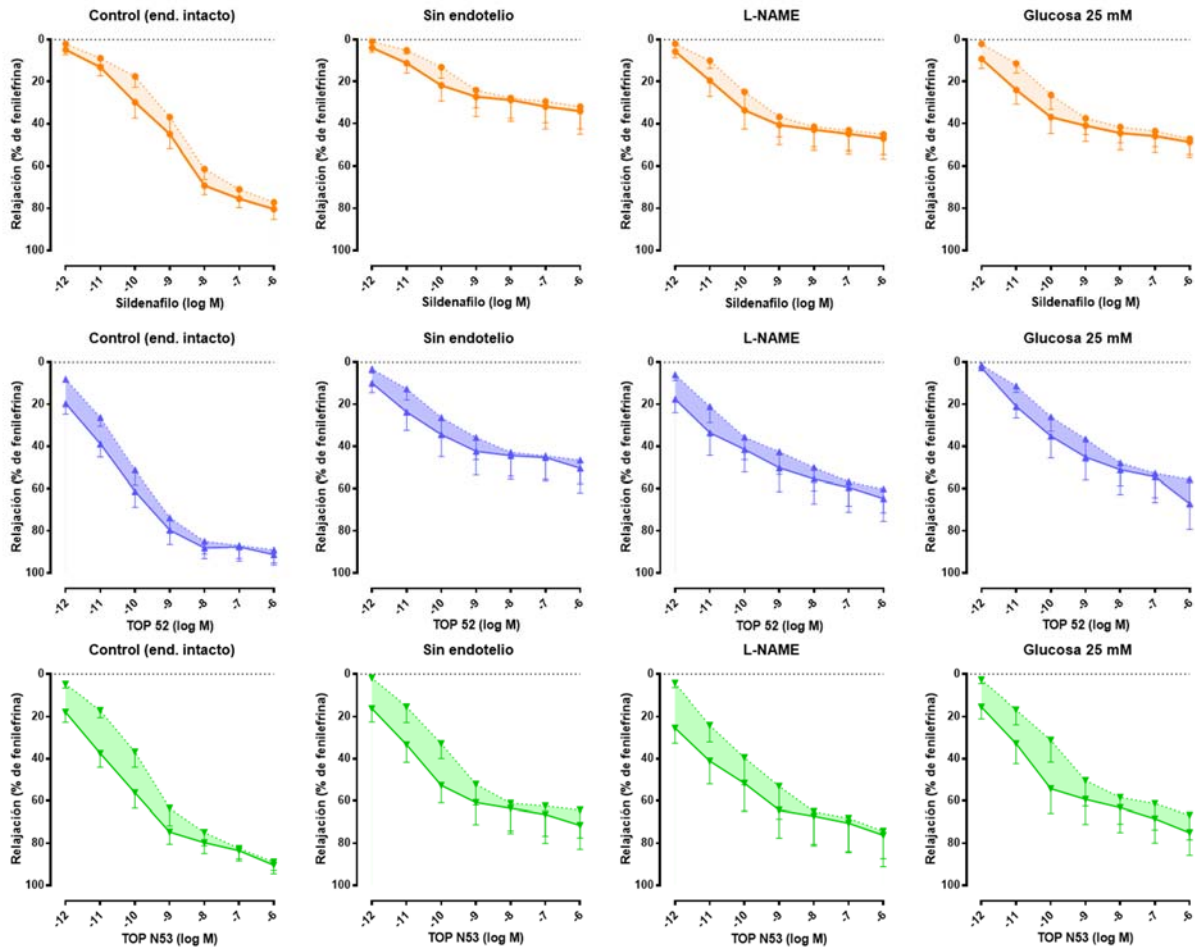


Figura 4.64. Curvas concentración respuesta de relajación por sildenafil, TOP 52 y TOP N53 realizadas con intervalos entre concentraciones de 7 y 30 minutos, en anillos de aorta de rata con endotelio intacto, sin endotelio, anillos con endotelio incubados L-NAME (100 μ M) y anillos en presencia de glucosa alta (25 mM).

ENDOTELIO INTACTO - RELAJACIÓN (% de FENILEFRINA)												
Tiempo	7 minutos						30 minutos					
Fármaco	Sildenafil n=10		TOP 52 n=11		TOP N53 n=12		Sildenafil n=10		TOP 52 n=11		TOP N53 n=12	
log M	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m
-12	1,98	0,70	7,98	1,08	4,80	1,76	4,76	2,29	19,61	4,93	17,86	4,72
-11	8,82	3,03	26,27	4,13	17,01	3,35	13,10	4,02	38,84	6,12	37,40	6,57
-10	17,48	5,22	51,18	7,01	36,77	7,20	29,81	7,39	61,24	7,47	56,12	7,25
-9	36,91	7,20	73,69	6,79	63,45	8,23	44,99	6,79	79,58	6,69	74,63	5,80
-8	61,29	4,95	84,86	6,02	74,79	6,27	69,18	4,28	88,09	5,06	79,66	5,17
-7	70,91	3,91	86,92	6,04	82,43	4,96	75,39	4,15	87,58	6,70	83,43	4,84
-6	77,16	3,75	88,97	6,05	88,87	3,91	80,35	4,93	91,26	4,92	90,33	4,05

Tabla 4.9. Datos de curvas concentración respuesta de relajación por sildenafil, TOP 52 y TOP N53 realizadas con intervalos entre concentraciones de 7 y 30 minutos, en anillos de aorta de rata con endotelio intacto.

SIN ENDOTELIO - RELAJACIÓN (% de FENILEFRINA)												
Tiempo	7 minutos						30 minutos					
Fármaco	Sildenafil n=6		TOP 52 n=8		TOP N53 n=6		Sildenafil n=6		TOP 52 n=8		TOP N53 n=6	
log M	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m
-12	0,83	0,65	3,17	1,82	1,90	0,94	3,86	2,13	9,92	4,36	16,09	6,29
-11	5,09	1,61	12,60	5,22	15,32	7,46	11,21	4,60	23,68	8,62	33,32	8,36
-10	13,11	5,15	26,32	8,84	32,82	7,00	21,74	7,39	34,38	10,32	52,66	8,17
-9	24,06	8,39	35,77	10,44	52,07	9,79	27,15	9,26	42,35	11,23	60,83	10,34
-8	27,81	9,62	42,79	11,18	61,12	13,09	28,69	10,13	44,43	11,05	63,51	11,85
-7	29,38	10,08	44,50	11,08	62,40	14,20	31,82	10,57	45,26	11,12	66,31	13,63
-6	31,88	10,47	46,52	10,98	64,31	13,16	34,05	10,84	50,35	11,55	71,48	11,36

Tabla 4.10. Datos de curvas concentración respuesta de relajación por sildenafil, TOP 52 y TOP N53 realizadas con intervalos entre concentraciones de 7 y 30 minutos, en anillos de aorta de sin endotelio

L-NAME - RELAJACIÓN (% de FENILEFRINA)												
tiempo	7 minutos						30 minutos					
Fármaco	Sildenafil n=7		TOP 52 n=8		TOP N53 n=6		Sildenafil n=7		TOP 52 n=8		TOP N53 n=6	
log M	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m
-12	1,96	0,82	5,84	2,69	4,34	2,03	5,64	2,84	17,51	6,43	25,37	7,20
-11	9,96	3,61	21,09	7,50	24,12	7,84	19,50	7,43	33,54	10,58	41,07	10,69
-10	24,84	9,22	35,63	10,70	39,48	12,83	33,63	8,93	41,49	10,55	51,69	13,11
-9	36,76	9,59	42,57	10,60	53,05	15,37	40,58	9,23	50,19	11,14	64,37	13,20
-8	41,40	9,38	49,97	10,84	65,03	16,19	42,84	9,55	55,43	11,64	67,11	13,29
-7	43,11	9,63	56,67	11,48	68,11	16,27	44,85	9,25	59,34	11,64	70,46	13,51
-6	45,05	9,32	59,99	11,30	74,26	16,75	46,97	9,48	64,62	10,66	76,17	11,05

Tabla 4.11. Datos de curvas concentración respuesta de relajación por sildenafil, TOP 52 y TOP N53 realizadas con intervalos entre concentraciones de 7 y 30 minutos, en anillos de aorta de rata incubados L-NAME (100 µM).

GLUCOSA 25 mM - RELAJACIÓN (% de FENILEFRINA)												
tiempo	7 minutos						30 minutos					
Fármaco	Sildenafil n=10		TOP 52 n=8		TOP N53 n=9		Sildenafil n=10		TOP 52 n=8		TOP N53 n=9	
log M	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m	media	s.e.m
-12	1,96	1,25	1,24	0,61	2,71	1,68	9,21	4,47	2,64	1,12	15,39	5,65
-11	11,34	4,52	11,27	2,94	16,70	7,06	23,89	6,68	21,00	5,25	32,79	9,42
-10	26,29	6,73	25,93	6,72	31,14	10,36	36,87	7,74	35,16	10,29	54,23	11,56
-9	37,39	7,65	36,51	10,45	50,30	12,12	40,94	7,46	45,08	10,68	59,30	11,73
-8	41,59	7,47	47,85	10,64	58,37	12,53	44,45	7,64	51,09	11,56	63,19	11,70
-7	43,50	7,33	52,74	11,39	61,30	12,26	45,88	7,48	54,42	12,11	68,37	11,58
-6	47,16	7,18	55,57	12,01	66,63	11,64	48,68	6,98	67,04	12,00	74,99	10,69

Tabla 4.12. Datos de curvas concentración respuesta de relajación por sildenafil, TOP 52 y TOP N53 realizadas con intervalos entre concentraciones de 7 y 30 minutos, en anillos de aorta de rata en presencia de glucosa alta (25 mM).

5. Discusión

5.1 Diabetes y daño vascular

Las complicaciones vasculares son las principales causas de mortalidad de los diabéticos. Los mecanismos implicados en la patogenia de las alteraciones vasculares se conocen de forma incompleta; sin embargo, se sabe que la hiperglucemia, característica clave de la diabetes, exacerba las complicaciones macrovasculares (isquemia cardíaca, enfermedad cerebrovascular o insuficiencia vascular periférica)¹⁸³, y constituye el mecanismo principal en el desarrollo de las complicaciones microvasculares como ceguera (retinopatía), enfermedad renal terminal, miocardiopatía diabética, neuropatía periférica y pie diabético¹⁸⁴.

