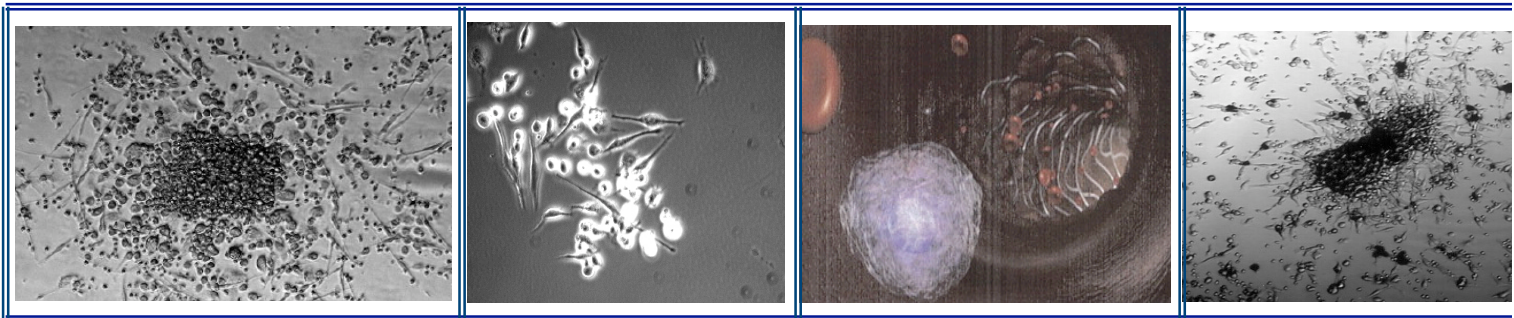


CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS I HIPERTENSIÓ ARTERIAL REFRACTÀRIA



Departament de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona



Anna Oliveras i Serrano

**Tesi Doctoral
Barcelona, 2008**

**CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS
I HIPERTENSIÓ ARTERIAL REFRACTÀRIA**

Tesi Doctoral presentada per **Anna Oliveras i Serrano** per a optar

al Grau de Doctor en Medicina i Cirurgia

Barcelona, 2008

Director

Dr. Alexandre Roca-Cusachs i Coll

**Departament de Medicina
Facultat de Medicina**

Universitat Autònoma de Barcelona



Als meus pares

Als qui tenen inquietud i cerquen,

Als qui senten i viuen.

AGRAÏMENTS

Moltes persones han estat i estan al meu costat en la meva trajectòria professional i personal, persones a les que dec molt i a les que, d'alguna manera, vull expressar el meu agraïment per caminar al meu costat:

- Al Dr. Àlex Roca-Cusachs, director d'aquesta tesi doctoral, per haver cregut en mi des de que em va conèixer i haver-me brindat tantes oportunitats.
- Al Dr. Josep Lloveras, cap del Servei de Nefrologia de l'Hospital del Mar. Ell, respecte a mi i el meu treball, sempre ha mirat molt més endavant del que jo ni tan sols intuïa. Gràcies per tot, Pep.
- Al Dr. Pere Armario i al Dr. Àlex de la Sierra, pel seu ajut constant i incondicional, per la seva amistat sempre present.
- Al Dr. Jordi Masramón, cap emèrit del Servei de Nefrologia de l'Hospital del Mar, per haver-me donat l'oportunitat d'introduir-me en el món de la hipertensió.
- Al Dr. Jaume Aubia, per haver-me iniciat en el concepte del rigor científic.
- Al Dr. Josep M^a Puig, la persona que em va donar la idea de dedicar-me al camp de la hipertensió arterial.
- A la Dra. Anto Orfila, la Dra. Marisa Mir, el Dr. Higiní Cao i el Dr. Francesc Barbosa, dels que he après el valor de la nostra feina al costat del malalt. A ells i a la resta de metges del Servei de Nefrologia, per ser uns companys amb els que sempre hem compartit el nostre treball amb respecte.
- A la Dra. Susana Vázquez, per la seva constant presència discreta, la seva dedicació als malalts i als companys, el seu saber fer. Per estar al meu costat.
Junt amb la Dra. Conxita Estadella, també per assumir la feina assistencial que jo no podia aquests darrers mesos.
- A la Dra. M^a Josep Soler, per assolir reptes i per tenir la valentia d'anar més enllà. Per iniciar els treballs amb cèl·lules progenitores endotelials. També pel seu ajut en proporcionar el grup control de la present tesi doctoral i en facilitar l'enllaç amb els biòlegs de la Universitat de Barcelona que hi han participat. El meu agraïment a ells

també, així com a la Dra. Maria Larrousse que va dur a terme els estudis de pletismografia.

- A totes les persones del Servei de Nefrologia, a la Mercè, sempre al nostre costat, a en Ruben, fonamental i un més de l'equip. A la Tai Mooi, la infermera imprescindible en la nostra Unitat d' Hipertensió; a tot el personal al càrrec de la unitat d'hospitalització i de les consultes externes, per ensenyar-me les virtuts de la paciència i de l'abnegació en el treball amb els que pateixen.
- A tots els malalts que han estat i són la base i la raó de l'exercici de la meva professió i els que li donen sentit, perquè la seva dignitat en el sofriment és una lliçó que va més enllà de tota classe magistral.
- Al Dr. Lluís Molina i a la Dra. Mercè Cladellas, pel seu suport en la realització de les ecocardiografies d'aquest treball i la seva sempre disponibilitat.
- A en Joan S. Vila i en Sergi Mojal, per la seva paciència i el seu valuós ajut per dur a terme les anàlisis estadístiques.
- Als professors de la universitat, als companys d'altres serveis, a les persones dedicades a la recerca, fonamental per avançar en la nostra professió, en especial al Dr. Jaume Marrugat, amb les que tinc l'oportunitat de treball conjuntament. De tots ells he après i continuo aprenent dia a dia.
- A la Maite i la Cristina, la Isabel i en Jordi, la Myriam, la Susana i en Joan, en Carlos, en Josep M^a, la Raquel, la Núria, l'Alicia i en Manel, la Montse, en Xavi i la Isabel, la Mercè, l'Eva. A totes les persones que des de l'estimació m'heu animat en tot en general i en aquesta tasca en particular i m'heu brindat la vostra amistat.
- Als meus germans, a en Jordi i l'Ignasi, la Cristina i l'Aran. Per les vegades en que he estat absent; per la seva comprensió i estimació.
- Als meus pares. Per estar al meu costat i pel seu amor incondicional. Pel seu ensenyament sense paraules del treball fet amb cura, detall i dedicació, però sobretot dels valors de la vida i del ser humà, del respecte, la sinceritat, la coherència, l'amor a la veritat i la llibertat. Per ensenyar-me a SER.

ÍNDEX

	Pàgina
ABREVIATURES	1
I. INTRODUCCIÓ	2
1. HIPERTENSIÓ ARTERIAL REFRACTÀRIA	3
1.1. Hipertensió arterial essencial a Espanya	3
1.2. Hipertensió arterial refractària	3
2. ENDOTELI I DISFUNCIÓ ENDOTELIAL	6
2.1. L'endoteli, la cèl·lula endotelial i la funció endotelial	6
2.2. Concepte de disfunció endotelial i dany endotelial	7
2.3. Patogènia de la disfunció endotelial. Relació amb la HTA	8
2.4. Tècniques d'avaluació de la disfunció endotelial	9
2.5. Conseqüències de la disfunció endotelial. Valor pronòstic	10
2.6. Disfunció endotelial i regeneració de l'endoteli	12
3. CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS	13
3.1. Concepte de CPE	13
3.2. Caracterització i aïllament de les CPE	14
3.3. Relació de les CPE amb factors de risc cardiovascular clàssics i nous	21
3.4. Relació de les CPE amb la disfunció endotelial i el procés aterosclerós	26
3.5. Relació de les CPE amb els marcadors d'inflamació	28
3.6. Valor pronòstic de les CPE	28
II. JUSTIFICACIÓ	30
III. HIPÒTESI	32
IV. OBJECTIUS	34

V. MATERIAL I MÈTODES	36
1. SUBJECTES	37
1.1. Subjectes amb hipertensió arterial refractària	37
1.2. Grup control: subjectes sans	38
1.3. Dades demogràfiques, antropomètriques i clíniques dels subjectes amb hipertensió arterial refractària i dels subjectes sans	38
1.3.1. Dades demogràfiques i antropomètriques	38
1.3.2. Dades clíniques	39
2. MESURA DE LA PRESSIÓ ARTERIAL	39
2.1. Mesura clínica de pressió arterial	39
2.2. Monitoratge ambulatori de pressió arterial	40
3. ANÀLISIS SANGUÍNIES I URINÀRIES	41
3.1. Bioquímica	41
3.2. Marcadors d'inflamació	41
3.3. Altres	42
4. CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS	42
4.1. Obtenció i processament de mostres	42
4.2. Citometria de flux i anàlisi de FACS	43
4.3. Avaluació de la proliferació de les cèl.lules progenitores endotelials després de cultiu <i>in vitro</i>	44
4.4. Microscòpia de contrast de fases invertida	45
5. ESTUDI ECOCARDIOGRÀFIC	45
6. ANÀLISI DE FUNCIÓ ENDOTELIAL	46
7. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES	47

VI. RESULTATS	48
ESTUDI 1: ESTUDI COMPARATIU DELS MALALTS AMB HIPERTENSIÓ ARTERIAL REFRACTÀRIA I ELS CONTROLS SANS	49
1. CARACTERITZACIÓ DELS MALALTS AMB HIPERTENSIÓ ARTERIAL REFRACTÀRIA I DELS CONTROLS SANS	49
1.1. Característiques clínic-demogràfiques i antropomètriques	49
1.2. Dades de laboratori	51
1.3. Marcadors d'inflamació pròpiament	52
1.4. Dades ecocardiogràfiques	53
2. QUANTIFICACIÓ DE CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS EN ELS MALALTS AMB HIPERTENSIÓ ARTERIAL REFRACTÀRIA I EN ELS CONTROLS SANS	53
2.1. Nivells de cèl·lules progenitores endotelials circulants	53
2.2. Proliferació de cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu <i>in vitro</i>	55
3. ANÀLISI DE POSSIBLES DETERMINANTS DE LES DIFERÈNCIES EN LA QUANTIFICACIÓ DE CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS, CIRCULANTS I DESPRÉS DE CULTIU, ENTRE LES DUES POBLACIONS	56
3.1. Factors que poden condicionar diferències en els nivells de cèl·lules progenitores endotelials circulants	56
3.2. Factors que poden condicionar diferències en la proliferació de cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu <i>in vitro</i>	59
3.3. Validació dels resultats obtinguts	60
ESTUDI 2: ESTUDI DE LA VASODILATACIÓ ENDOTELI-DEPENDENT EN ELS MALALTS AMB HIPERTENSIÓ ARTERIAL REFRACTÀRIA	61
1. Justificació de la mostra	61
2. Característiques del subgrup de malalts en que es va fer anàlisi de vasodilatació arterial endoteli-dependent	61
2.1. Característiques clínic-demogràfiques i antropomètriques	61
2.2. Dades de laboratori i ecocardiogràfiques	62
2.3. Marcadors d'inflamació	62
2.4. Cèl·lules progenitores endotelials circulants i després de cultiu <i>in vitro</i>	62
3. Paràmetres de vasodilatació endoteli-dependent	64
4. Anàlisi dels possibles determinants de la funció endotelial en els malalts amb hipertensió arterial refractària	64