El mecanismo principal a través del cual la hiperglucemia causa o agrava el daño microvascular y macrovascular, es la formación de ROS intracelulares, originando como consecuencia una disfunción endotelial^{185,186} y un incremento en la apoptosis de células endoteliales¹⁸⁷. Por otra parte, las ROS juegan un importante papel en la angiogénesis¹⁸⁸, funcionando como molécula clave en la señalización de la migración celular, proliferación y expresión génica¹⁸⁹, además se ha correlacionado el incremento en ROS con la expresión de VEGF y la angiogénesis.¹⁹⁰ La consecuencia principal de estos mecanismos inflamatorios y del deterioro endotelial es la disminución en la formación de NO.

Actualmente, se han señalado efectos beneficiosos frente a la disfunción endotelial de diversas terapéuticas frente a enfermedades cardiovasculares¹⁹¹, encontrando así medidas higiénico-dietéticas como control de la dieta, reducción de peso corporal, ejercicio físico y cese en el hábito tabáquico, y también algunos tratamientos farmacológicos como IECA y estatinas¹⁹², antagonistas beta-adrenérgicos como nebivolol¹⁹³, antagonistas del calcio¹⁹³, antagonista de la endotelina-1, estrógenos y también fármacos antidiabéticos¹⁹⁴.

Se ha sugerido que la inhibición de la fosfodiesterasa 5 y que la vía GMPc-PKG puede ejercer un efecto protector en las complicaciones microvasculares asociadas a la diabetes^{195,196}. Las concentraciones de GMPc vienen determinadas por el balance entre su formación por la guanilil ciclasa (estimulada por óxido nítrico) y su degradación por las fosfodiesterasas. La exposición de la GC a estados de oxidación (por ej.: ROS) conlleva una reducción en la producción de GMPc y por tanto, una reducción en la actividad de la cinasa dependiente del GMPc (PKG). Pero, quizás lo más determinante en la microangiopatía diabética es que la formación de NO está disminuida, y en

consecuencia haya una disminución en la formación de GMPc, lo cual conduce a una eficacia limitada de los inhibidores de fosfodiesterasa 5.

El presente trabajo explora por primera vez la posibilidad de mejorar la disfunción endotelial inducida por concentraciones elevadas de glucosa, potenciando los efectos de inhibición de la fosfodiesterasa 5, utilizando fármacos híbridos inhibidores de PDE5 y dadores de NO, que suplan la carencia patológica de NO. Con tal finalidad, y conjuntamente con laboratorios TOPADUR se han seleccionado dos moléculas en desarrollo preclínico^{197,37}. La primera molécula seleccionada fue el TOP N53 con una doble actividad funcional (molécula híbrida de éster de nitrato orgánico/inhibidor de PDE5). El TOP N53 se diseñó para transformarse en NO y en un metabolito activo denominado TOP 52, en un proceso llamado “bioactivación” y descrito por Daiber y Maibel¹⁹⁸ para nitratos orgánicos ya comercializados. El TOP 52, fue la segunda molécula seleccionada, para realizar el estudio. Laboratorios TOPADUR enfoca el estudio hacia la búsqueda de fármacos, que aplicados de forma tópica sean capaces de mejorar la microcirculación en pacientes diabéticos con pie diabético, donde existe una disfunción endotelial con reducción en la formación de NO. Ambas moléculas son inhibidores de PDE5 potentes, si bien el metabolito TOP 52 fue 12 veces más potente que TOP N53 (IC₅₀ de 0,185 nM de TOP 52, frente a 2,24 nM de TOP N53). El efecto de ambas moléculas se comparó con un inhibidor de PDE5 de referencia, ya comercializado, que fue el sildenafil (IC₅₀ = 8,82 nM). De esta forma, el diseño del trabajo nos permitía analizar los efectos de la inhibición de PDE5 en presencia o ausencia de NO liberado.

5.2 Estudio de la angiogénesis en células microvasculares dérmicas humanas de diabéticos.

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos debido a la proliferación de células endoteliales. La angiogénesis tiene un papel importante en eventos fisiológicos y patológicos, entre los que destaca la cicatrización de heridas y como mecanismos de protección frente a procesos isquémicos.^{199,200,201} La alteración de la angiogénesis puede contribuir a retrasar la cicatrización de las heridas cutáneas en diabéticos.^{202,203,204} Por ello, consideramos de interés estudiar si los fármacos investigados podían mejorar los marcadores de angiogénesis en células endoteliales

microvasculares humanas de diabéticos cultivadas *in vitro* y expuestas a niveles altos de glucosa.

Se sabe que la proliferación de células endoteliales es el primer paso para la generación de nuevos vasos, así como que dentro del proceso de angiogénesis las células endoteliales son estimuladas para degradar la membrana basal y migrar en el estroma perivascular en respuesta a un aumento en factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Dentro de los ensayos de angiogénesis *in vitro* destacan técnicas de estudio de células endoteliales en cultivo como la proliferación y la migración de células endoteliales, la determinación de VEGF, la formación de tubos *in vitro* con células incluidas en Matrigel, así como los niveles de apoptosis celular.^{205,206} En nuestro estudio, se constata una reducción de la migración y de la proliferación en células endoteliales microvasculares humanas de diabéticos expuestas a concentraciones elevadas de glucosa (30 mM). Asimismo, otros marcadores de la angiogénesis como la liberación de VEGF y la formación de tubos de células endoteliales microvasculares dérmicas obtenidas de pacientes diabéticos se ven reducidas en presencia de elevada concentración de glucosa. En línea con estos resultados descritos, en experimentos con 30 Mm de glucosa, la apoptosis se ve incrementada y, en consecuencia, el proceso de angiogénesis resulta dificultado, lo que se corresponde con lo descrito en la literatura científica²⁰⁷ Todos estos resultados conforman una batería de ensayos que nos permiten considerar una clara afectación del proceso de angiogénesis con la exposición a altas concentraciones de glucosa.

Se ha descrito que el óxido nítrico ejerce efectos quimiotácticos y quimiocinéticos. Ambos son promovidos por una activación de la guanilil ciclasa soluble.²⁰⁸ Por otra parte, se ha descrito una potenciación de la angiogénesis inducida por inhibidores de PDE5.¹⁷⁹ TOP N53 empleado en concentraciones entre 10 pM y 1 μ M invirtió de forma sostenida las alteraciones inducidas por la glucosa alta en los marcadores *in vitro* de angiogénesis. TOP N53 redujo la apoptosis, y mejoró la migración, la proliferación, la liberación de VEGF y la formación de tubos. Ahora bien, en estos ensayos, en general, TOP N53 no fue más eficaz que los inhibidores de PDE5 TOP 52 y sildenafil. Únicamente, cabría señalar, una acción bifásica de TOP 52 y sildenafil con una disminución de efecto a concentraciones más altas, mientras que en el caso de TOP N53, el efecto concentración dependiente se mostró continuado en todo el rango de concentraciones empleado.

Tomados en conjunto, estos estudios en cultivos de células endoteliales microvasculares dérmicas de pacientes diabéticos pueden proporcionar una evidencia inicial en apoyo de la hipótesis de que TOP N53, y los inhibidores PDE5 TOP 52 y sildenafil, podrían recuperar la angiogénesis comprometida por los niveles elevados de glucosa.

Se ha responsabilizado al estrés oxidativo aumentado en los diabéticos como causa de la reducción en la angiogénesis presente en el pie diabético. De hecho, en los experimentos in vitro que llevamos a cabo, la glucosa alta provocó un aumento de ROS. Aumento que se redujo de forma concentración dependiente por TOP N53, y también con TOP 52 y sildenafil, todos ellos con un nivel de eficacia similar.

Estas especies reactivas de oxígeno también se ha visto que estaban relacionadas con la disfunción endotelial que pasamos a a analizar a continuación.

5.3 Estudio de las vías de disfunción endotelial

Con la finalidad de estudiar la disfunción endotelial secundaria a niveles elevados de glucosa en células endoteliales microvasculares dérmicas de diabéticos y la posible inferencia en las vías de la disfunción endotelial, estudiamos el efecto de nuestros fármacos probados y de referencia sobre la expresión de GTP-ciclohidrolasa 1 (GTPCH1), los niveles de BH4, la expresión de dimetilarginina dimetilaminohidrolasa II (DDAH II) y eNOS, así como la actividad del óxido nítrico sintasa dependiente de Ca^{2+} .

GTPCH1 es una enzima que limita la velocidad en la síntesis BH4. BH4 es un cofactor crítico en la síntesis de NO y citrulina a partir de arginina por la sintasa de óxido nítrico endotelial dimérica. De hecho, la pérdida de BH4 implica el "desacoplamiento de eNOS", una condición en la que la enzima monomérica genera radicales superóxido en lugar de óxido nítrico. Las ROS, aumentadas en los vasos sanguíneos de diabéticos y en las células endoteliales microvasculares humanas tras la exposición a glucosa en concentraciones altas, explican la oxidación de BH4 en BH2 con la consecuencia del desacoplamiento de eNOS y la formación de ROS amplificada. DDAH II degrada la ADMA sintetizada por PMRT (proteína arginina metiltransferasas). ADMA es un inhibidor endógeno de eNOS que se encuentra elevado en diabéticos con DE. La glucosa 30 mM durante 6 horas redujo la expresión de GTPCHI, DDAHII y eNOS. Tales efectos reducirían los niveles de BH4,

aumentarían la ADMA, afectarían la eNOS y finalmente reducirían el NO. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores.^{209,210}

La preincubación con TOP N53, pero también con los inhibidores de la PDE5 TOP 52 y sildenafil (todos a 100 nM) restablecieron completamente los niveles de expresión de estas enzimas. TOP N53 pareció más eficaz que TOP 52 y sildenafil a este respecto y aumentó los niveles de expresión de estas enzimas por encima de la línea de base.

La glucosa alta redujo BH4 que fue revertido de manera concentración dependiente por TOP N53, TOP 52 y sildenafil. Específicamente, después de TOP N53 (y en menor medida con TOP 52), los niveles de BH4 subieron por encima de la línea basal. La pérdida de BH4 secundaria a glucosa alta podría explicarse por el rápido aumento ROS. La reducción de ROS por TOP N53 y los inhibidores de PDE5, así como sus efectos para rescatar de la alta pérdida inducida por glucosa en GTPCH1, pueden explicar el aumento de BH4 por estos compuestos.

La actividad eNOS medida a las 24 horas de glucosa 30 mM en presencia y ausencia de TOP N53, TOP 52 o sildenafil representa el criterio de valoración terminal compuesto por los efectos sobre al menos la expresión de eNOS, GTPCHI, niveles de BH4 y ROS. Teniendo en cuenta que TOP N53, TOP 52 y sildenafil rescataron de una alta disminución inducida por glucosa en la eNOS, la expresión de GTPCHI, así como el aumento de ROS, está en línea con las expectativas de que la glucosa 30 mM suprime la actividad endotelial de la NOS y esto se evita con los tres compuestos investigados. TOP N53 mostró una tendencia a ser el compuesto más eficaz a este respecto.

En conjunto, a partir de estos estudios in vitro, se puede postular que TOP N53 (y en un grado similar o algo menor los inhibidores de la PDE5) protegerían de una pérdida de NO derivado del endotelio microvascular dérmico causada por niveles altos de glucosa, un sello distintivo de la disfunción endotelial.

5.4 Efectos sobre GMPc en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas de diabéticos

Finalmente, se estudiaron los efectos de TOP N53, TOP 52 y sildenafil sobre el contenido de GMPc endotelial. La glucosa alta durante 60 minutos redujo el contenido de GMPc inicial en aproximadamente un tercio de la cifra inicial, con resultados similares

en otros trabajos referenciados en la literatura científica.²¹¹ TOP N53 de forma continuada y concentración-dependiente revirtió esta pérdida en GMPc. TOP N53 fue más eficaz que el inhibidor de la PDE5, sildenafilo. Curiosamente, TOP 52 resultó tener un efecto bifásico sobre GMPc con un aumento máximo a 1 nM (Figura 4.33). Tales efectos bifásicos de TOP 52 también se observaron en ROS, así como en migración, liberación y proliferación de VEGF.

El contenido reducido de GMPc después de un alto nivel de glucosa podría ser una consecuencia de una menor biodisponibilidad de óxido nítrico, quizás secundario al estrés oxidativo.²¹¹ También las ROS, abundantes en la vasculatura de la diabetes mellitus 2, pueden oxidar el Fe^{2+} en el hemo de la GC soluble a Fe^{3+} , lo que conlleva una pérdida de la sensibilidad del NO para activar la GC soluble y reducir la generación de GMPc. El aumento de GMPc por TOP N53 (y los inhibidores de PDE5) puede finalmente dar como resultado la mejora de los marcadores de angiogénesis así como la disfunción endotelial como se observó anteriormente.

5.5 Estudio de formación in vitro de células progenitoras endoteliales.

La disfunción endotelial en la diabetes inducida por la hiperglucemia y la resistencia a la insulina subraya la importancia de los mecanismos de reparación endotelial en la diabetes. Las células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea se han reconocido como el mecanismo endógeno implicado en la reparación endotelial y en la formación de nuevos vasos sanguíneos.^{212,213}

La incubación de células mononucleares de sangre periférica con TOP N53 y sildenafilo incrementó la formación in vitro de células progenitoras endoteliales, si bien TOP 52 indujo un incremento que no llegó a ser significativo. Ante la necesidad de encontrar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la angiogénesis terapéutica en la diabetes²¹², parece que los resultados obtenidos apoyarían también en este sentido la posible utilización de estos fármacos en las complicaciones microvasculares de la diabetes.

5.6 Estudio funcional en aorta de rata aislada

Por último, exploramos los efectos funcionales de estos fármacos sobre aorta de rata aislada. Con el fin de explorar adecuadamente los efectos relajantes de los preparados arteriales, procedimos a inducir una meseta de contracción de los anillos de aorta con FE. Los experimentos se realizaron en cuatro grupos experimentales en los que las diferentes condiciones experimentales nos permitirían dilucidar el papel del endotelio vascular en las respuestas a los fármacos. Estos cuatro grupos básicos fueron: un primer grupo de anillos arteriales con endotelio intacto y una respuesta a la ACh con una relajación de al menos el 60% de la meseta de contracción, el segundo grupo eran anillos arteriales a los que se les había desprovisto mecánicamente del endotelio, el tercer y cuarto grupos se realizaron en presencia de L-NAME y Glucosa (25 mM), respectivamente.

Todos los fármacos estudiados indujeron relajaciones concentración dependiente en los preparados aislados de aorta de rata con endotelio intacto precontraídos con FE. Cabe destacar que, en estas condiciones con funcionalidad plena del endotelio, el orden de mayor a menor potencia en su efecto relajante se corresponde con el orden de potencia mostrado como inhibidores de PDE5 en experimentos de ensayo enzimático realizados en laboratorios TOPADUR (ver apartado *Introducción*). Así, TOP 52 fue el más potente, seguido de TOP N53 y finalmente sildenafil. Si bien, en esta comparación surge un hallazgo interesante, y es que si en el ensayo enzimático TOP 52 ($IC_{50}=0,185$ nM) presentaba una potencia unas 12 veces superior a TOP N53 ($IC_{50}=2,24$ nM), y una potencia 48 veces superior a sildenafil ($IC_{50}=8,82$ nM); en los experimentos funcionales encontramos que las concentraciones que indujeron el 40% de relajación fueron 4 pM para TOP 52, 8 pM para TOP N53 y 194 nM para sildenafil, poniendo de manifiesto que TOP N53 incremento en términos relativos su potencia en comparación con TOP 52 y de sildenafil, mientras se mantenía la relación entre TOP 52 y sildenafil. A partir de estos hallazgos nos planteamos la idea de que, en estas condiciones experimentales, una parte del TOP N53 puede convertirse en el inhibidor PDE5 más potente TOP 52, su metabolito activo. La otra parte de la molécula de TOP N53 daría lugar a la liberación de NO.

Cuando las condiciones experimentales afectaban a la funcionalidad del endotelio, bien sea por eliminación mecánica de este o bien por incubación con el inhibidor de la NO sintasa L-NAME, se revelan dos hallazgos de forma constante,; el primero es que hay

una pérdida manifiesta del poder relajante de los fármacos estudiados, sobre todo de sildenafil y TOP 52, lo cual coincide con hallazgos de otros autores²¹⁴, y el segundo es que el orden de potencia y eficacia de los fármacos se altera de forma que el fármaco más potente y más eficaz es ahora el TOP N53, que aunque relaja menos que en anillos con endotelio intacto, sí recupera parcialmente la pérdida de la relajación que han sufrido TOP 52 y sildenafil. Las concentraciones necesarias para alcanzar el 40% de relajación se extrapolaron por regresión no lineal a 7,5 nM para la molécula híbrida TOP N53 en comparación con >100 nM para TOP 52 y >1000 nM para sildenafil. Estos hallazgos podrían explicarse por la “bioactivación” de TOP N53 liberando NO, que potencialmente reemplaza la merma en la formación de óxido nítrico en células endoteliales.

Estas últimas observaciones se reproducen también cuando los anillos aórticos de rata se expusieron previamente a una elevada concentración de glucosa (25 mM). La glucosa alta eleva el estrés oxidativo en las células endoteliales y altera la generación de óxido nítrico endotelial.^{215,216} Esto puede considerarse como un modelo celular de disfunción endotelial en la diabetes. De hecho, la relajación de los inhibidores de la PDE5 (TOP 52, sildenafil) se vio muy afectada en comparación con el endotelio funcionalmente intacto. En este modelo de órgano de disfunción endotelial inducida por alta glucosa, la molécula de éster de nitrato orgánico / inhibidor de PDE5 TOP N53 fue superior a TOP 52 y sildenafil, que inhibían exclusivamente la PDE5.

En presencia de glucosa alta (25 mM) las concentraciones necesarias para alcanzar el 40% de relajación fueron 0,66 nM para TOP N53 en comparación con 89,3 nM para TOP 52 y 863 nM para sildenafil, o dicho de otra forma, se obtuvo un resultado similar con concentraciones 135 y 1308 veces menores de TOP N53, que de TOP 52 y sildenafil, respectivamente.

De igual forma, si examinamos la desviación a la derecha de las curvas de relajación observamos un aumento de la IC₄₀ de 82 veces para TOP N53, frente a un incremento de 22325 veces para TOP 52.

Para poner de manifiesto la pérdida de efecto debida al deterioro de la función endotelial, analizamos los resultados de los tres fármacos realizando un ratio entre relajaciones obtenidas en preparados con endotelio intacto y aquellas obtenidas en condiciones experimentales de ausencia/disfunción endotelial. Constatamos que para TOP 52 y sildenafil, se obtiene unos cocientes similares, mientras que para TOP N53 la merma en el efecto relajante es menor en todo el rango de concentraciones, pero sobre

todo en concentraciones inferiores a 10 nM, señalando claramente la diferencia debida a la liberación de NO, frente a la simple inhibición de PDE5.

Estos resultados sugieren con fuerza que la liberación de NO a partir de TOP N53 es fundamental en la recuperación de la efectividad de los inhibidores de PDE5 cuando el endotelio está deteriorado.

La ratificación de que esta parte del efecto del TOP N53 conservada, a diferencia de los inhibidores puros de PDE5, se debía a la liberación de NO, se obtuvo mediante el empleo de ODQ, un inhibidor de la GC soluble que, hipotéticamente, sería estimulada por el NO liberado por TOP N53. Los resultados validaron nuestra hipótesis ya que ODQ abolió completamente el efecto de TOP N53, haciendo desaparecer la diferencia con TOP 52 y sildenafil.

En conjunto, estos datos proporcionan una primera prueba de que TOP N53 mantiene parcialmente la eficacia en un modelo de órgano dependiente del endotelio en condiciones hiperglucémicas.

Las investigaciones sobre el efecto en el tiempo mostraron un inicio rápido y un máximo de relajación a los 60 minutos para TOP 52, y 90 minutos para sildenafil y TOP N53, el efecto se prolongaba sin cambios hasta al menos los 180 minutos que duraron los experimentos. Adicionalmente, se estudió el efecto de los fármacos a los 7 y a los 30 minutos de añadir la concentración de cada dosis, obviamente el efecto era mayor a los 30 minutos que los 7 minutos; sin embargo, resulta significativo que la diferencia en el incremento de efecto entre dichos tiempos, es mayor para TOP N53 que para TOP 52 y sildenafil, sugiriendo que la liberación de NO in situ conlleva un tiempo, y que cuando transcurre este tiempo mínimo necesario se obtiene con TOP N53 una potenciación del efecto vasodilatador añadida a la mera inhibición de PDE5.