VII. DISCUSSIÓ	68
1. Síntesi dels objectius i resultats	69
2. Alteració en els nivells de cèl·lules progenitores endotelials circulants en els malalts afectes d'hipertensió arterial refractària	70
3. Alteració en la proliferació de cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu <i>in vitro</i> en els malalts afectes d'hipertensió arterial refractària	74
4. Associació entre les CPE circulants i la vasodilatació endoteli-dependent	74
5. Associació entre les CPE després de cultiu <i>in vitro</i> i la vasodilatació endoteli-dependent	76
VIII. CONCLUSIONS	77
IX. IMPORTÀNCIA I RELLEVÀNCIA CLÍNICA	79
X. BIBLIOGRAFIA	82
XI. ANNEXES	98
a. Publicacions	99
b. Comunicacions a congressos	99

ABREVIATURES

ADMA	Dimetilarginina asimètrica
CPE	Cèl·lules progenitores endotelials
DMF	Dilatació mitjançada per flux
EGM	Medi cel·lular endotelial microvascular
FACS	<i>Fluorescence-activated cell-sorting</i>
FGe	Filtrat glomerular estimat
FvW	Factor de von Willebrand
HOMA	<i>Homeostatic model assessment</i>
HTA	Hipertensió arterial
HTA-R	Hipertensió arterial refractària
HVE	Hipertròfia ventricular esquerra
IL	Interleucina
IMC	Índex de massa corporal
IMVE	Índex de massa ventricular esquerra
KDR	<i>Kinase-insert Domain Receptor</i>
MAPA-24h	Monitoratge ambulatori de pressió arterial de 24 hores
MCP	Proteïna quimiotàctica monocitària
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease Study</i>
MN	Cèl·lules mononuclears perifèriques
PA	Pressió arterial
PAD	Pressió arterial diastòlica
PAS	Pressió arterial sistòlica
PCR	Proteïna C reactiva
QACO	Quocient albúmina / creatinina en orina
sICAM	Molècula d'adhesió intercel·lular soluble
sVCAM	Molècula d'adhesió cel·lular vascular soluble
TNF	Factor de necrosi tumoral

I. INTRODUCCIÓ

I. INTRODUCCIÓ

1. HIPERTENSIÓ ARTERIAL REFRACTÀRIA

1.1. Hipertensió arterial essencial a Espanya.

La hipertensió arterial (HTA) és una de les malalties més freqüents en l'actualitat. Això és així arreu del món, i especialment en el món occidental. A Espanya, d'acord amb la definició vigent segons les guies espanyola i europea actuals^{1,2}, en que es considera que un subjecte pateix HTA quan les seves xifres de pressió arterial (PA) són superiors o iguals a 140 mmHg de PA sistòlica i/o superiors o iguals a 90 mmHg de PA diastòlica, presa en les condicions adequades i seguint les indicacions recomanades, la prevalença d'HTA es troba al voltant d'un 35% en adults (majors de 18 anys) i afecta al 68% de la població de més de 60 anys^{3,4}. Les dades respecte al control de la PA mostren uns resultats ben pobres, estimant-ne el control de la mateixa en un 14% del total d'hipertensos i en un 25% de tots els hipertensos tractats⁵. No obstant, en els darrers anys s'ha objectivat un increment en el percentatge de malalts amb HTA coneguda que estan tractats i ben controlats, essent aquesta xifra del voltant del 36-38% en Atenció Primària i del 42-47% en Unitats especialitzades⁴. D'altra banda, el registre de monitoratge ambulatori de pressió arterial de 24 hores (MAPA-24h) de la Societat Espanyola d'Hipertensió confirma un control de la PA del voltant del 40% en el total de registres avaluats⁶. Aquestes xifres no són molt diferents de les que aporta la base de dades del National Health and Nutritional Examination Survey dels Estats Units d'Amèrica, que assenyalava un percentatge del 37% quant als individus hipertensos, coneguts i tractats que tenen un bon control de la seva HTA⁷.

1.2. Hipertensió arterial refractària.

La hipertensió arterial es considera refractària o refractària al tractament, quan un esquema terapèutic que inclou modificacions en l'estil de vida i la prescripció d' almenys tres fàrmacs (incloent un diürètic) a dosis adequades, no aconsegueix reduir la PA sistòlica i diastòlica a valors inferiors a 140 i 90 mmHg respectivament^{1,2}. La importància d'identificar i tractar els malalts amb HTA refractària (HTA-R) rau en el fet que s'ha objectivat la presència freqüent de dany orgànic subclínic en aquests pacients, sobretot hipertròfia ventricular esquerra, microalbuminúria, engruiximent

de la paret arterial, plaques en artèries caròtides, canvis vasculars en la retina i nefrosclerosi⁸⁻¹¹, així com un major risc cardiovascular¹²⁻¹⁴. Un metanàlisi recent de 61 estudis epidemiològics em el que s'inclouïa al voltant d'1 milió de persones, va concloure que per cada 20/10 mmHg d'elevació de la PA (sistòlica i diastòlica respectivament) s'incrementa el doble el risc de mortalitat cardiovascular¹⁵.

Són múltiples les possibles causes d'aquest control insuficient de la HTA. Així, trobem que a vegades es deu a un esquema terapèutic inadequat o al compliment insuficient del mateix, tant pel que fa a les modificacions de l'estil de vida (sobretot en les mesures més eficaces com és el control del sobrepès o per consum excessiu d'alcohol) com al tractament farmacològic prescrit. Altres vegades el control insuficient de la HTA pot ser degut a l'existència d'una causa secundària d'HTA no diagnosticada o a la presència concomitant de síndrome d'apnea del son, la ingesta d'altres fàrmacs que elevin la PA, l'excés de volum per insuficiència renal, dosis inadequades de diürètics, la ingesta excessiva de sodi o l'hiperaldosteronisme². Així, doncs, hi ha una sèrie d'entitats i circumstàncies que es poden trobar en l'origen de la refractarietat de la HTA o bé poden conduir falsament al seu diagnòstic, i que s'han d'avaluar de forma acurada davant qualsevol malalt en el que sospitem HTA-R (Taula 1).

La prevalença de la HTA-R no es coneix prou bé, malgrat que tant els estudis transversals com prospectius suggereixen que no és pas infreqüent, estimant la seva prevalença al voltant del 5% en la població atesa en atenció primària i del 25-30% dels malalts remesos a unitats de referència¹⁶. Dades obtingudes a partir d'estudis com ara el Controlled Onset Verapamil Investigation of Cardiovascular Endpoints (CONVINCE)¹⁷ o l'Antihypertensive and Lipid Lowering Treatment to Prevent Heart Attack (ALLHAT)¹⁸ han objectivat una prevalença del 40-50% en malalts hipertensos de més de 55 anys d'edat amb almenys un altre factor de risc addicional. Aquestes xifres poden resultar una mica elevades si tenim en compte que en el global d'assaigs clínics s'ha vist que s'aconsegueix taxes de control de PA d'entre el 65 i el 70% de tots els pacients hipertensos inclosos, tot i que això també ve limitat i esbiaixat pel fet que el control estricte en el tractament i el seguiment en els assaigs clínics no es correspon amb la pràctica clínica diària habitual i també pel fet que aquests estudis solen excloure malalts amb diferents patologies i condicions que fan que el control de la seva HTA sigui molt difícil, i per tant la població estudiada tampoc seria representativa de la població hipertensa global. Les dades europees^{1,2}

situen la prevalença de la HTA-R entre el 10 i el 15%. En consonància amb aquestes dades, un estudi recent¹⁹ realitzat en l'àmbit de l'Atenció Primària a una zona de Coruña amb més de 1.700 hipertensos estima la prevalença d'HTA-R en el 13%.

Taula 1. Etiologia de la hipertensió arterial refractària.

<ul style="list-style-type: none"> ■ Pseudoresistència: <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Hipertensió aïllada a la consulta o de “bata blanca”</i> ▪ <i>Pseudohipertensió</i> ▪ <i>Utilització de braçal massa petit</i> ■ Incompliment terapèutic: en relació amb causes relacionades amb <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>El pacient</i> ▪ <i>El metge</i> ▪ <i>El fàrmac</i> ■ Sobrecàrrega de volum: en relació amb <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Consum excessiu de sal</i> ▪ <i>Dany renal progressiu (nefrosclerosi)</i> ▪ <i>Retenció hídrica per descens de la pressió arterial</i> ▪ <i>Tractament diürètic inadequat</i> ■ Causes en relació amb fàrmacs i/o drogues: sobretot <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Simpatomimètics (descongestionants nasals, anorexígens, cocaïna)</i> ▪ <i>Anticonceptius orals</i> ▪ <i>Antiinflamatoris no esteroïdals</i> ▪ <i>Corticoides, anabolitzants</i> ▪ <i>Anticalcineurínics</i> ▪ <i>Eritropoetina</i> ▪ <i>Antidepressius tricíclics</i> ▪ <i>etc.</i> ■ Condicions concomitants: <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Tabaquisme, consum excessiu d'alcohol</i> ▪ <i>Obesitat, insulín-resistència, hiperinsulinèmia</i> ▪ <i>Síndrome d'apnea obstructiva del son</i> ▪ <i>Hiperventilació per ansietat, atacs de pànic, dolor crònic</i> ■ Causes secundàries d'HTA: entre les més freqüents: <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Malaltia renal parenquimatosa</i> ▪ <i>HTA renovascular</i> ▪ <i>Hiperaldosteronisme primari</i>

No només el coneixement de la prevalença real de la HTA-R veritable és encara una incògnita, sinó que també queden pendents moltes respostes quant a l'origen i els mecanismes de la mateixa. L'avaluació experimental de malalts amb HTA-R es veu complicada per l'associació amb un risc cardiovascular elevat, doncs aquest limita la retirada de medicacions i restringeix els tipus i durada d'intervencions experimentals que caldria per explorar determinades etiologies. A més a més, els estudis en aquests malalts es veuen també limitats per la presència de malalties concomitants com la diabetis, insuficiència renal crònica, síndrome d'apnea del son o malaltia ateroscleròtica, que interferiran fàcilment amb els resultats. Si bé és cert que s'ha arribat a identificar determinades característiques dels pacients que es troben associades amb la HTA-R, els mecanismes subjacents de la resistència al tractament no han estat extensament investigats. Tot i que es creu que el remodelatge vascular i cardíac present en els malalts amb HTA-R es relaciona amb disfunció endotelial, un factor clau en l'aterogènesi precoç i la malaltia cardiovascular, es desconeixen els mecanismes que relacionen els diferents marcadors de funció endotelial i el remodelatge cardiovascular amb la HTA-R, ni tampoc els potencials mecanismes genètics implicats.