5.7 Consideraciones generales

Este estudio nos ha permitido explorar el efecto de inhibidores de PDE5 como mecanismo único o asociado a la liberación de NO, en modelos experimentales de disfunción endotelial inducida por concentraciones altas de glucosa demostrativos de las alteraciones vasculares que acontecen en la diabetes.

El presente trabajo, no está exento de limitaciones ya que los modelos experimentales, si bien son considerados muy valiosos, las pruebas *in vitro* realizadas en cultivos de células han de ser ratificadas posteriormente con modelos *in vivo*. En este sentido, la utilización del órgano aislado, aunque está lejos de cubrir la necesidad de los estudios *in vivo*, sí aporta cierta información adicional de la interacción de distintos tipos celulares, como pueden ser células endoteliales y de músculo liso vascular. La comparación de anillos de vasos sanguíneos con endotelio sano frente a anillos sin endotelio o bien con disfunción endotelial, nos ha permitido aproximarnos al previsible efecto de estos fármacos en pacientes con disfunción endotelial. Además, también nuestros resultados sugieren aspectos que pueden ser importantes en la terapéutica como la transformación en metabolitos activos más potentes y de la liberación de NO.

La combinación de inhibidores PDE5 con dadores de NO como los nitratos, supone un riesgo grave de efectos generales como hipotensión grave y mantenida. De hecho, esto es una contraindicación señalada en numerosos libros de texto. El TOP N53 es un fármaco diseñado para su administración local en el pie diabético. Así pues, en nuestro estudio, la clave radica en obtener un beneficio de esta asociación *in situ* en el punto de acción. Ciertas cuestiones, como el tiempo necesario para conseguir dicha liberación de NO así como un mejor efecto, son cuestiones a dilucidar en experimentos futuros. También se deben emprender nuevos experimentos, *a priori* en microvasos de pacientes diabéticos o con disfunción endotelial que muestren los efectos de TOP 53, y *a posteriori* ensayos clínicos en paciente diabéticos con patología establecida.

6. Conclusiones

1. La exposición a concentraciones elevadas de glucosa induce una alteración de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas que se manifiesta con una reducción de la angiogénesis y una disfunción endotelial.
2. Los inhibidores de PDE5 sildenafil y TOP 52, y la molécula híbrida TOP N53, con actividad inhibidora de PDE5 y dador de NO, inducen una recuperación similar de la angiogénesis y de las vías de disfunción endotelial comprometidas por la exposición a alta glucosa.
3. TOP N53, y en menor medida sildenafil inducen un aumento en la formación de células progenitoras endoteliales.
4. La incubación de preparados de aorta de rata a alta concentración de glucosa produce un deterioro de la capa endotelial con una marcada reducción de la relajación de los anillos aórticos en respuesta a la inhibición de PDE5.
5. TOP N53 presenta una menor reducción de su efecto relajante en anillos con el endotelio deteriorado. Dicho perfil de efecto más favorable es atribuible a la liberación de NO que estimula la guanilil ciclasa.
6. El estudio temporal del efecto de TOP N53 pone en evidencia que cuando transcurre el tiempo necesario para la liberación de NO se produce una potenciación de su efecto.

7. Bibliografía

1. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004. doi:10.1093/bja/ae163
2. Dyer LA, Patterson C. Development of the endothelium: An emphasis on heterogeneity. *Semin Thromb Hemost*. 2010. doi:10.1055/s-0030-1253446
3. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013. doi:10.7150/ijbs.7502
4. Van Hinsbergh VWM. The endothelium: vascular control of haemostasis. In: *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. ; 2001. doi:10.1016/S0301-2115(00)00490-5
5. Chim SM, Qin A, Tickner J, et al. EGFL6 promotes endothelial cell migration and angiogenesis through the activation of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem*. 2011. doi:10.1074/jbc.M110.187633
6. Slukvin II, Kumar A. The mesenchymoangioblast, mesodermal precursor for mesenchymal and endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*. 2018. doi:10.1007/s00018-018-2871-3
7. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J*. 1995. doi:10.1096/fasebj.9.10.7615161
8. Swiers G, Rode C, Azzoni E, De Bruijn MFTR. A short history of hemogenic endothelium. *Blood Cells, Mol Dis*. 2013. doi:10.1016/j.bcmd.2013.09.005
9. Marcelo KL, Goldie LC, Hirschi KK. Regulation of endothelial cell differentiation and specification. *Circ Res*. 2013. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300506
10. Epstein FH, Vane JR, Änggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990. doi:10.1056/NEJM199007053230106
11. Austin SK. Haemostasis. *Med (United Kingdom)*. 2017. doi:10.1016/j.mpmed.2017.01.013
12. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2015. doi:10.1186/s12872-015-0124-z
13. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006. doi:10.1007/3-540-32967-6-1
14. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium,

- and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2008. doi:10.1189/jlb.0607373
15. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med.* 1996. doi:10.1146/annurev.med.47.1.315
 16. Nguyen D, Coull BM. Thrombosis. In: *Primer on Cerebrovascular Diseases: Second Edition.* ; 2017. doi:10.1016/B978-0-12-803058-5.00021-7
 17. Dahlbäck B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett.* 2005. doi:10.1016/j.febslet.2005.03.001
 18. Van Hinsbergh VWM. Endothelium - Role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012. doi:10.1007/s00281-011-0285-5
 19. Nachman RL, Rafii S. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *N Engl J Med.* 2008. doi:10.1056/NEJMra0800887
 20. Massberg S, Brand K, Grüner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med.* 2002. doi:10.1084/jem.20012044
 21. Blann AD, Nadar SK, Lip GYH. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2003. doi:10.1016/j.ehj.2003.08.021
 22. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1977.
 23. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, et al. Endothelin. *Pharmacol Rev.* 2016. doi:10.1124/pr.115.011833
 24. Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2005. doi:10.1016/j.vph.2005.03.004
 25. Hussain M, Awan FR. Hypertension regulating angiotensin peptides in the pathobiology of cardiovascular disease. *Clin Exp Hypertens.* 2018. doi:10.1080/10641963.2017.1377218
 26. Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. Just the beginning: Novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Curr Biol.* 2002. doi:10.1016/S0960-9822(02)01255-1
 27. F. K. Some peculiar effects of NO-synthase inhibition on the structure and function of cardiovascular system. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011.

28. Hughes S, Yang H, Chan-Ling T. Vascularization of the human fetal retina: Roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2000.
29. Hartnett ME. Pathophysiology and mechanisms of severe retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*. 2015. doi:10.1016/j.ophtha.2014.07.050
30. Provis JM. Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res*. 2001. doi:10.1016/S1350-9462(01)00012-X
31. Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis*. 2007. doi:10.1007/s10456-007-9065-1
32. Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*. 2010. doi:10.1038/nature09002
33. Gavard J, Patel V, Gutkind JS. Angiopoietin-1 Prevents VEGF-Induced Endothelial Permeability by Sequestering Src through mDia. *Dev Cell*. 2008. doi:10.1016/j.devcel.2007.10.019
34. Hussain RM, Neiweem AE, Kansara V, Harris A, Ciulla TA. Tie-2/Angiopoietin pathway modulation as a therapeutic strategy for retinal disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019. doi:10.1080/13543784.2019.1667333
35. J.J. C, F.M. B, D.A. G. Don't just say no: Differential pathways and pharmacological responses to diverse nitric oxide donors. *Biochem Pharmacol*. 2018. doi:10.1016/j.bcp.2018.08.002 LK
<http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=18732968&id=doi:10.1016%2Fj.bcp.2018.08.002&atitle=Don%27t+just+say+no%3A+Differential+pathways+and+pharmacological+responses+to+diverse+nitric+oxide+donors&stitle=Bi+ochem.+Pharmacol.&title=Biochemical+Pharmacology&volume=156&issue=&page=1&epage=9&aulast=Chiesa&aufirst=Juan+J.&auinit=J.J.&aufull=Chiesa+J.J.&coden=BCPCA&isbn=&pages=1-9&date=2018&auinit1=J&auinitm=J>
36. Papapetropoulos A, Hobbs AJ, Topouzis S. Extending the translational potential of targeting NO/cGMP-regulated pathways in the CVS. *Br J Pharmacol*. 2015. doi:10.1111/bph.12980
37. Ben-Yehuda Greenwald M, Tacconi C, Jukic M, et al. A Dual-Acting Nitric Oxide Donor and Phosphodiesterase 5 Inhibitor Promotes Wound Healing in Normal Mice and Mice with Diabetes. *J Invest Dermatol*. 2020.

doi:10.1016/j.jid.2020.05.111

38. Yu X, Ge L, Niu L, Lian X, Ma H, Pang L. The dual role of inducible nitric oxide synthase in myocardial ischemia/reperfusion injury: Friend or foe? *Oxid Med Cell Longev*. 2018. doi:10.1155/2018/8364848
39. Förstermann U, Boissel J, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*. 1998. doi:10.1096/fasebj.12.10.773
40. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J*. 2012. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
41. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001. doi:10.1042/0264-6021:3570593
42. Serbina N V., Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. 2003. doi:10.1016/S1074-7613(03)00171-7
43. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*. 2004. doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.030
44. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res*. 1999. doi:10.1016/S0008-6363(99)00094-2
45. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018. doi:10.1016/j.vph.2017.05.005
46. Godo S, Shimokawa H. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2017. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.019
47. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859
48. Yusuke Takeda 1 KM 1, , Kensuke Sekiguchi 1, Yosuke Nagai 1 TY 1, Nishimura

- KU 2 and R. Endothelial Dysfunction in Diabetes. *Biomedicines*. 2020;8(182). doi:10.3390/biomedicines8070182
49. Sardu C, Gambardella J, Morelli MB, Wang X, Marfella R, Santulli G. Hypertension, Thrombosis, Kidney Failure, and Diabetes: Is COVID-19 an Endothelial Disease? A Comprehensive Evaluation of Clinical and Basic Evidence. *J Clin Med*. 2020. doi:10.3390/jcm9051417
 50. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020. doi:10.1056/NEJMoa2015432
 51. Sardu C, Gambardella J, Morelli MB, Wang X, Marfella R, Santulli G. Is COVID-19 an Endothelial Disease? Clinical and Basic Evidence. *Clin Basic Evid*. 2020. doi:10.20944/PREPRINTS202004.0204.V1
 52. Toda N, Nakanishi-Toda M. How mental stress affects endothelial function. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2011. doi:10.1007/s00424-011-1022-6
 53. Ait-Aissa K, Kadlec AO, Hockenberry J, Gutterman DD, Beyer AM. Telomerase reverse transcriptase protects against angiotensin ii-induced microvascular endothelial dysfunction. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2018. doi:10.1152/ajpheart.00472.2017
 54. Takenaka T, Kobori H, Miyazaki T, et al. Klotho protein supplementation reduces blood pressure and renal hypertrophy in db/db mice, a model of type 2 diabetes. *Acta Physiol*. 2019. doi:10.1111/apha.13190
 55. Salanova Villanueva L, Sánchez González C, Sánchez Tomero JA, Aguilera A, Ortega Junco E. Enfermedad óseo mineral relacionada con la enfermedad renal crónica: Klotho y FGF23; implicaciones cardiovasculares. *Nefrología*. 2016. doi:10.1016/j.nefro.2016.01.011
 56. Alejandro Guillermo A, Áñez Vermolen J, Andara C, Valmore Bermúdez P, Bermúdez Arias F. Mecanismos moleculares de la disfunción endotelial: de la síntesis a la acción del óxido nítrico. *Arch Venez Farmacol y Ter*. 2006.
 57. Do VQ, Park KH, Seo YS, et al. Inhalation exposure to cigarette smoke induces endothelial nitric oxide synthase uncoupling and enhances vascular collagen deposition in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 2020.

doi:10.1016/j.fct.2019.110988

58. Napoleão P, Freitas T, Saldanha C. Effect of oxidized LDL on erythrocyte nitric oxide metabolism. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016. doi:10.3233/CH-168025
59. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2005. doi:10.1038/labinvest.3700215
60. Tain YL, Hsu CN. Toxic dimethylarginines: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA). *Toxins (Basel).* 2017. doi:10.3390/toxins9030092
61. Tran CTL, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl.* 2003. doi:10.1016/S1567-5688(03)00032-1
62. Wetzel MD, Gao T, Stanley K, Cooper TK, Morris SM, Awad AS. Enhancing kidney DDAH-1 expression by adenovirus delivery reduces ADMA and ameliorates diabetic nephropathy. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2020. doi:10.1152/AJPRENAL.00518.2019
63. Kavurt S, Demirel N, Bas AY, Ulubas Isık D, Ozcan B, Aydemir O. Increased ADMA levels are associated with poor pulmonary outcome in preterm neonates. *J Matern Neonatal Med.* 2017. doi:10.1080/14767058.2016.1190332
64. Ozturk S, Karadag S, Yegen M, et al. The relationship of plasma ADMA levels with cardiac functions and metabolic parameters in peritoneal dialysis patients. *Clin Exp Nephrol.* 2013. doi:10.1007/s10157-012-0739-7
65. Zhang X, Ramírez CM, Aryal B, et al. Cav-1 (Caveolin-1) Deficiency Increases Autophagy in the Endothelium and Attenuates Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314291
66. Minshall RD, Sessa WC, Stan R V., Anderson RGW, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. In: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* ; 2003. doi:10.1152/ajplung.00242.2003
67. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996. doi:10.1074/jbc.271.37.22810

68. Harding IC, Mitra R, Mensah SA, Herman IM, Ebong EE. Pro-atherosclerotic disturbed flow disrupts caveolin-1 expression, localization, and function via glycocalyx degradation. *J Transl Med.* 2018. doi:10.1186/s12967-018-1721-2
69. Liu J, Fu Q, Jiang L, Wang Y, Yang Y. Clinical Value of Asymmetrical Dimethylarginine Detection in Patients with Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiol Res Pract.* 2019. doi:10.1155/2019/3741909
70. Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, et al. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002.
71. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, Testa S, Mallamaci F, Zoccali C. Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: A competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol.* 2005. doi:10.1681/ASN.2005010076
72. Kemény-Beke Á, Gesztelyi R, Bodnár N, et al. Increased production of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in ankylosing spondylitis: Association with other clinical and laboratory parameters. *Jt Bone Spine.* 2011. doi:10.1016/j.jbspin.2010.05.009
73. Di Franco M, Spinelli FR, Metere A, et al. Serum levels of asymmetric dimethylarginine and apelin as potential markers of vascular endothelial dysfunction in early rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 2012. doi:10.1155/2012/347268
74. Bilgiç Ö, Altınyazar HC, Baran H, Ünlü A. Serum homocysteine, asymmetric dimethyl arginine (ADMA) and other arginine–NO pathway metabolite levels in patients with psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2015. doi:10.1007/s00403-015-1553-3
75. Telen MJ. Cellular adhesion and the endothelium: E-selectin, L-selectin, and pan-selectin inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014. doi:10.1016/j.hoc.2013.11.010
76. Kasza M, Meleg J, Vardai J, et al. Plasma E-selectin levels can play a role in the development of diabetic retinopathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2017.

doi:10.1007/s00417-016-3411-1

77. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.395
78. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: Potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev.* 2006. doi:10.1016/j.tmr.2005.08.001
79. Tsimmerman G, Roguin A, Bachar A, Melamed E, Brenner B, Aharon A. Involvement of microparticles in diabetic vascular complications. *Thromb Haemost.* 2011. doi:10.1160/TH10-11-0712
80. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Anne AS. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost.* 2009. doi:10.1160/TH08-08-0521
81. Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, et al. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2010. doi:10.1160/TH10-02-0111
82. Baumgard LH, Hausman GJ, Sanz Fernandez M V. Insulin: Pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domest Anim Endocrinol.* 2016. doi:10.1016/j.domaniend.2015.07.001
83. Selivanova OM, Grishin SY, Glyakina A V., Sadgyan AS, Ushakova NI, Galzitskaya O V. Analysis of Insulin Analogs and the Strategy of Their Further Development. *Biochem.* 2018. doi:10.1134/S0006297918140122
84. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2015. doi:10.2337/dc15-S005
85. Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI insight.* 2017. doi:10.1172/jci.insight.93751
86. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. In: *The Lancet.* ; 2010. doi:10.1016/S0140-6736(09)62124-3
87. Lechner J, O'Leary OE, Stitt AW. The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Res.* 2017. doi:10.1016/j.visres.2017.04.003

88. Said G. Diabetic neuropathy - A review. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007. doi:10.1038/ncpneuro0504
89. Shavelson D, Steinberg J, Bakotic BW. The diabetic foot. In: *Principles of Diabetes Mellitus: Third Edition*. ; 2017. doi:10.1007/978-3-319-18741-9_25
90. Armstrong DG, Boulton AJM, Bus SA. Diabetic foot ulcers and their recurrence. *N Engl J Med*. 2017. doi:10.1056/NEJMra1615439
91. Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010. doi:10.1681/ASN.2010010010
92. SCHMIEDER RE, KANNENKERIL D, KARG M V., BOSCH A, HARAZNY JM, OTT C. Early Vascular Parameters in the Micro- and Macrocirculation in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2018. doi:10.2337/db18-424-p
93. Schmidt AM. Highlighting Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310221
94. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014. doi:10.1155/2014/943162
95. Dommermuth R, Ewing K. Metabolic Syndrome: Systems Thinking in Heart Disease. *Prim Care - Clin Off Pract*. 2018. doi:10.1016/j.pop.2017.10.003
96. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018. doi:10.1007/s11906-018-0812-z
97. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*. 2018. doi:10.1016/j.clindermatol.2017.09.004
98. Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome: Clinical and Policy Implications of the New Silent Killer. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2017. doi:10.1177/1074248416686187
99. Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ. Metabolic syndrome and insulin resistance: Underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol*. 2013. doi:10.1002/cphy.c110062
100. Hurtado-Roca Y, Bueno H, Fernandez-Ortiz A, et al. Oxidized LDL is associated with metabolic syndrome traits independently of central obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2017. doi:10.2337/db16-0933

101. Artunc F, Schleicher E, Weigert C, Fritsche A, Stefan N, Häring HU. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nat Rev Nephrol.* 2016. doi:10.1038/nrneph.2016.145
102. Patel TP, Rawal K, Bagchi AK, et al. Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Fail Rev.* 2016. doi:10.1007/s10741-015-9515-6
103. Posner BI. Insulin Signalling: The Inside Story. *Can J Diabetes.* 2017. doi:10.1016/j.cjcd.2016.07.002
104. Li J, Wu F, Zhang H, et al. Insulin inhibits leukocyte-endothelium adherence via an Akt-NO-dependent mechanism in myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2009. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.07.010
105. Huang W, Ding X, Ye H, Wang J, Shao J, Huang T. Hypoxia enhances the migration and invasion of human glioblastoma U87 cells through PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway. *Neuroreport.* 2018. doi:10.1097/WNR.0000000000001156
106. Jiang Y, Zeng Y, Huang X, et al. Nur77 attenuates endothelin-1 expression via downregulation of NF- κ b and p38 MAPK in A549 cells and in an ARDS rat model. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2016. doi:10.1152/ajplung.00043.2016
107. Paul S, Ali A, Katare R. Molecular complexities underlying the vascular complications of diabetes mellitus – A comprehensive review. *J Diabetes Complications.* 2020. doi:10.1016/j.jdiacomp.2020.107613
108. Carling D. AMPK signalling in health and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2017. doi:10.1016/j.ceb.2017.01.005
109. Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol.* 2016. doi:10.1016/j.tcb.2015.10.013
110. Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J.* 2016. doi:10.1042/bcj20160005
111. Yuan J, Zhang S, Zhang Y. Nrfl is paved as a new strategic avenue to prevent and treat cancer, neurodegenerative and other diseases. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018. doi:10.1016/j.taap.2018.09.037