2. ENDOTELI I DISFUNCIO ENDOTELIAL

2.1. L'endoteli, la cèl·lula endotelial i la funció endotelial.

L'endoteli es una monocapa continua que cobreix la superfície interna de tot el sistema vascular i que representa una barrera dinàmica entre la sang circulant i els teixits subjacents. Està permanentment exposat tant a estímuls mecànics, com és el flux sanguini, la PA i la distensió de la paret, com a nombrosos estímuls químics, procedents sobretot de les cèl·lules sanguínies. Com a resposta, donarà lloc a l'alliberament de diversos factors reguladors del to vascular, com ara les prostaglandines o l'òxid nítric. És, per tant, un autèntic òrgan de regulació vascular amb accions endocrina, paracrina i autocrina que està implicat en processos vasoactius, metabòlics i immunes. L'endoteli vascular, doncs, no es considera una simple barrera que separa la sang circulant de l'espai subendotelial, sinó que a més les cèl·lules endotelials actuen com un sistema receptor i emissor de senyals, d'estímuls físics i químics que respon alliberant diferents mediadors que influeixen poderosament en el to vascular i en el creixement i la proliferació de les cèl·lules

vasculars. En condicions normals, l'efecte conjunt d'aquests factors endotelials és el manteniment del to vascular, la fluïdesa sanguínia i la limitació de la inflamació vascular i de la proliferació de les cèl·lules musculars llises. No obstant, en presència de factors de risc cardiovascular, tant els tradicionals (com són la hipercolesterolèmia, la hipertensió i la diabetis mellitus) o bé els factors de risc anomenats emergents (com la hiperhomocisteïnèmia, la obesitat i la inflamació sistèmica), l'endoteli pot adoptar un fenotip que facilita la inflamació, trombosi, vasoconstricció i la formació de lesió ateroscleròtica. Aquest fenotip endotelial anòmal es manifesta prèviament al desenvolupament d'aterosclerosi franca²⁰.

2.2. Concepte de disfunció endotelial i dany endotelial.

Tot i la importància de l'endoteli, en condicions fisiològiques els vasos sanguinis adults es regeneren només de forma moderada en els adults. La vida mitjana d'una cèl·lula endotelial adulta s'estima al voltant de 3.1 anys²¹ i el nivell de recanvi endotelial basal és baix; després pateix un procés lent i progressiu de mort i regeneració cel·lular. Aquest procés està accelerat per múltiples factors, com són la continua influència de les forces de cisallament, l'estrès oxidatiu o, com ja hem dit, els diferents factors de risc cardiovascular. A la vegada, la disfunció de les cèl·lules endotelials és un fet crític per l'inici del desenvolupament de la placa ateroscleròtica²². Així, davant d'un dany agut en l'endoteli vascular, acompanyat freqüentment de mort cel·lular programada (apoptosi) de cèl·lules endotelials i de pèrdua de les propietats antitrombòtiques de la paret vascular, es produeix un ràpid increment en el número de cèl·lules endotelials circulants. L'endoteli té la capacitat de ser-ne reparat per si mateix²³. Quan experimentalment s'extreu una petita àrea de la íntima, les cèl·lules endotelials de les vores de la lesió proliferen i emigren cap al centre, degut a la pèrdua de la inhibició per contacte. Si l'endoteli és jove i sa, es completa el procés de reparació local i la capa íntima queda reconstituïda. En canvi, si l'endoteli està envellit o rep l'agressió d'altres factors de risc, com la hipercolesterolèmia, hipertensió o hiperglucèmia, la reparació local és defectuosa i es pot formar una placa com a resultat d'un procés inflamatori afavorit sobretot per l'acumulació de macròfags²⁴. No només això, sinó que, a més del seu paper en l'aterosclerosi precoç, cada vegada es reconeix de forma més clara que la disfunció

endotelial també contribueix als estadis més tardans de la malaltia, quan els malalts desenvolupen símptomes clínics.

Però si anem a estadis més precoços de l'alteració de l'endoteli, hem d'introduir el concepte de disfunció endotelial. La *disfunció endotelial* és una alteració reversible de les cèl·lules endotelials com a resultat d'una disponibilitat d'òxid nítric inadequada. El dèficit d'òxid nítric no és la única manifestació de la disfunció endotelial, per bé que n'és la principal. Aquest concepte s'ha de diferenciar del de *dany endotelial*, que implica una disrupció anatòmica de l'endoteli²⁵. En la disfunció endotelial, la modificació de l'expressió gènica i de la producció dels diversos tipus de factors endotelials com a conseqüència de l'acció dels diferents factors de risc cardiovascular, donarà lloc a un desequilibri entre factors amb accions oposades, de manera que, com ja hem apuntat abans, hi haurà un predomini dels factors vasoconstrictors, proliferatius, d'adhesió de cèl·lules sanguínies i protrombòtics. És a dir, hi haurà un to vasomotor més elevat, creixement de la paret arterial, augment de la tendència a l'adhesió dels leucòcits, agregació plaquetària i coagulació²⁶.

2.3. Patogènia de la disfunció endotelial. Relació amb la HTA.

En estudis realitzats en voluntaris sans i subjectes amb HTA s'ha demostrat una correlació inversa significativa entre la PA sistòlica i la dilatació mitjançada per flux en l'artèria braquial, fins i tot després d'ajustar pels possibles factors de confusió o altres factors de risc cardiovascular²⁷. No obstant, els mecanismes subjacents en l'origen de la disfunció endotelial no són prou coneguts i poden ser diferents segons el factor de risc cardiovascular a que s'associï. S'ha dit que en els malalts amb HTA hi ha una vasorelaxació anòmal probablement degut a un desequilibri entre la producció endotelial de mediadors vasodilatadors i vasoconstrictors²⁸⁻³⁰. En aquest cas, el de la disfunció endotelial associada a HTA, el principal mecanisme inductor i mediador de la disfunció endotelial seria els mateixos nivells elevats de PA i el consegüent augment en les forces circumferencials i tangencials, que deriven finalment en una alteració en els factors produïts per l'endoteli. La reduïda disponibilitat d'òxid nítric observada en la disfunció endotelial podria, doncs, ser conseqüència d'una disminució en la seva producció i/o una major degradació d'aquest vasodilatador²⁶.

2.4. Tècniques d'avaluació de la disfunció endotelial.

Donat que la disfunció endotelial i l'aterosclerosi semblen ser els extrems d'una mateixa entitat, s'han utilitzat nombrosos mètodes per a mesurar la disfunció endotelial en humans, l'alteració més precoç d'aquest procés³¹. La determinació de la vasodilatació endoteli-dependent sembla ser un indicador accessible de la salut endotelial. Així, en humans, els estímuls que augmenten la producció d'òxid nítric derivat de l'endoteli han mostrat ser d'utilitat en l'avaluació de la vasodilatació endoteli-dependent. Aquests estímuls inclouen la força de fregament produïda per l'increment del flux sanguini, i els agonistes receptor-dependents, com acetilcolina, bradicinina, o substància P. De forma global, existeixen 4 grans grups de mètodes per a avaluar i quantificar la funció endotelial en humans:

2.4.1. Infusió intracoronària d'agonistes endoteli-dependents (sobretot acetilcolina) amb angiografia coronària quantitativa.

2.4.2. Infusió d'agonistes endoteli-dependents en l'artèria braquial i mesura de les respostes vasodilatadores dels vasos de resistència de l'avantbraç utilitzant pletismografia d'oclusió venosa.

2.4.3. Mesures de la rigidesa arterial, incloent velocitat d'ona del pols i distensibilitat arterial mitjançant tonometria.

2.4.4. Avaluació no invasiva de la dilatació mitjançada per flux (DMF) endoteli-dependent de l'artèria braquial per ultrasonografia vascular o mesura del flux sanguini. La DMF és un fenomen que s'observa tant en les artèries de resistència com en les de conducció i que ve determinat per l'adaptació del diàmetre arterial a canvis en el flux o als mediadors humorals pels qual l'endoteli vascular contribueix a la regulació del to arterial³². Aquest és un mètode validat i no invasiu àmpliament utilitzat per a quantificar la funció endotelial³³⁻³⁵.

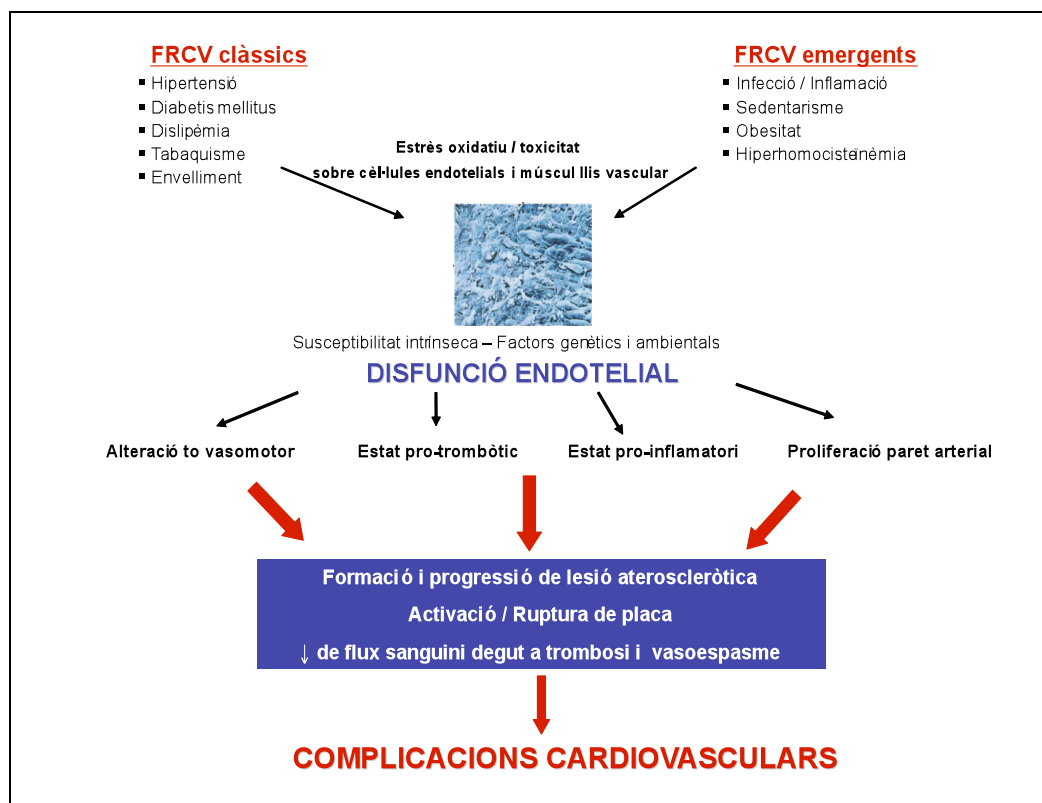
Totes elles tenen, òbviament, avantatges i inconvenients. Entre els inconvenients valdria la pena destacar el caràcter invasiu en el cas de les dues primeres, mentre que els estudis de rigidesa vascular es veuen influïts de forma important per aspectes estructurals de la vasculatura més enllà de l'endoteli. En el cas de l'avaluació de la

DMF cal assenyalar la resolució minvada en relació amb la grandària arterial, la variabilitat en les diferents mesures i la seva elevada dependència respecte de l'operador que realitza la tècnica. Tot i això, diversos estudis suggereixen que la disfunció endotelial detectada de forma no invasiva en el braç es correlaciona bé amb la disfunció endotelial coronària^{36,37}.

2.5. Conseqüències de la disfunció endotelial. Valor pronòstic.

Ja hem vist en els apartats anteriors com la disfunció endotelial pot jugar un paper important en la patogènesi de la malaltia cardiovascular. Els diferents passos d'aquesta relació causal queden reflectits en la Figura 1.

Figura 1. La disfunció endotelial en la patogènesi de les malalties cardiovasculars. Adaptada de Widlansky i Bonetti³¹.



Abreviatures: **FRCV** = factors de risc cardiovascular.

Siguin quins siguin els mecanismes patològics que condueixen a la disfunció endotelial, aquesta pot tenir importants implicacions a nivell cardiovascular i condicionar el pronòstic d'aquells que la pateixen. Així, alguns estudis en malalts amb malaltia coronària, com el de Halcox³⁸ que avaluava la disfunció endotelial a

nivell de la circulació coronària o els de Heitzer³⁹ i Neunteufl⁴⁰ que determinaven les respostes del flux sanguini a nivell de l'avantbraç, van mostrar que la disfunció endotelial tenia un valor pronòstic en aquests pacients. Un altre estudi que mostra que la DMF és predictora de patologia cardiovascular incident en malalts amb patologia cardiovascular prèvia és el de Yoshida i col.⁴¹. També en malalts amb malaltia arterial perifèrica ateroscleròtica pendents de cirurgia vascular no urgent i examinats de forma prospectiva, la funció endotelial mesurada per DMF en l'artèria braquial va demostrar ser predictora independent d'esdeveniments cardiovasculars tant als 30 dies després de la cirurgia com a llarg termini (mitjana d'1.2 anys)⁴². També són interessants els resultats d'estudis que han avaluat el valor pronòstic de la funció endotelial en malalts amb factors de risc però sense aterosclerosi coneguda. Així, en els estudis de Perticone⁴³ en malalts amb HTA i de Modena⁴⁴ en dones post-menopàusiques amb HTA de recent diagnòstic, l'avaluació de la DMF a nivell de l'artèria braquial va objectivar que la disfunció endotelial implicava un increment del risc, sobretot, en el cas de l'estudi de Modena, quan el tractament antihipertensiu no aconseguia revertir la disfunció endotelial. Més recentment, Muiesan i col. han demostrat que en hipertensos no complicats i no tractats, la incidència de complicacions cardiovasculars en els pacients amb una DMF inferior a la mediana (4.7%) era 3.1 per 100 pacients-any enfront a 1.4 en aquells amb valors superiors, conferint a aquests subjectes un risc 2.67 vegades més elevat ($p=0.02$)⁴⁵. Finalment, assenyalar que en persones d'edat avançada s'ha vist especialment aquesta relació entre DMF i malalties cardiovasculars incidents, com són l'ictus, l'infart de miocardi, la disfunció microvascular coronària i l'augment de la rigidesa arterial⁴⁶.

A més a més de la determinació de la disfunció vasomotora, que reflectiria sobretot l'estat derivat de la disponibilitat d'òxid nítric, s'ha demostrat que els marcadors en sang perifèrica de disfunció endotelial, reflex de l'estat inflamatori, també tenen un valor pronòstic, si bé no està definit quin marcador individual o quina combinació de marcadors és més útil en aquest aspecte. Ja hem vist com l'endoteli vascular disfuncionant comportarà una sèrie de fenòmens que en últim terme donaran lloc a la formació de la placa d'ateroma, i per tant a l'aterosclerosi, i el remodelatge vascular. Com ja hem esmentat prèviament, en el lligam que uneix la

disfunció endotelial amb aquestes alteracions estructurals finals hi juga un paper important l'estrès oxidatiu, caracteritzat bàsicament per l'escassa disponibilitat d'òxid nítric. Però a més a més hi ha un altre mecanisme, els fenòmens inflamatoris, que probablement també estiguin involucrats en el desenvolupament d'arteriosclerosi a partir de la disfunció de l'endoteli. Hi ha alguns marcadors inflamatoris específics, les molècules solubles d'adhesió d'una banda, sobretot la molècula d'adhesió intercel·lular (sICAM-1) i la molècula d'adhesió cel·lular vascular (sVCAM-1), P-selectina i E-selectina, i de l'altra algunes citocines i quemoquines, com IL-6 (interleucina-6) i MCP-1, el factor quimoattractant de proteïnes, que poden contribuir al dany vascular i que es troben en íntima relació amb la disfunció endotelial i el desenvolupament i progressió d'aterosclerosi. Així, per exemple, Tzoulaki i col. van observar en un estudi de cohort poblacional amb seguiment de fins 12 anys que, sobretot IL-6 però també sICAM-1 i proteïna C-reactiva, s'associaven amb aterosclerosi i la seva progressió⁴⁷. Aquests mediadors cel·lulars junt amb alguns altres marcadors que comentarem a continuació, semblen tenir a més un valor pronòstic quant a l'aparició de complicacions cardiovasculars. Així, els nivells elevats de sICAM^{48,49}, com també els de l'activador tissular del plasminogen^{50,51}, s'han mostrat com a predictors independents de futures complicacions vasculars tant en malalts sense patologia cardiovascular coneguda com en malalts amb coronariopatia coneguda. També en aquest darrer grup de pacients han mostrat tenir valor pronòstic els nivells plasmàtics de factor de von Willebrand (fvW)⁵¹, l'inhibidor de l'activador de plasminogen⁵² i l'endotelina⁵³. Respecte a la interrelació d'aquestes diferents mesures de la funció endotelial, doncs es diu que probablement els biomarcadors serien mesures de l'estat pro-inflamatori de l'endoteli mentre que la mesura de la DMF seria més un reflex de les alteracions del mateix mitjançades per l'òxid nítric, s'ha vist en individus sans que sICAM-1 i la mesura de la DMF estaven relacionats, i que ambdós eren predictors de risc coronari independentment l'un de l'altre, així com també de forma independent respecte als nivells de proteïna C-reactiva i als altres factors de risc cardiovascular⁵⁴.

2.6. Disfunció endotelial i regeneració de l'endoteli.

Ja hem dit abans que la vida de la cèl·lula endotelial era finita. A més a més del propi procés d'envelliment, l'agressió produïda sobretot pels factors de risc cardiovascular sobre l'endoteli comporta sovint alteracions tant funcionals com

estructurals d'aquestes cèl·lules endotelials, les quals acabaran afavorint la mort de les mateixes. El resultat serà un endoteli alterat i per tant mal funcionant, amb les conseqüències que ja hem esmentat. Per tant, és fonamental el coneixement de tot el que faci referència a la regeneració de l'endoteli. En aquest punt, i com veurem a continuació, jugaran un paper important les cèl·lules progenitores endotelials (CPE). Si bé és cert que la reconstrucció endotelial pot tenir lloc per migració i proliferació de les cèl·lules endotelials madures adjacents, aquestes, definitivament diferenciades, tenen un baix potencial proliferatiu i la seva capacitat per a subsistir en l'endoteli danyat és limitada, per lo que seran necessaris altres tipus cel·lulars per reparar l'endoteli²². La recerca realitzada en els darrers anys dona suport al concepte de que la formació de nous capil·lars depèn no només de cèl·lules endotelials preexistents, sinó també del reclutament de CPE. A partir d'aquí s'ha investigat també de forma extensa sobre la naturalesa i funció de les CPE en el manteniment i reparació vascular⁵⁵. La constatació de que el número i funció de les CPE circulants estan reduïts en malalts de risc cardiovascular i de que, com veurem, el número de CPE és predictor de futures complicacions cardiovasculars⁵⁶, reforça de manera consistent el paper d'aquestes cèl·lules en la reparació vascular endògena.

3. CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS

3.1. Concepte de CPE.

Per entendre el que són i el que representen les CPE, abans hem de repassar breument els conceptes de vasculogènesi i angiogènesi. Durant el desenvolupament embrionari, els vasos sanguinis es formen inicialment mitjançant el procés conegut com *vasculogènesi*, és a dir, la diferenciació *in situ* dels angioblasts primitius cap a cèl·lules endotelials. Al créixer l'embrió, l'expansió de la xarxa vascular depèn de l'*angiogènesi*, un mecanisme diferent de creixement vascular segons el qual la xarxa de vasos sanguinis s'expandeix mitjançant la divisió de cèl·lules ja existents en l'arbre vascular⁵⁷. Durant molts anys es va considerar que l'angiogènesi era l'únic mecanisme pel desenvolupament de nous vasos en la vida adulta. L'any 1997, Asahara i els seus col·laboradors van descriure una població de cèl·lules humanes circulants CD34+ que podien diferenciar-se *ex-vivo* en cèl·lules amb característiques semblants a les cèl·lules endotelials⁵⁸. Aquestes cèl·lules es van anomenar CPE i

aquest descobriment crucial va canviar el concepte tradicional d'angiogènesi, suggerint que les cèl·lules circulants en la sang perifèrica també poden contribuir a la formació de nous vasos i a l'homeòstasi vascular en l'adult⁵⁷⁻⁶¹. Les cèl·lules progenitores són cèl·lules primitives derivades de la medul·la òssia amb capacitat de proliferar, migrar i diferenciar-se en diversos tipus cel·lulars madurs. És probable que aquestes cèl·lules progenitores tinguin un precursor comú anomenat hemangioblast, la persistència del qual en l'adult contribueix al creixement i reparació d'ambdues línies, hematopoètica i endotelial⁶². Les CPE, un subtipus d'aquestes cèl·lules progenitores, tenen a més la capacitat de participar en el desenvolupament de xarxes vasculars mitjançant diferenciació a cèl·lules endotelials madures, a la vegada que també hi poden intervenir a través de la secreció de factors de creixement angiogènics⁶³. Així, doncs, podríem definir una CPE com una cèl·lula que deriva principalment de la medul·la òssia, circula en el torrent sanguini, prolifera, i pot diferenciar-se cap a cèl·lula endotelial madura^{60,64-67}. Una vegada circulen en sang perifèrica, les CPE constitueixen un *pool* de cèl·lules que poden reparar activament la capa endotelial dels vasos sanguinis mitjançant la formació d'un pegat en els llocs danyats de la íntima^{68,69}. Aquests processos estan mitjançats per interaccions entre les CPE i les cèl·lules endotelials madures a través de l'expressió de molècules d'adhesió i de l'alliberament de quemoquines⁷⁰⁻⁷³. Quan el procés d'angiogènesi descrit abans té lloc de forma compensatòria, el desencadenant d'aquest procés clau és la reducció crítica del flux sanguini, i determinarà l'extensió de la isquèmia tissular residual. L'òrgan isquèmic, a través de l'alliberament de factors de creixement i citocines, estimula el moll d'os per que alliberi CPE que, a la vegada, es localitzaran de forma específica en els llocs danyats a través de l'expressió de receptors de quemoquines, i finalment estimularan la formació de nous vasos⁷⁴.

3.2. Caracterització i aïllament de les CPE.

No està encara definit de forma acurada quin conjunt de marcadors de superfície cel·lular caracteritzen exclusivament les CPE, havent-hi per tant una manca d'estandardització quant a la seva identificació exacta. Les principals fonts per a l'isolament de CPE són la medul·la òssia i la sang perifèrica, per bé que també s'han identificat en sang procedent de cordó umbilical o a la melsa. Tant les cèl·lules

endotelials madures com les CPE són extremadament rares en la sang perifèrica de l'adult, representant entre un 0.01% i 0.0001% de les cèl·lules mononuclears perifèriques⁷⁵, lo qual ha contribuït a la dificultat en ser precisos en la seva identificació i aïllament. El descobriment dels anticossos monoclonals i la utilització de la immunoselecció per feix magnètic i/o el FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) han possibilitat l'aïllament, enumeració i caracterització de les cèl·lules circulants.