112. Widenmaier SB, Snyder NA, Nguyen TB, et al. NRF1 Is an ER Membrane Sensor that Is Central to Cholesterol Homeostasis. *Cell*. 2017. doi:10.1016/j.cell.2017.10.003
113. Chen C, Kassan A, Castañeda D, Gabani M, Choi SK, Kassan M. Metformin prevents vascular damage in hypertension through the AMPK/ER stress pathway. *Hypertens Res*. 2019. doi:10.1038/s41440-019-0212-z
114. Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and cardiovascular diseases. *Nutrients*. 2016. doi:10.3390/nu8050250
115. Franco A, Kitsis RN, Fleischer JA, et al. Correcting mitochondrial fusion by manipulating mitofusin conformations. *Nature*. 2016. doi:10.1038/nature20156
116. Chandhok G, Lazarou M, Neumann B. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. *Biol Rev*. 2018. doi:10.1111/brv.12378
117. Liu X, Tan H, Liu X, Wu Q. Correlation between the expression of Drp1 in vascular endothelial cells and inflammatory factors in hypertension rats. *Exp Ther Med*. 2018. doi:10.3892/etm.2018.5899
118. Forrester SJ, Preston KJ, Cooper HA, et al. Mitochondrial fission mediates endothelial inflammation. *Hypertension*. 2020. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14686
119. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2016. doi:10.1007/s00018-015-2052-6
120. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*. 2002. doi:10.1093/embo-reports/kvf202
121. Chen S, Novick P, Ferro-Novick S. ER structure and function. *Curr Opin Cell Biol*. 2013. doi:10.1016/j.ceb.2013.02.006
122. Lee W, Yoo W, Chae H. ER Stress and Autophagy. *Curr Mol Med*. 2015. doi:10.2174/1566524015666150921105453
123. Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J*. 2016. doi:10.1111/febs.13598
124. Lou J, Huang L, Wang A, et al. Resistin-induced endoplasmic reticulum stress

- contributes to the impairment of insulin signaling in endothelium. *Front Pharmacol.* 2018. doi:10.3389/fphar.2018.01226
125. Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res.* 2001. doi:10.1161/hh2001.098351
 126. Zou MH, Cohen RA, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothel J Endothel Cell Res.* 2004. doi:10.1080/10623320490482619
 127. Miao L, St. Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018
 128. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002. doi:10.1016/S0891-5849(02)00905-X
 129. Arnér ESJ, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 2000. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x
 130. Espinosa B, Arnér ESJ. Thioredoxin-related protein of 14 kDa as a modulator of redox signalling pathways. *Br J Pharmacol.* 2019. doi:10.1111/bph.14479
 131. Haneklaus M, O'Neill LAJ, Coll RC. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: Recent developments. *Curr Opin Immunol.* 2013. doi:10.1016/j.coi.2012.12.004
 132. Chong CR, Chan WP in. A, Nguyen TH, et al. Thioredoxin-interacting protein: pathophysiology and emerging pharmacotherapeutics in cardiovascular disease and diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2014. doi:10.1007/s10557-014-6538-5
 133. Wondafrash DZ, Nire'a AT, Tafere GG, Desta DM, Berhe DA, Zewdie KA. Thioredoxin-interacting protein as a novel potential therapeutic target in diabetes mellitus and its underlying complications. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2020. doi:10.2147/DMSO.S232221
 134. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, et al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J Am Coll Nutr.* 2003. doi:10.1080/07315724.2003.10719272

135. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011. doi:10.1210/jc.2011-0385
136. Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr.* 2007. doi:10.1093/jn/137.10.2171
137. Al-Khudairy L, Flowers N, Wheelhouse R, et al. Vitamin C supplementation for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017. doi:10.1002/14651858.CD011114.pub2
138. Daiber A, Steven S, Weber A, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2017. doi:10.1111/bph.13517
139. Moreira DM, da Silva RL, Vieira JL, Fattah T, Lueneberg ME, Gottschall CAM. Role of Vascular Inflammation in Coronary Artery Disease: Potential of Anti-inflammatory Drugs in the Prevention of Atherothrombosis: Inflammation and Anti-Inflammatory Drugs in Coronary Artery Disease. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2015. doi:10.1007/s40256-014-0094-z
140. Hansson GK, Robertson AKL, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol.* 2006. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100100
141. Martinez BK, White CM. The Emerging Role of Inflammation in Cardiovascular Disease. *Ann Pharmacother.* 2018. doi:10.1177/1060028018765939
142. Steen DL, Umez-Eronini AA, Guo J, Khan N, Cannon CP. The effect of fasting status on lipids, lipoproteins, and inflammatory biomarkers assessed after hospitalization for an acute coronary syndrome: Insights from PROVE IT–TIMI 22. *Clin Cardiol.* 2018. doi:10.1002/clc.22851
143. Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, et al. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension.* 2011. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163576
144. Savoia C, Schiffrin EL. Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006. doi:10.1097/01.mnh.0000203189.57513.76
145. Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res Int.* 2014. doi:10.1155/2014/406960

146. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med.* 2017. doi:10.1056/NEJMoa1707914
147. McCarty S, Frishman W. Interleukin 1 β : A proinflammatory target for preventing atherosclerotic heart disease. *Cardiol Rev.* 2014. doi:10.1097/CRD.0000000000000022
148. Thompson PL, Mark Nidorf S. Anti-inflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease: Lessons from the CANTOS trial. *J Thorac Dis.* 2018. doi:10.21037/jtd.2018.01.119
149. Vélez JL, Montalvo M, Aguayo S, et al. Glicocálix endotelial: relevancia clínica y enfoque traslacional. *Horiz Médico.* 2019. doi:10.24265/horizmed.2019.v19n4.12
150. Triggle CR, Ding H, Anderson TJ, Pannirselvam M. The endothelium in health and disease: A discussion of the contribution of non-nitric oxide endothelium-derived vasoactive mediators to vascular homeostasis in normal vessels and in type II diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2004. doi:10.1023/B:MCBI.0000041845.62061.c9
151. Yuyun MF, Ng LL, Ng GA. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? *Microvasc Res.* 2018. doi:10.1016/j.mvr.2018.03.012
152. Velagic A, Qin C, Woodman OL, Horowitz JD, Ritchie RH, Kemp-Harper BK. Nitroxyl: A Novel Strategy to Circumvent Diabetes Associated Impairments in Nitric Oxide Signaling. *Front Pharmacol.* 2020. doi:10.3389/fphar.2020.00727
153. Mather KJ. The vascular endothelium in diabetes - A therapeutic target? *Rev Endocr Metab Disord.* 2013. doi:10.1007/s11154-013-9237-9
154. Ruszkowski P, Masajtis-Zagajewska A, Nowicki M. Effects of combined statin and ACE inhibitor therapy on endothelial function and blood pressure in essential hypertension - a randomised double-blind, placebo controlled crossover study. *JRAAS - J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2019. doi:10.1177/1470320319868890
155. NCT02525081. Effect of ACE-Inhibition on Microvascular Function in Women With Assessed Microvascular Dysfunction.

- <https://clinicaltrials.gov/show/NCT02525081>. 2015.
156. Fox KM, Bertrand M, Ferrari R, et al. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: Randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet*. 2003. doi:10.1016/S0140-6736(03)14286-9
 157. Yusuf S. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2000. doi:10.1056/NEJM200001203420301
 158. Willoughby SR, Rajendran S, Chan WP, et al. Ramipril sensitizes platelets to nitric oxide: Implications for therapy in high-risk patients. *J Am Coll Cardiol*. 2012. doi:10.1016/j.jacc.2012.01.066
 159. Li M, Losordo DW. Statins and the endothelium. *Vascul Pharmacol*. 2007. doi:10.1016/j.vph.2006.06.012
 160. Stancu C, Sima A. Statins: Mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*. 2001. doi:10.1111/j.1582-4934.2001.tb00172.x
 161. Farnier M. Update on the clinical utility of fenofibrate in mixed dyslipidemias: Mechanisms of action and rational prescribing. *Vasc Health Risk Manag*. 2008. doi:10.2147/vhrm.s3390
 162. Xu N, Wang Q, Jiang S, et al. Fenofibrate improves vascular endothelial function and contractility in diabetic mice. *Redox Biol*. 2019. doi:10.1016/j.redox.2018.09.024
 163. Tian XY, Wong WT, Wang N, et al. PPAR δ activation protects endothelial function in diabetic mice. *Diabetes*. 2012. doi:10.2337/db12-0117
 164. Harmer JA, Keech AC, Veillard AS, et al. Fenofibrate effects on arterial endothelial function in adults with type 2 diabetes mellitus: A FIELD substudy. *Atherosclerosis*. 2015. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.038
 165. Ghani RA, Yaakob I Bin, Wahab NA, et al. The influence of fenofibrate on lipid profile, endothelial dysfunction, and inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus patients with typical and mixed dyslipidemia. *J Clin Lipidol*. 2013. doi:10.1016/j.jacl.2013.04.004

166. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol*. 2006. doi:10.1038/sj.bjp.0706495
167. Vardi M, Nini A. Phosphodiesterase inhibitors for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007. doi:10.1002/14651858.CD002187.pub3
168. Shamloul R, Ghanem H. Erectile dysfunction. *Lancet*. 2013. doi:10.1016/S0140-6736(12)60520-0
169. Barnes H, Brown Z, Burns A, Williams T. Phosphodiesterase 5 inhibitors for pulmonary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019. doi:10.1002/14651858.CD012621.pub2
170. Fan Chung K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol*. 2006. doi:10.1016/j.ejphar.2005.12.059
171. Schwartz BG, Jackson G, Stecher VJ, Campoli-Richards DM, Kloner RA. Phosphodiesterase type 5 inhibitors improve endothelial function and may benefit cardiovascular conditions. *Am J Med*. 2013. doi:10.1016/j.amjmed.2012.08.015
172. Savai R, Pullamsetti SS, Banat GA, et al. Targeting cancer with phosphodiesterase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010. doi:10.1517/13543780903485642
173. Menniti FS, Faraci WS, Schmidt CJ. Phosphodiesterases in the CNS: Targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2006. doi:10.1038/nrd2058
174. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem*. 2012. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.05.034
175. Das A, Durrant D, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. *Pharmacol Ther*. 2015. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.10.003
176. Ribaud G, Angelo Pagano M, Bova S, Zagotto G. New Therapeutic Applications of Phosphodiesterase 5 Inhibitors (PDE5-Is). *Curr Med Chem*. 2016. doi:10.2174/0929867323666160428110059
177. Gilles Carpentier. Contribution: Angiogenesis Analyzer. *ImageJ News*. 2012.
178. DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, et al. Endothelial cell tube