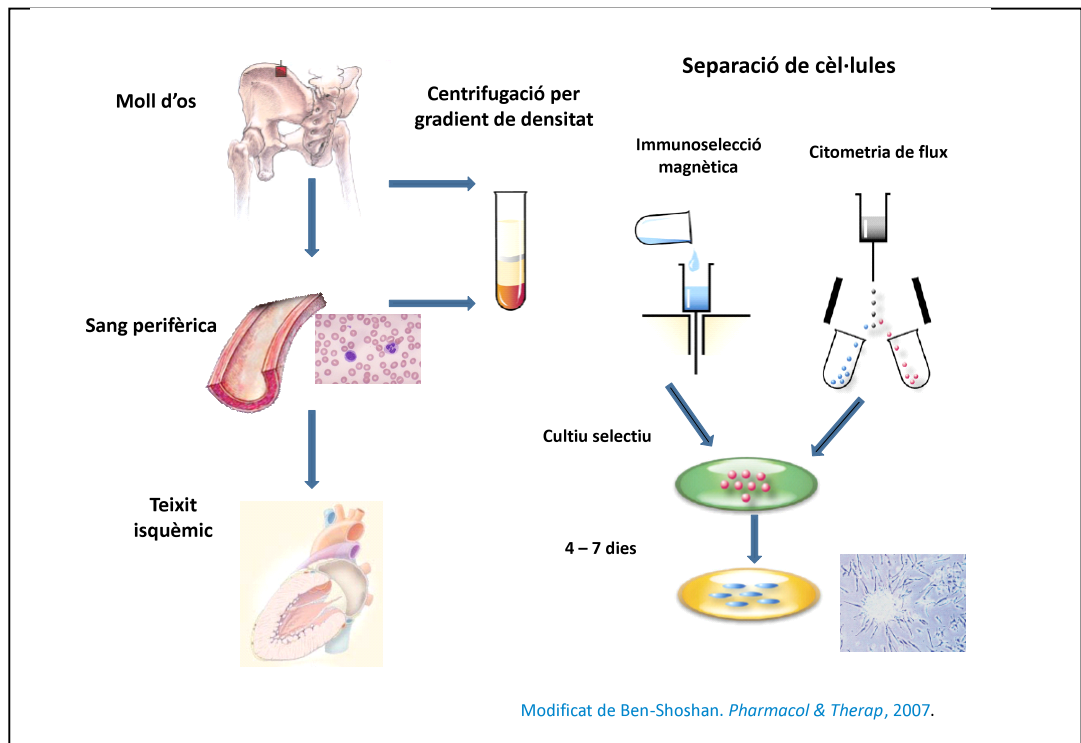
Després del seu descobriment inicial, les CPE s'han caracteritzat repetidament utilitzant gran heterogeneïtat de mètodes, que diferien marcadament en el mètode d'isolació cel·lular. Malgrat aquestes diferències, els investigadors han utilitzat sovint el terme genèric de "CPE" o "angioblast" per descriure les seves respectives poblacions cel·lulars⁷⁶. Aquests trets diferenciadors inclouen l'expressió de CD34^{58,77}, expressió de CD133⁷⁸, expressió concomitant de CD133 i del receptor-2 del factor de creixement endotelial vascular (VEGFR-2)^{79,80}, cèl·lules relacionades amb monòcits/macròfags amb expressió de CD14 i amb mínima expressió de CD34⁸¹, o les característiques morfològiques i/o adherents de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica o de cèl·lules mononuclears derivades de la medul·la òssia al cultivar-les sota condicions específiques⁸²⁻⁸⁴. En certa manera, continua el debat quant a la caracterització precisa de les diferents poblacions cel·lulars i les seves possibles relacions jeràrquiques⁸⁵ però els termes "CPE" i "angioblast" s'han considerat conjuntament a nivell popular per designar 1) cèl·lules progenitores d'una estirp determinada que només donaran lloc a endoteli; 2) cèl·lules oligopotencials que poden diferenciar-se a endoteli i altres elements dels vasos ja formats (perícits, cèl·lules musculars llises, fibroblasts, etc); i 3) poblacions de cèl·lules no progenitores que contribueixen a la formació de nous vasos, no directament sinó a través de mecanismes paracrins o d'altres⁶³. De totes maneres, la utilització indistinta d'aquests dos termes és científicament poc acceptable, per lo que semblaria raonable limitar el terme "angioblast" per denominar a les cèl·lules precursoras que donen lloc a la vasculogènesi embrionària, mentre que el terme CPE s'aplicaria a la cèl·lula progenitora d'estirp restringida que donarà lloc només a elements endotelials i que és capaç de formar capil·lars i de reparar l'endoteli preexistent⁷⁶.

Donades les diverses caracteritzacions utilitzades per a identificar les CPE, l'any 2000 es va intentar un consens quant als fenotips endotelials, i es van descriure les CPE com a aquelles que expressaven CD34, AC133 (o el que és el mateix CD133) i VEGFR-2^{86,87}, fenotip que ha estat àmpliament acceptat per a definir les CPE^{88,89}. Això és força concordant amb els estudis inicials que van identificar les CPE pel model d'expressió dels marcadors de superfície cel·lular, que incloïen VEGFR-2, AC133, CXCR4, CD34, i c-Kit i l'absència de marcadors d'estirps més definidament hematopoètiques. Més recentment s'ha proposat un altre protocol per estandarditzar la quantificació de les CPE, basant-se en la utilització d'anticossos enfront de VEGFR-2, CD133, CD34 i CD45⁹⁰.

Les CPE humanes, doncs, s'han aïllat a partir de poblacions CD34+ o CD34+/VEGFR-2+ (també s'ha utilitzat AC133 enlloc de o junt amb VEGFR-2); després de l'administració a rates s'ha vist com es diferenciaven *in vivo* cap a cèl·lules endotelials junt amb vasos que expressaven els marcadors endotelials PECAM (CD31) o factor de von Willebrand⁵⁵. En canvi, l'administració intravenosa de cèl·lules endotelials madures no va aconseguir la seva implantació en els llocs de neovascularització⁵⁸. Així, es va demostrar que les cèl·lules endotelials madures eren funcionalment diferents de les CPE derivades del moll d'os⁹¹.

Amb el que hem descrit fins ara quant a la caracterització de les CPE, podem donar pas a la descripció dels mètodes que utilitzarem per identificar i quantificar aquestes CPE. Bàsicament hi ha dues tècniques per l'estudi de les CPE: la citometria de flux de mostres fresques de sang perifèrica i el cultiu cel·lular⁶⁵. (Figura 2).

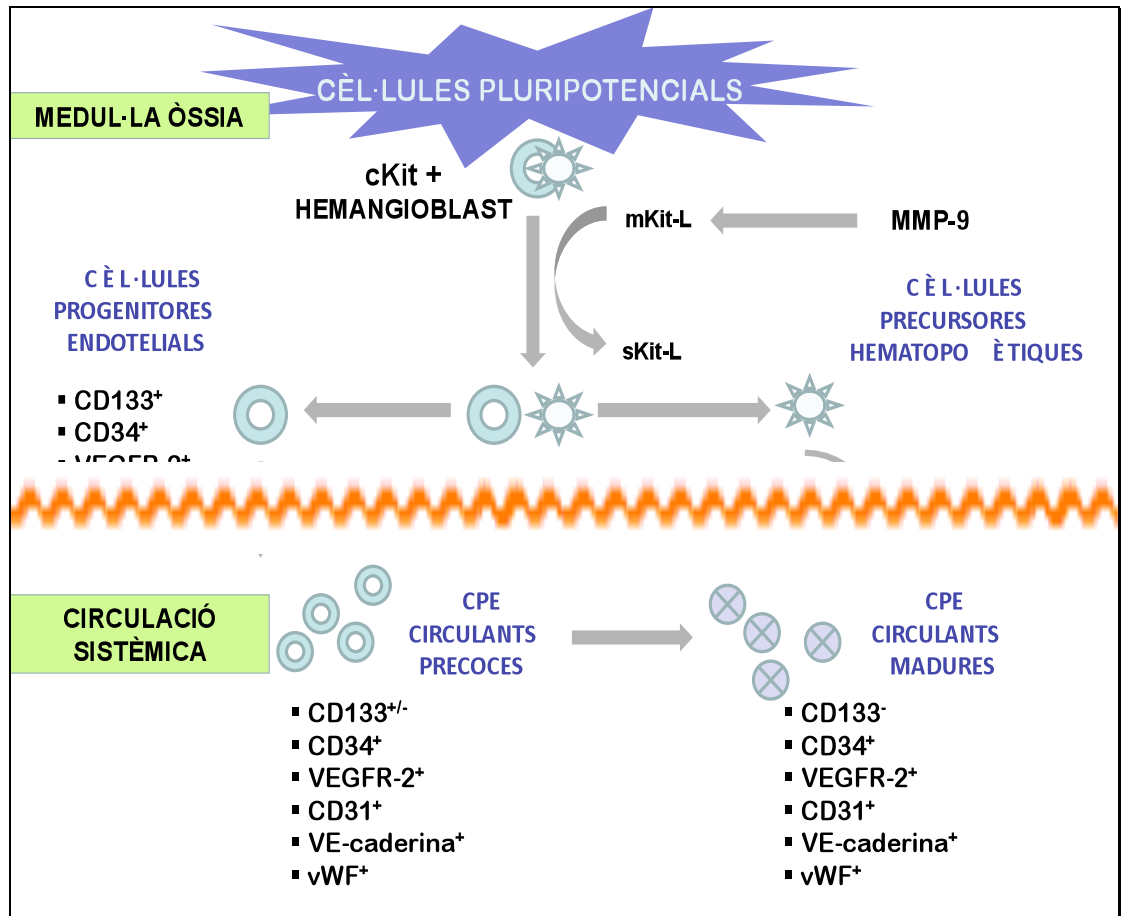
Figura 2: Tècniques d'obtenció i identificació de cèl·lules progenitores endotelials. Modificat de Ben-Shoshan⁹⁷.



El recompte cel·lular per citometria de flux es basa en el marcatge immunològic de les cèl·lules amb anticossos dirigits contra antígens de superfície o intracel·lulars. Aquest mètode té dues importants limitacions: en primer lloc, com hem dit abans, no coneixem el fenotip antigènic precís de les CPE, sobretot degut a que es superposa amb el d'altres estirps cel·lulars, motiu pel qual caldria referir-s'hi sempre com a "CPE putatives" o suposades CPE. En segon lloc, la definició de CPE per aquest mètode implica una abstracció conceptual, doncs s'atribueix una funció suposada a un fenotip antigènic relativament simple. De fet, donada la raresa de les CPE circulants es fa necessari la utilització d'un número molt limitat d'antígens de superfície. En conseqüència, assegurar que un fenotip basat en 2 o 3 antígens identifica de forma definitiva una població cel·lular amb una funció complexa és gairebé impossible. No obstant, degut a la seva sensibilitat, especificitat i reproductibilitat, la citometria de flux s'accepta actualment com el millor mètode per a obtenir dades purament quantitatives respecte a les CPE putatives en sang perifèrica. Per definir el fenotip antigènic de les CPE d'acord amb el terme

“progenitors endotelials” cal utilitzar almenys un *marcador d’immaturitat* i almenys un *marcador d’estirp endotelial*. Dins dels primers, CD34 i CD133 (AC133 en humans) són, com hem vist, els que més s’han utilitzat. CD34 s’expressa en cèl·lules mare hematopoètiques i en l’endoteli activat de determinada microvasculatura, mentre que CD133 s’expressa selectivament en la medul·la hematopoètica i en les cèl·lules progenitores; les cèl·lules CD133+ mantenen la capacitat de diferenciar-se en múltiples fenotips, incloent l’endoteli. Quant als *antigens endotelials*, dins dels més típics cal assenyalar KDR (*Kinase-insert Domain Receptor* en humans, que representa un receptor tipus 2 del factor de creixement endotelial vascular, VEGFR-2), CD31, també conegut com a molècula d’adhesió de cèl·lules endotelials-plaquetes (PECAM-1) i el fvW. Les cèl·lules CD34+KDR+ podrien ser cèl·lules immadures amb potencial endotelial i, per tant, representarien CPE putatives o hemangioblasts post-natals. A diferència de CD34, CD133 no s’expressa mai en les cèl·lules endotelials madures i, per tant, les cèl·lules CD133+KDR+ podrien correspondre millor a les CPE. No obstant, al ser més immadures, aquestes cèl·lules són més difícils d’identificar en la circulació en situació basal. Ambdós poden considerar-se fenotips antigènics putatius de CPE, i la intersecció entre els dos (CD34+CD133+KDR+) podria ser utilitzada com a fenotip restrictiu de les CPE, tot i que són més difícils encara de detectar en la circulació^{65,87}. De fet, s’ha enraonat de dues poblacions de CPE putatives, les *CPE precoces* i les *CPE tardanes*, encara que probablement es tracti de diferents moments evolutius de les mateixes cèl·lules^{76,83}. Es podria dir que les CPE funcionals precoces expressen CD34, CD133 i VEGFR-2, i es localitzen predominantment en la medul·la òssia o en la circulació sistèmica immediatament després de la seva migració a la mateixa⁶¹. Posteriorment, en algun moment durant la seva transmigració cap a la circulació sistèmica, o més tard durant la seva circulació, les CPE comencen a perdre CD133. En una fase més tardana, en el procés de maduració de les CPE, expressaran CD34, VEGFR-2, CD31, caderina endotelial vascular i començaran a expressar fvW i la forma endotelial de l’òxid nítric sintasa (Figura 3).

Figura 3. Origen i maduració de les CPE. Caracterització fenotípica en els diferents estadis evolutius.



Modificat de Hristov. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003.

Abreviatures: **CPE** = cèl·lules progenitores endotelials; **MMP-9** = metaloproteïnasa-9 de matriu; **mKit-L** = Ligando Kit de membrana; **sKit-L** = Ligando Kit soluble; **VEGFR-2** = receptor tipus 2 del factor de creixement endotelial vascular; **vWF** = factor de von Willebrand.

Aquestes característiques fan suggerir que les CPE precoces és un grup heterogeni de cèl·lules que es diferencien des d'hemangioblasts cap a cèl·lules madures. En canvi, les CPE tardanes són homogènies i ben diferenciades⁸³. També s'ha dit que les CPE precoces derivarien d'una subpoblació de cèl·lules mononuclears procedents de sang perifèrica CD14⁺^{64,75,76,82,84}. D'altra banda⁹², en les CPE precoces madures, >99% de les cèl·lules nucleades són cèl·lules hematopoètiques CD45⁺. Altres autors^{76,83,93,94} justifiquen també la utilització del marcador panleucocitari CD45 almenys per identificar les CPE precoces, doncs sembla que aquestes anirien perdent progressivament l'expressió de CD45 i CD31,

encara que a vegades s'ha recomanat no utilitzar-lo doncs la seva sovint dèbil positivitat pot afavorir la confusió⁷⁵.

Respecte a la quantificació de les CPE putatives en sang perifèrica, pràcticament no hi ha dades publicades a la literatura quant als valors de normalitat, probablement degut a la gran heterogeneïtat en la seva definició fenotípica. Smythe i col.⁹⁵ van definir les CPE com a CD133+/CD144+/VEGFR-2+/CD45^{baix/-} i amb això van proposar com a valors de normalitat els que ells van trobar en sang perifèrica de població general, 44 ± 58 CPE/mL. També en subjectes humans sans, Peichev i col.⁷⁹ van situar el número de CPE post-natals circulants precoces CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺ al voltant del 0.002% del total de cèl·lules mononuclears en sang perifèrica, corresponents aproximadament a 70-210 CPE/mL. No obstant, això caldria confirmar-ho en altres estudis, sobretot si s'arriba definitivament a un consens quant a la definició de CPE i els seus marcadors, a la vegada que diversos investigadors consideren que la quantificació de CPE s'hauria d'enumerar com a número de cèl·lules per número total d'"esdeveniments" citomètrics més que no pas per unitat de volum⁶⁵.

S'ha suggerit també que altres dos grups cel·lulars, cèl·lules progenitores adultes multipotencials i certes cèl·lules d'estirp monocítica, poden arribar a diferenciar-se cap a la línia endotelial, i per tant exercir com a CPE. Aquestes cèl·lules semblen millorar la revascularització i participar directament en la vasculogènesi *in vivo*⁵⁷.

Com hem dit a l' inici d'aquest apartat, a més de la citometria de flux existeix un altre mètode important a l'hora d'identificar i quantificar les CPE: el cultiu. L'anàlisi *ex vivo* de les cèl·lules sanguínies per citometria de flux només pot comptar CPE i quantificar l'expressió d'un número limitat d'antígens de superfície o intracel·lulars. Per tal d'obtenir dades qualitatives, caldrà aïllar les CPE del torrent circulatori i expandir-les en cultiu. Hi ha també diferents protocols quant al cultiu de les CPE⁶⁵. La majoria d'investigadors accepten com a CPE aquelles cèl·lules adherents que després de 4 dies de cultiu en medi apropiat manifesten capacitat per captar la lipoproteïna de baixa densitat acetilada (Ac-LDL-Dil), així com la lectina *Ulex europaeus*. Per a evitar la contaminació sovint s'eliminen les cèl·lules no-adherents a les 24-48 hores i es tornen a cultivar les restants, contant-ne el número de colònies de CPE després de 7 dies de cultiu. Per quantificar-les, molts dels autors han identificat les unitats formadores de colònies de CPE com a aquells conjunts de cèl·lules arrodonides centrals amb cèl·lules en forma de fus en la perifèria. Això ha

estat així sobretot a partir dels treballs de Hill i col.⁹⁶ Altres grups de recerca, però, prefereixen evitar el pre-semblar les cèl·lules i cultivar-les durant 2 setmanes⁶⁵. Aquests investigadors creuen que la citometria de flux de les CPE té poc a veure amb el cultiu de les mateixes, i que probablement lo millor seria pre-seleccionar les cèl·lules d'acord amb els marcadors de CPE (bàsicament CD34 i/o KDR) abans de cultivar-les. També consideren que l'aïllament de les CPE per protocols de cultiu s'hauria de reservar a l'estudi de la funció de les CPE en un context clínic o condició experimental, recordant que els cultius no són la millor font per contar les CPE circulants. Sí hi ha coincidència majoritària quant a l'existència de dues poblacions de CPE. Ambdues són acLDL+lectina+, però les CPE tardanes expressen una densitat més elevada de marcadors d'estirp endotelial i tenen un potencial vasculogènic superior al de les CPE precoces.

Existeixen a més unes capacitats funcionals que ajuden a identificar les CPE, com és la capacitat d'adherir-se i de formar tubs capil·lars en una matriu, la capacitat de migrar cap als estímuls angiogènics o la capacitat de proliferar⁹⁷. Després de la seva adhesió inicial *in vitro*, les CPE comencen a perdre les seves característiques progenitores i comencen a diferenciar-se. Les CPE formen monocapes d'apariència endotelial en unes 3 o 4 setmanes. En el cas del cultiu d'aquestes cèl·lules, les CPE precoces apareixerien cap als 7 dies de cultiu, amb un pic cap a les 2-3 setmanes a partir del qual ja no poden expandir-se més^{82,83}. En canvi, les CPE tardanes no apareixerien en cultiu abans de les 2-3 setmanes, creixen de forma exponencial a les 4-8 setmanes i poden encara continuar expandint-se.

En resum, les CPE tal i com es coneixen ara per ara co-expressen antígens hematopoètics i endotelials i tenen un potencial proliferatiu limitat.

3.3. Relació de les CPE amb factors de risc cardiovascular clàssics i nous.

La majoria dels factors de risc cardiovascular clàssics per aterosclerosi han demostrat efectes negatius sobre el número i funció de les CPE⁷³. En general, s'accepta que la modulació negativa de les CPE és un mecanisme pel qual els factors de risc empitjoren la salut cardiovascular⁹⁸. No hi ha estudis sistemàtics que avaluïn les variacions fisiològiques en el número de CPE en els subjectes sans. Diversos estudis han demostrat que el número i funció de les CPE *in vivo* poden estar determinats per diferents factors:

Factors fisiològics:

- **Edat:** l'envelliment s'associa amb un número reduït de CPE circulants, tant en individus sans⁹⁹ com en aquells amb patologia coronària, lo qual podria accelerar el desenvolupament d'aterosclerosi, especialment en presència de factors de risc^{56,100,101}. L'associació entre edat avançada i modulació negativa de les CPE pot estar en relació amb diverses causes, com l'acció dels factors de risc concomitants, l'esgotament de la reserva del moll d'os o l'envelliment i apoptosi de les pròpies CPE. L'efecte de l'envelliment sobre les CPE sembla incidir en els seus trets funcionals més que no pas en la seva depleció, almenys en població sense factors de risc cardiovascular¹⁰².
- **Estrògens:** experiments en animals basats en el tractament amb 17 β -estradiol de ratolins ovariectomitzats (sempre i quan no hi hagi un dèficit d'eNOS)¹⁰³ i observacions en humans, concretament en dones, han demostrat una correlació entre els estrògens i els nivells de CPE circulants¹⁰⁴. Un dels mecanismes postulats com a responsable de la major protecció cardiovascular que s'observa en la població femenina en edat fèrtil respecte als homes és precisament els nivells més elevats de CPE com a conseqüència de la mobilització cíclica de les mateixes per a mantenir l'homeòstasi endometrial¹⁰⁵.
- **Exercici físic:** la seva pràctica regular s'associa amb un increment en el número de CPE circulants en subjectes sans i en els afectes de malaltia coronària¹⁰⁶, a la vegada que en aquests darrers millora la funció vascular i la síntesi d'òxid nítric¹⁰⁷.

Fàrmacs i citocines:

- **Citocines** que promouen la proliferació i mobilització perifèrica granulocítica, com el factor estimulant de colònies de macròfags–granulòcits (*GM-CSF*), poden semblantment afectar la mobilització de CPE⁷⁹, com també succeeix amb altres factors com *bFGF* (factor bàsic de creixement de fibroblasts), *angiopoetina-1* o el *factor de creixement placentari*⁶².

També són potents agents mobilitzadors de CPE aquells factors que mostren capacitat per a millorar la disfunció de les cèl·lules endotelials i la biodisponibilitat d'òxid nítric, com són:

- ***Inhibidors de l'HMG-CoA reductasa (estatinas):*** estudis experimentals i clínics han mostrat que alguns d'aquests fàrmacs (simvastatina, atorvastatina) donen lloc a un augment en el número de CPE circulants, sembla que en relació amb l'expressió de molècules d'adhesió en la superfície de les CPE¹⁰⁸ i la mobilització d'aquestes via P13 kinasa-Akt, contribuint així a l'angiogènesi i a la reendotelització^{100,109,110}.
- ***Eritropoetina:*** s'ha descrit una correlació directa entre els nivells d'eritropoetina i el número de CPE i la seva activitat funcional^{111,112}.
- ***Blocadors del sistema renina-angiotensina:*** alguns inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina (ramipril) i antagonistes dels receptors d'angiotensina II (olmesartan, irbesartan, valsartan o candesartan) incrementen el número i capacitat funcional de les CPE independentment dels efectes sobre la pressió arterial, a diferència d'altres grups de fàrmacs antihipertensius (com els β -blocadors)¹¹³⁻¹¹⁶.
- ***Agonistes dels receptors- γ dels proliferadors activats del peroxisoma:*** alguns com rosiglitazona semblen augmentar el número i activitat migratòria de les CPE en malalts amb diabetis tipus 2¹¹⁷.