- formation assay for the in vitro study of angiogenesis. *J Vis Exp*. 2014. doi:10.3791/51312
179. Sahara M, Sata M, Morita T, Nakajima T, Hirata Y, Nagai R. A phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil enhances angiogenesis through a protein kinase g-dependent hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010. doi:10.1161/ATVBAHA.109.201327
 180. Komasa N, Lugnier C, Stoclet J -C. Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol*. 1991. doi:10.1111/j.1476-5381.1991.tb12457.x
 181. Klein T, Eltze M, Grebe T, Hatzelmann A, Kömhoff M. Celecoxib dilates guinea-pig coronaries and rat aortic rings and amplifies NO/cGMP signaling by PDE5 inhibition. *Cardiovasc Res*. 2007. doi:10.1016/j.cardiores.2007.02.026
 182. Dhar I, Dhar A, Wu L, Desai KM. Arginine attenuates methylglyoxal- and high glucose-induced endothelial dysfunction and oxidative stress by an endothelial nitric-oxide synthase-independent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012. doi:10.1124/jpet.112.192112
 183. Madonna R, Pieragostino D, Balistreri CR, et al. Diabetic macroangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches with focus on high glucose-mediated vascular damage. *Vascul Pharmacol*. 2018. doi:10.1016/j.vph.2018.01.009
 184. Madonna R, Balistreri CR, Geng YJ, De Caterina R. Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. *Vascul Pharmacol*. 2017. doi:10.1016/j.vph.2017.01.004
 185. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545
 186. Meza CA, La Favor JD, Kim DH, Hickner RC. Endothelial dysfunction: Is there a hyperglycemia-induced imbalance of NOX and NOS? *Int J Mol Sci*. 2019. doi:10.3390/ijms20153775
 187. Peng C, Ma J, Gao X, Tian P, Li W, Zhang L. High glucose induced oxidative stress and apoptosis in cardiac microvascular endothelial cells are regulated by FoxO3a. *PLoS One*. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0079739

188. Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling. Role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem.* 2004. doi:10.1023/B:MCBI.0000044378.09409.b5
189. Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE.* 2006. doi:10.1126/stke.3492006re8
190. Lelkes PI, Hahn KL, Sukovich DA, Karmioli S, Schmidt DH. On the possible role of reactive oxygen species in angiogenesis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* ; 1998. doi:10.1007/978-1-4615-4863-8_35
191. Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol.* 2015. doi:10.4330/wjc.v7.i11.719
192. Hirata Y, Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Suzuki JI, Nagai R. Diagnosis and treatment of endothelial dysfunction in cardiovascular disease: A review. *Int Heart J.* 2010. doi:10.1536/ihj.51.1
193. Matsuzawa Y, Guddeti RR, Kwon TG, Lerman LO, Lerman A. Treating coronary disease and the impact of endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis.* 2015. doi:10.1016/j.pcad.2014.10.004
194. Park KH, Park WJ. Endothelial dysfunction: Clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. *J Korean Med Sci.* 2015. doi:10.3346/jkms.2015.30.9.1213
195. Asal NJ, Wojciak KA. Effect of cilostazol in treating diabetes-associated microvascular complications. *Endocrine.* 2017. doi:10.1007/s12020-017-1279-4
196. Olivares-González L, De La Cámara CMF, Hervás D, et al. CGMP-phosphodiesterase inhibition prevents hypoxia-induced cell death activation in porcine retinal explants. *PLoS One.* 2016. doi:10.1371/journal.pone.0166717
197. Naef R, Tenor H. 2-PHENYL-3, 4-DIHYDROPYRROLO [2, 1-F][1, 2, 4] TRIAZINONE DERIVATIVES AS PHOSPHODIESTERASE INHIBITORS AND USES THEREOF. *US Pat App 16/774,333.* 2020.
198. Daiber A, Münzel T. Organic nitrate therapy, nitrate tolerance, and nitrate-induced endothelial dysfunction: Emphasis on redox biology and oxidative stress. *Antioxidants Redox Signal.* 2015. doi:10.1089/ars.2015.6376

199. Bohl Masters KS, Leibovich SJ, Belem P, West JL, Poole-Warren LA. Effects of nitric oxide releasing poly(vinyl alcohol) hydrogel dressings on dermal wound healing in diabetic mice. *Wound Repair Regen.* 2002. doi:10.1046/j.1524-475X.2002.10503.x
200. Weller R, Finnen MJ. The effects of topical treatment with acidified nitrite on wound healing in normal and diabetic mice. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2006. doi:10.1016/j.niox.2006.04.002
201. Witte MB, Kiyama T, Barbul A. Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes. *Br J Surg.* 2002. doi:10.1046/j.1365-2168.2002.02263.x
202. Lee PC, Salyapongse AN, Bragdon GA, et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 1999. doi:10.1152/ajpheart.1999.277.4.h1600
203. Lizarbe TR, García-Rama C, Tarín C, et al. Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair. *FASEB J.* 2008. doi:10.1096/fj.07-103804
204. Yamasaki K, Edington HDJ, McClosky C, et al. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest.* 1998. doi:10.1172/JCI2067
205. Tahergorabi Z, Khazaei M. A review on angiogenesis and its assays. *Iran J Basic Med Sci.* 2012. doi:10.22038/ijbms.2012.4929
206. Staton CA, Reed MWR, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol.* 2009. doi:10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x
207. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: Effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int J Vasc Med.* 2012. doi:10.1155/2012/918267
208. Isenberg JS, Ridnour LA, Perruccio EM, Espey MG, Wink DA, Roberts DD. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. doi:10.1073/pnas.0502977102
209. Ding Q, Hayashi T, Packiasamy AJ, et al. The effect of high glucose on NO and O₂⁻ through endothelial GTPCH1 and NADPH oxidase. *Life Sci.* 2004.

doi:10.1016/j.lfs.2004.06.005

210. Liu XJ, Zhang ZD, Ma XC. High glucose enhances LPS-stimulated human PMVEC hyperpermeability via the NO pathway. *Exp Ther Med*. 2013. doi:10.3892/etm.2013.1166
211. Karbach S, Jansen T, Horke S, et al. Hyperglycemia and oxidative stress in cultured endothelial cells - A comparison of primary endothelial cells with an immortalized endothelial cell line. *J Diabetes Complications*. 2012. doi:10.1016/j.jdiacomp.2012.03.011
212. Hu L, Dai S-C, Luan X, Chen J, Cannavicci A. Dysfunction and Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cells in Diabetes Mellitus. *J Clin Med Res*. 2018. doi:10.14740/jocmr3581w
213. Miller-Kasprzak E, Jagodziński PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007. doi:10.1007/s00005-007-0027-5
214. Teixeira CE, Priviero FBM, Webb RC. Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006. doi:10.1124/jpet.105.092544
215. Szabo C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction: REVIEW. *Br J Pharmacol*. 2009. doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00086.x
216. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010. doi:10.1007/s11154-010-9134-4

8. Anexos



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2016/VSC/PEA/00139

Vista la solicitud realizada en fecha **22/06/16** con nº reg. entrada **24953** por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES462500001003**, para realizar el procedimiento:

“TOP-N53 on relaxation of isolated rat aorta”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Ganadería y Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2016/VSC/PEA/00139** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Julio Cortijo Gimeno**

Establecimiento: **Animalario Facultad de Medicina-Campus Blasco Ibáñez**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 22 de agosto de 2016

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca


Rogelio Llanes Ribas

APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Esta Comisión tras evaluar en su reunión de 25 de Mayo de 2016 el Proyecto de Investigación:

Título:	NEW PDEI DRUGS IN WOUNDS: PROFILING OF TOP-N53 AND TOP-N44 IN IN VITRO, ISOLATED ORGANS AND IN VIVO MODELS		
I.P.:	Julio Cortijo Gimeno	Servicio/Unidad	Unidad de docencia e investigación CHGUV

Acuerda respecto a esta documentación:

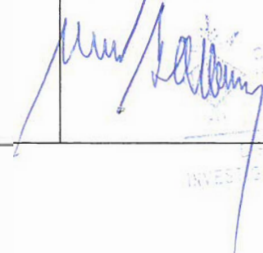
- Que cumple con los requisitos exigidos por esta Comisión para su realización, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

	Presente	Ausente	Disculpa
Vocales			
Dr. Jose vte Bagan Sebastian	X		
Dr. Carlos Camps Herrero			x
Dra. Goitzane Marcaida Benito	x		
Dr. Carlos Sánchez Juan	X		
Dña. Anna Martí Monros			x
Dr. Emilio López Alcina	x		
Dr. Rafael Paya Serrano	x		
Dr. Miguel Garcia del Toro	x		
Dr. Miguel Armengot Carceller	x		
Dr. Jose Luis Sanchez Carazo	x		
Dr. Francisco Ridocci Soriano	x		
Dra. Empar Lurbe Ferrer			x
Dª Amparo Muñoz Izquierdo			x
Dra. Amparo Esteban Reboll			x
Secretario			
Dra. Dolores Lopez Alarcón	x		

Lo que comunico a efectos oportunos a miércoles, 25 de mayo de 2016:

Fdo. Dr. Jose vte Bagan Sebastian
Presidente de la Comisión de Investigación:



CONSORCIO
HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARI
VALENCIA
COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

Este CEIm tras evaluar en su reunión de 14 de Julio de 2016 el Proyecto de Investigación:

Título:	NEW PDEI DRUGS IN WOUNDS: PROFILING OF TOP-N53 AND TOP-N44 IN IN VITRO, ISOLATED ORGANS AND IN VIVO MODELS		
I.P.:	Julio Cortijo Gimeno	Servicio/Unidad	Docencia y Investigación

Acuerda respecto a esta documentación:

Que se cumplen los requisitos éticos y metodológicos y la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

COMPOSICIÓN DEL CEIm

Presidente: Dra. Elena Rubio Gomis (Unidad de Farmacología Clínica)

Vocales:

- Dra. Pilar Blasco Segura (Servicio de Farmacia)
- Dr. Ernesto Bataller Alonso (Director Económico del CHGUV)
- Dr. Enrique Ortega Gonzalez (Gerente Chguv)
- Dr. Julio Cortijo Gimeno (Unidad de Docencia e Investigación)
- Dña. Maria Teresa Jareño (Unidad de Reanimación Cardiaca)
- Dr. Miguel Armengot Carceller (Servicio de Otorrinolaringología)
- Dr. Gustavo Juan Samper (Servicio de Neumología)
- D. Alejandro Moner González (Gerencia CHGUV – Asesoría Jurídica)
- Dr. Alberto Berenguer Jofresa (Servicio de Cardiología)
- Dra. Ana Blasco Cordellat (Servicio de Oncología)
- Dr. Antonio Martorell Aragonés (Unidad de Alergología)
- Dr. Aurelio Quesada Dorador (Servicio de Cardiología)
- Dña. Encarna Domingo Cebrián (Servicio de Estomatología)

- Dra. M^a José Safont Aguilera (Servicio de Oncología)
- Dr. Javier Milara Payá (Farmacia)
- Dra. Goitzane Marcaida Benito (Servicio de Análisis Clínicos)
- Dr. Pedro Polo Martín (Pediatra- Atención Primaria)
- D. Jaime Alapont Pérez (Miembro Iego Gerencia. Asesoría Jurídica)
- Dña. Carmen Sarmiento Cabañes (Miembro independiente de la organización asistencial)
- D. A. Baltasar Olivas Nevado (Miembro independiente de la organización asistencial)
-

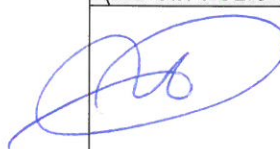
Secretario: Dr. Elias Ruiz Rojo (Farmacéutico Att Primaria)

El CEIm del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) tanto en su composición como en sus procedimientos y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 19 de julio de 2016

Fdo. Dr. Elias Ruiz Rojo
(Secretario CEIC CHGUV)



CONSORCI
HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARI
VALÈNCIA
COMITÈ ÈTIC DE
INVESTIGACIÓ CLÍNICA

IMPRESO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS SUJETOS A INCLUIR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION

TÍTULO: **New PDEI Drugs in Wounds**

Nuevos inhibidores de la fosfodiesterasa como vasodilatadores y antifibróticos en el daño cutáneo.