Factors patològics:

- ***Dislipèmia:*** en subjectes sans amb nivells elevats de colesterol s'ha observat una disminució significativa en el número d'unitats formadores de colònies de CPE. En malalts amb coronariopatia es va demostrar una correlació inversa entre els nivells plasmàtics d'LDL-colesterol i el número i propietats funcionals de les CPE circulants^{59,96,100}. És possible que hi estiguin implicats mecanismes com la inactivació de telomerasa o l'alteració en la diferenciació de CPE induïda per VEGF via desactivació d'Akt, en relació amb l'acció d'LDL-oxidades¹¹⁸.

- **Hipertensió:** en pacients amb patologia coronària va resultar ser el predictor més potent d'una capacitat migratòria minvada de les CPE¹⁰⁰ i també s'ha relacionat la reducció de l'activitat de telomerasa, i per tant el grau d'envelliment de les CPE, amb un índex de severitat d'hipertensió¹¹⁹. No obstant, en la majoria d'estudis duts a terme fins ara no s'ha pogut demostrar la seva relació amb la modulació del número de CPE circulants^{120,121}. Així, Werner i col. van estudiar 507 malalts amb malaltia coronària aguda (432 d'ells amb hipertensió arterial) i no van trobar associació entre el número de CPE i la presència d'HTA⁵⁹. I de forma semblant tampoc es va trobar aquesta associació en un grup de 36 malalts amb hipertensió arterial essencial respecte als controls normotensos¹²².
- **Diabetis mellitus:** en diabetis tipus 1 i en diabetis tipus 2 s'ha observat una modulació negativa de les CPE tant pel que fa al seu número com a la seva funció^{59,96,123}. Existeix, a més, una relació inversa entre els nivells d'hemoglobina glicosilada i l'adhesió de les CPE a cèl·lules endotelials, la seva incorporació a estructures tubulars endotelials i l'alliberament paracrí de factors pro-angiogènics^{124,125}.
- **Insuficiència renal:** s'ha constatat una disminució en el número de CPE circulants en relació amb la disfunció renal, així com el seu increment amb el tractament substitutiu renal^{126,127}.

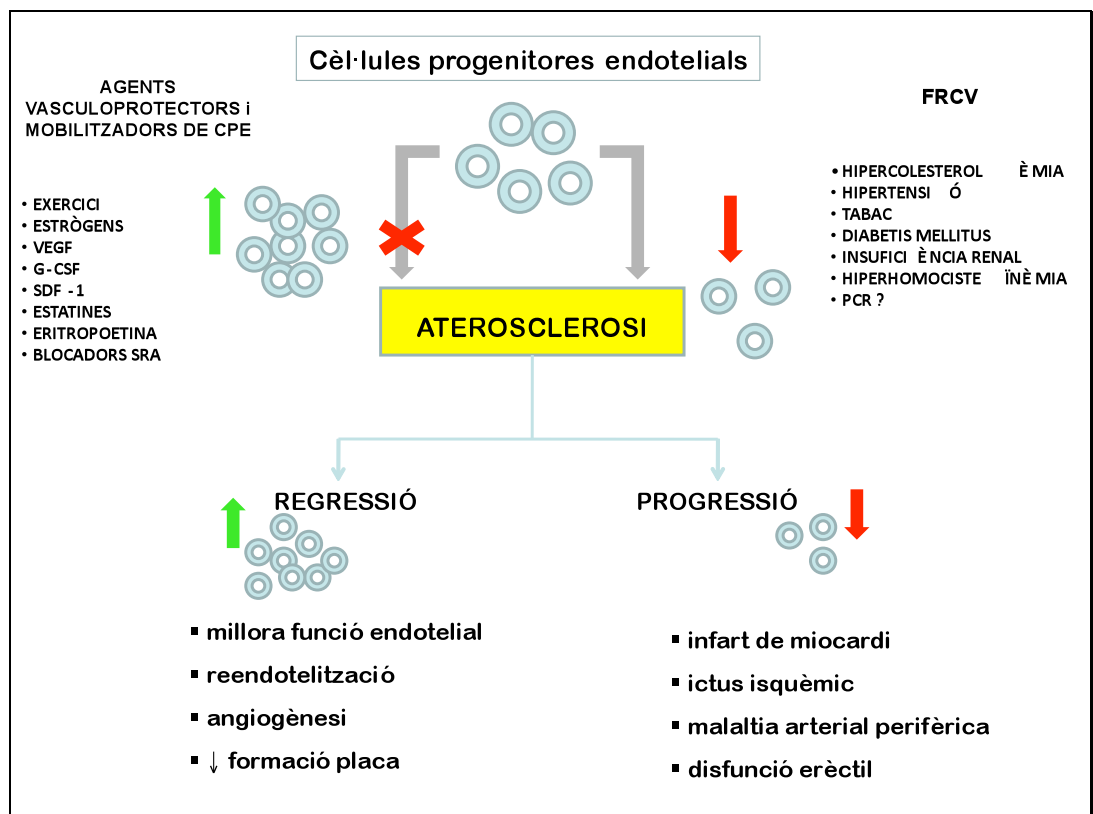
Altres factors:

- **Tabac:** concentracions elevades de nicotina tenen acció citotòxica i s'ha vist que les CPE de fumadors tenen una capacitat per formar colònies disminuïda, així com mort prematura en medi de cultiu adequat^{56,100,128,129}.
- **Homocisteïna:** diversos autors han trobat una correlació inversa entre el número i activitat de CPE i nivells plasmàtics d'homocisteïna^{130,131}.
- **ADMA (asymmetric dimethylarginine):** *in vitro* s'ha demostrat que els nivells circulants d'aquest inhibidor endogen de l'òxid nítric sintasa es correlacionen inversament amb el número de CPE i inhibeix la funció de les mateixes¹³².

- **Proteïna C-reactiva (PCR):** hi ha certa controvèrsia quant a la relació de la PCR amb les CPE. Sembla que la PCR podria inhibir la proliferació, supervivència, diferenciació i funció de les CPE, així com afavorir l'apoptosi mitjançant una disminució en l'expressió d'òxid nítric sintasa endotelial^{59,117,126}.

La Figura 4 mostra els diferents factors que es coneix modulen de forma positiva o negativa les CPE i el seu lligam amb el desenvolupament d'aterosclerosi.

Figura 4. Acció dels diferents moduladors positius o negatius sobre les CPE i relació entre aquestes i l'aterosclerosi i la lesió d'òrgan diana.



Abreviatures: **FRCV** = factors de risc cardiovascular; **CPE** = cèl·lules progenitores endotelials; **VEGF** = vascular endothelial growth factor; **G-CSF** = granulocyte-colony stimulating factor; **SDF-1** = stromal-derived factor-1; **SRA** = sistema renina-angiotensina; **PCR** = proteïna C-reactiva.

La Taula 2 resumeix l'associació dels diferents factors de risc cardiovascular amb el nombre de CPE circulants i/o la seva proliferació en cultiu.

Taula 2. Associacions entre els diferents factors de risc cardiovascular i les CPE.

Factor de risc	Estudi	Pacients	Efecte en nº CPE	Efecte en la funció de les CPE
Edat	<i>Schmidt-Lucke (56)</i>	sans / m. cor.	↓ CD34+KDR+	ND
	<i>Hill (96)</i>	sans	↓ UFC	ND
	<i>Heiss (102)</i>	sans	~ CPE	↓ proliferació, migració, supervivència
	<i>Scheubel (101)</i>	m. cor. estable	↓ CD34+AC133+	↓ mobilització
Dislipèmia	<i>Hill (96)</i>	sans	↓ UFC	ND
	<i>Chen (131)</i>	m. cor.	↓ en cultiu	↓ proliferació, migració, adhesió, capacitat vasculogènica <i>in vitro</i>
	<i>Pellegatta (133)</i>	sans	↓ UFC	ND
	<i>Vasa (100)</i>	m. cor.	↓ CD34+KDR+ / ~ UFC	↓ migració
Diabetis	<i>Loomans (124)</i>	DM-1	↓ en cultiu	↓ capacitat vasculogènica <i>in vitro</i>
	<i>Tepper (125)</i>	DM-2	↓ en cultiu	↓ capacitat vasculogènica <i>in vitro</i>
	<i>Pistrosch (134)</i>	DM-2	~ CPE	↓ migració
Tabac	<i>Vasa (100)</i>	m. cor.	↓ CD34+KDR+ / ↓ UFC	~ migració
	<i>Kondo (129)</i>	sans	↓ CD45 ^{low} CD34+CD133+KDR+	ND
Hipertensió	<i>Vasa (100)</i>	m. cor.	~ CPE	↓ migració
	<i>Delva (122)</i>	HTA essencial	~ CPE	~
Hcy	<i>Chen (131)</i>	sans	↓ en cultiu	↓ proliferació, migració, adhesió, capacitat vasculogènica <i>in vitro</i>
ADMA	<i>Thum (132)</i>	m. cor.	↓ CD34+CD133+ / ↓ UFC	↓ diferenciació, capacitat vasculogènica <i>in vitro</i> , activitat òxid nítric sintasa

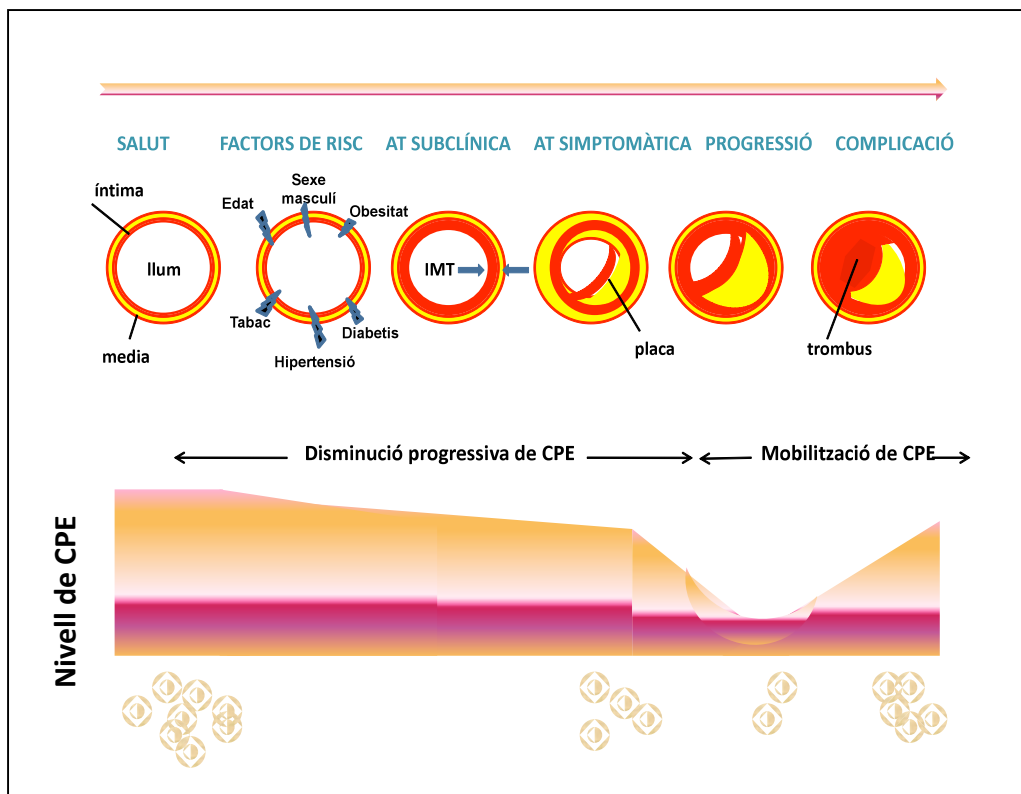
Abreviatures: **CPE**= cèl·lules progenitores endotelials; **m.cor.** = malaltia coronària; **ND** = no determinat; **UFC** = unitat formadora de colònies; (~) = sense canvis; **HTA** = hipertensió arterial; **Hcy** = homocisteïna; **ADMA** = dimetilarginina asimètrica.