INVESTIGADOR PRINCIPAL Dr. JULIO CORTIJO GIMENO

OBJETIVOS

Estudiar in vitro las acciones de dos nuevos fármacos TOP-N53 y TOP-N44 en los procesos de revascularización y fibrosis que se producen en el daño cutáneo.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

El proyecto EUROSTARS se dedica a caracterizar y proporcionar evidencias científicas - in vitro e in vivo - para (i) TOP-N53 y (ii) TOP-N44, nuevos candidatos de fármacos tópicos

- (i) para acelerar la curación de heridas cutáneas crónicas, como en la úlcera del pie diabético y
- (ii) para prevenir la excesiva cicatrización fibrótica cutáneas tales como cicatrices hipertróficas después de quemaduras o queloide.

El proyecto EUROSTARS puede permitir la toma de decisiones sobre si se debe avanzar en la investigación de estos compuestos en una futura etapa de desarrollo clínico.

TOP-N53 es un inhibidor de la PDE5 con un doble mecanismo de acción, por un lado, tras bioactivación intracelular libera óxido nítrico y por otro lado es un inhibidor selectivo de la enzima fosfodiesterasa 5. Los inhibidores de la enzima fosfodiesterasa 5 producen vasodilatación y promueven la angiogénesis (nuevos vasos sanguíneos). Sin embargo, la eficacia de los inhibidores de la enzima fosfodiesterasa 5, depende de la presencia de endotelio para producir óxido nítrico. Este último es deficiente en la diabetes, por destrucción del endotelio vascular. TOP-N53 podría restaurar esta deficiencia en óxido nítrico, permitiendo potencialmente una mayor respuesta a los inhibidores de la fosfodiesterasa 5. TOP-N53 debería mejorar la microcirculación de la herida, por lo tanto el suministro de oxígeno en heridas cutáneas crónicas en la diabetes. Esto puede resultar en más rápida una curación de la herida.

TOP-N44 es una combinación de mometasona y de un inhibidor del enzima fosfodiesterasa 4 que, tras su bioactivación intracelular, libera óxido nítrico. Los inhibidores de enzima fosfodiesterasa 4 muestran amplia acción anti-inflamatoria en el hombre (EPOC, asma, artritis psoriasis, la psoriasis en placa) y disminuyen las respuestas fibróticas in vitro e in vivo. En el caso de la piel, las respuestas fibróticas excesivas son las responsables de las cicatrices hipertróficas o queloide. TOP-N44 debería –en sistemas experimentales- presentar una sinergia –como poco- aditiva entre los glucocorticoides y los inhibidores del enzima fosfodiesterasa 4. Esto permitiría un disminución de la fibrosis de las cicatrices, mejorando la excesiva cicatrización fibrótica cutáneas que da lugar a las cicatrices hipertróficas después de quemaduras o queloide.

METODOLOGIA

Los estudios se llevaron a cabo en:

1. **Muestras excedentes de piel sana** que procedan de pacientes, de edades entre 18-60 años, que acepten voluntariamente su inclusión en el estudio al ser intervenidos quirúrgicamente en el servicio de cirugía plástica del CHGUV, servicio de urología del CHGUV, servicio de cirugía general y digestiva del CHGUV; y que tras recibir información del estudio hayan cumplimentado y firmado el consentimiento informado, este consentimiento tiene la aprobación del comité ético de investigación clínica del CHGUV. Se le solicita que libremente acepte que ese trozo de su piel por necesidades de tratamiento quirúrgico y ya no útil para usted y que iba a ser incinerado, este equipo investigador lo pueda utilizar en el presente estudio para profundizar en el conocimiento Nuevos fármacos como vasodilatadores y antifibróticos en el daño cutáneo. Estos estudios ya no serán útiles para Ud., pero es posible que lo sean para futuros pacientes.

2. **Muestras de piel humana aisladas de tejido fibrótico (esclerótica) de los pacientes con fibrosis de la piel, tales como queloides, cicatrices hipertróficas de pacientes**, de edades entre 18-60 años, que acepten voluntariamente su inclusión en el estudio al ser intervenidos quirúrgicamente en el servicio de cirugía plástica del CHGUV, servicio de dermatología y que tras recibir información del estudio hayan cumplimentado y firmado el consentimiento informado, este consentimiento tiene la aprobación del comité ético de investigación clínica del CHGUV. Se le solicita que libremente acepte que ese trozo de su piel por necesidades de tratamiento quirúrgico y ya no útil para usted y que iba a ser incinerado, este equipo investigador lo pueda utilizar en el presente estudio para profundizar en el conocimiento Nuevos fármacos como vasodilatadores y antifibróticos en el daño cutáneo. Estos estudios ya no serán útiles para Ud., pero es posible que lo sean para futuros pacientes.

3. **Muestras de sangre de voluntarios sanos:** Usted por su condición de persona sana, presenta unas características que son necesarias para conocer si los posibles resultados obtenidos al final de este estudio son debidos al tratamiento. Si decide participar en el proyecto, se le solicita que libremente acepte que se le extraiga una muestra de sangre de 10 ml (1 cucharada sopera) de su vena del brazo para que este equipo investigador lo pueda utilizar en el efecto de la composición protéica sobre los elementos formes : monocitos. Los resultados de este estudio podrán ser útiles para Ud., así como para futuros pacientes. Se le recogerán las muestra de sangre durante extracciones *ex profeso* para tal cometido. Su participación en este estudio es totalmente voluntaria y no recibirá remuneración alguna. Ud puede dejar el estudio en cualquier momento y sin tener que dar explicaciones a nadie de porque lo hace.

Si Ud. esta de acuerdo, libremente firme el consentimiento de participación en este estudio que para este fin se ha añadido al final de este impreso.

RIESGOS Y BENEFICIOS

EL riesgo principal asociado a la cirugía está ampliamente descrito en el anexo correspondiente a la autorización para dicha operación.

El riesgo de la extracción de sangre puede ser una molestia en su brazo, hay algún riesgo de tener picores, hemorragia, hinchazón, o (raras veces) infección en el lugar de la inyección

Con su participación en este estudio, usted va a ayudar a profundizar en la información en los procesos de revascularización y fibrosis que se producen en el daño cutaneo. Según su condición clínica esta información podrá o no ser aprovechada en su propia salud.

PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria tras haber sido debidamente informada y documentada acerca de su naturaleza, importancia, implicaciones y riesgos. y será debidamente informado de la remuneración que podría percibir.

Si definitivamente su decisión es la de participar en el estudio es imprescindible su asentimiento de forma expresa y por escrito firmando y fechando el correspondiente **consentimiento informado** y siempre con la posibilidad de ser retirado libremente en cualquier momento sin que ello le ocasione perjuicio alguno.

CONFIDENCIALIDAD

Toda la información obtenida será confidencial, los datos recogidos se introducirán, por el equipo investigador, en una base de datos para realizar el análisis estadístico pero su nombre no aparecerá en ningún documento del estudio, sólo se le asignará un número.

En ningún caso se le identificará en las publicaciones que puedan realizarse con los resultados del estudio. Sin embargo, esta información podrá ser revisada por el Comité Ético de Investigación Clínica de este Hospital así como por organismos gubernamentales competentes.

Puede ejercer su derecho de acceso y rectificación de sus datos. También, si así lo desea, puede ser informado de los resultados del estudio

El estudio se realizará asegurando el cumplimiento de normas éticas y legales vigentes (Declaración de Helsinki).

Si tiene alguna duda o no entiende este texto consulte antes de firmar el documento con El Dr. D. (investigador principal o miembro del equipo investigador en quién se delegue para la realización de esta función), con número de teléfono (número de teléfono del investigador principal o número de teléfono de la persona en la que se delegue para la realización de esta función), que es el médico responsable de esta investigación y le puede preguntar cualquier duda o problema que tenga relacionado con este estudio o consulte con sus familiares y, finalmente, si está de acuerdo firme este consentimiento. Se le entregará una copia.

Sus datos personales serán tratados de manera confidencial, y se procesarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (15/1999, del 13 de Diciembre). El tratamiento de toda la información obtenida en el estudio está regulado por las leyes nacionales e internacionales de datos y de confidencialidad.

Fdo.: investigador principal o miembro del equipo investigador en quién se delegue para la realización de esta función
Investigador Principal del Proyecto
Unidad de Investigación Clínica
Fundación de Investigación
Consorcio Hospital General Universitario de Valencia
Tel: número de teléfono del investigador principal o número de teléfono de la persona en la que se delegue para la realización de esta función

CONSENTIMIENTO DEL PARTICIPANTE SUJETO DE ESTUDIO

Título del proyecto de investigación:

ESTUDIOS DE SEGURIDAD Y EFICACIA EN PRODUCTOS COSMETICOS
OPEN TEST-Aplicación única o repetida en abierto
Open test bajo control dermatológico

Yo,

He leído la hoja de información anterior.
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Doy mi consentimiento para que este material aparezca en informes y artículos de revista de publicaciones médicas.

Entiendo que:

- Mi nombre no será publicado.
- El material no será utilizado para publicidad o embalaje.
- El material no será utilizado fuera de contexto.

Firmado
(escribir nombre y apellidos)

Fecha.....