3.4. Relació de les CPE amb la disfunció endotelial i el procés aterosclerós.

La paret arterial es pot mantenir en condicions adequades enfront a les múltiples noxes circulants i locals en tant en quant la seva capacitat de reparació derivada del moll d'os, que inclou les CPE competents i probablement progenitors d'altres estirps, romanguí intacta. L'envelliment de determinats processos del moll d'os, accelerat pel pas del temps en presència de factors de risc, pot conduir a la seva incapacitat per produir CPE i altres progenitors amb capacitat reparadora, lo que portarà a la disfunció endotelial i a la gènesi d'aterosclerosi¹³⁵. Així, Hill i col. van mostrar com el número d'unitats formadores de colònies de CPE es correlacionava amb la funció endotelial mesurada per DMF en l'artèria braquial en homes sans amb diferents graus de risc cardiovascular⁹⁶. També en homes joves sans d'origen sudasiàtic residents al Regne Unit es va objectivar com el número de CPE era el principal predictor de la DMF¹³⁶. I, anant un pas més enllà de la disfunció

endotelial, el treball de Lau i col. va mostrar com en un grup de malalts que havien patit un ictus es va objectivar una reducció dels nivells circulants de CPE respecte a un grup control sa, reducció que es correlacionava amb aterosclerosi a nivell carotídi, manifestada tant per un increment del gruix íntima-media carotídi com per la presència de placa carotídi¹³⁷. També altres autors com Eizawa han relacionat els nivells circulants de CPE disminuïts amb el procés ateromatós¹³⁸, o com Hughes que va demostrar major calcificació coronària i major gruix íntima-media femoral en homes europeus i sudasiàtics amb i sense malaltia coronària coneguda, en relació amb una reducció de CPE i amb independència d'altres factors confusors possibles¹³⁹. La Figura 5 ens mostra d'una forma esquemàtica l'evolució dels nivells de CPE d'acord amb les diferents fases del procés d'aterosclerosi.

Figura 5: Esquema de la concentració de CPE d'acord amb la progressió del procés d'aterosclerosi (Adaptada de Fadini⁷³).



Abreviatures: **CPE** = cèl·lules progenitores endotelials; **AT** = aterosclerosi; **IMT** = gruix íntima-media carotídi.

3.5. Relació de les CPE amb els marcadors d'inflamació.

Cada vegada hi ha més evidència que una resposta inflamatòria transitòria i limitada pot constituir un estímul per a la mobilització de les CPE, mentre que l'estimulació

inflamatòria excessiva o persistent pot tenir efectes deleteris, donant lloc a una reducció de CPE en la circulació^{140,141}. Donat que el procés de reparació endotelial s'origina en el moll d'os mitjançant el reclutament de citocines, factors de creixement i altres elements pro-inflamatoris [MCP-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α (factor de necrosi tumoral), PCR i interferó- γ], el procés de reparació pot donar lloc a l'amplificació progressiva dels senyals inflamatoris degut a la manca de retroalimentació negativa, lo qual a la vegada agreujarà la reacció inflamatòria, danyant la paret arterial. Així, l'elevació de marcadors no només reflecteix la intensitat de la inflamació ateroscleròtica, sinó que pot ajudar a identificar els individus amb reparació arterial insuficient¹⁴². A més, alguns d'aquests marcadors inflamatoris semblen estar implicats en la regulació de l'hematopoesi i la interacció CPE-endoteli *in vitro*, principalment la selectina-E endotelial¹⁴³ i MCP-1¹⁴⁴. També Fan i col. van objectivar *in vitro* l'estimulació per part d'IL-6 de l'angiogènesi mitjançada per CPE procedents de sang perifèrica d'adults¹⁴⁵.

3.6. Valor pronòstic de les CPE.

Les CPE poden participar no només en la formació de nous vasos sanguinis sinó també en el manteniment de la integritat i la funció de l'endoteli vascular, mitigant per tant els processos patològics com l'aterosclerosi¹⁴⁶. En aquest sentit, s'ha objectivat una disminució en la disponibilitat i una disfunció de les CPE tant en relació amb els factors de risc, com ja hem vist, però també en el context de la malaltia cardiovascular^{147,148}. Treballs recents assenyalen la implicació de les CPE en la isquèmia i l'infart miocardiàc, isquèmia d'extremitats inferiors, cicatrització de ferides, aterosclerosi, reparació endotelial endògena o la vascularització tumoral⁵⁷. En els darrers anys s'ha investigat en la hipòtesi que les CPE poden anar als llocs d'isquèmia tissular i participar en la vasculogènesi, incrementant per tant el flux sanguini cap a aquestes àrees i preservant o restaurant la funció dels òrgans afectats¹⁴⁹. Per tant, en la fase aguda de la isquèmia en qualsevol territori de l'arbre vascular és habitual detectar inicialment un increment en el número de CPE^{97,150-153}, com sembla succeir també en les fases precoces de la insuficiència cardíaca¹⁵⁴. De fet, tant a nivell experimental com clínic s'ha vist que l'increment de CPE circulants després d'un ictus isquèmic agut s'associa a una bona evolució funcional i a reducció de la grandària de l'infart^{155,156}. Quant a la seva capacitat pronòstica, en malalts sense evidència de malaltia cardiovascular hi ha una clara relació inversa

entre el seu risc cardiovascular d'acord amb el Framingham Risk Score i els nivells de CPE circulants⁹⁶. També s'ha observat que el número de CPE circulants és predictor de futures complicacions cardiovasculars i de mort cardiovascular en els malalts amb o sense malaltia coronària^{56,59} i també en aquells amb ictus isquèmic recent¹⁵⁷.

II. JUSTIFICACIÓ

II. JUSTIFICACIÓ

Les CPE estan guanyant acceptació de forma creixent com a importants marcadors de salut vascular. Aquestes cèl·lules progenitores, derivades fonamentalment del moll d'os, són d'importància cabdal en el manteniment de la integritat i funció de l'endoteli i en la neovascularització post-natal. Aquests processos són especialment importants, donat que l'endoteli madur té una capacitat regenerativa limitada i dependrà de la disponibilitat de les CPE per a la reparació vascular. El número i funció de les CPE, doncs, reflectiria l'equilibri entre la integritat i la reparació endotelial i es podrien utilitzar com a marcador intermedi de la funció endotelial.

A més de reflectir la integritat i l'homeòstasi vascular, les CPE han mostrat tenir un valor pronòstic quant a la possibilitat de patir complicacions cardiovasculars, però prèviament s'associen als fenòmens d'inflamació i d'aterosclerosi, de manera que en aquest context s'ha objectivat una modulació negativa de les CPE.

De manera semblant, s'ha observat una correlació inversa entre el número i funció de les CPE i els diversos factors de risc cardiovascular. Així, la diabetis, la dislipèmia, el tabaquisme, el sedentarisme, la hiperhomocisteïnèmia o la insuficiència renal, entre d'altres, s'han associat clarament amb una reducció en el número i funció de les CPE.

En el cas de la hipertensió arterial, s'ha observat una associació amb una disminució de la capacitat migratòria de les CPE en malalts coronaris. No obstant, no s'ha demostrat una correlació inversa amb el número de CPE. Creiem que seria lògic que hi hagués una reducció també en el número de CPE en els malalts amb hipertensió arterial, si bé això podria dependre del grau de severitat de la mateixa.

Se sap també que hi ha uns reguladors positius de les CPE, farmacològics o no, com són l'exercici físic, les estatines o els blocadors del sistema renina-angiotensina. És per tot això que pensem que pot ser d'importància l'objectiu de la present Tesi Doctoral, amb la finalitat de demostrar si en malalts amb HTA refractària, i per tant de grau sever, hi ha una reducció en els nivells circulants de CPE, si això es tradueix en una pitjor funció endotelial i per tant les CPE serien d'utilitat per determinar el risc d'aquests malalts, i si en conseqüència aquests són individus susceptibles d'un abordatge terapèutic diferent.

III. HIPÒTESI

III. HIPÒTESI

La hipertensió arterial s'ha associat en la majoria d'estudis amb alteració de la funció endotelial en la circulació perifèrica, coronària i renal, suggerint que això podria afavorir el desenvolupament i la progressió del dany vascular. No es coneix bé el o els mecanismes pels que la HTA dóna lloc a aquesta disfunció de l'endoteli vascular. D'altra banda, se sap que les cèl·lules progenitores endotelials juguen un paper important en la regeneració i manteniment de l'endoteli. Creiem que el número i/o funció de les CPE poden estar disminuïts en el pacients amb HTA, almenys en aquells amb HTA de grau més sever, en concret amb hipertensió arterial refractària, de la mateixa manera que estan disminuïts en presència d'altres factors de risc cardiovascular. En aquest treball volem demostrar que en els malalts amb HTA-R hi ha una disminució en el número i funció de les CPE.

A més, en aquesta Tesi Doctoral intentarem demostrar que aquesta alteració en el número i funció de les CPE en subjectes amb HTA-R es relaciona amb una disfunció de l'endoteli vascular i la consegüent alteració en la capacitat de vasodilatació arterial dependent d'endoteli, la qual cosa podria explicar, almenys en part, la major morbimortalitat cardiovascular àmpliament observada en aquest col·lectiu.

IV. OBJECTIUS

IV. OBJECTIUS

En aquesta Tesi Doctoral pretenem resumir els nostres estudis sobre la relació de les cèl·lules progenitores endotelials amb la hipertensió arterial, una patologia altament prevalent en la població general, i més concretament amb la hipertensió arterial refractària.

Ens plantegem els següents objectius principals:

1. Estudiar si existeix una alteració en les cèl·lules progenitores endotelials circulants en els malalts afectes d'hipertensió arterial refractària.
2. Estudiar si existeix una alteració en la proliferació de cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu en els malalts afectes d'hipertensió arterial refractària.
3. Analitzar si en malalts amb hipertensió arterial refractària existeix relació entre l'alteració de les cèl·lules progenitores endotelials circulants i la funció endotelial d'aquests malalts.
4. Analitzar si en malalts amb hipertensió arterial refractària existeix relació entre l'alteració de la proliferació de les cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu i la funció endotelial d'aquests malalts.

V. MATERIAL I MÈTODES

V. MATERIAL I MÈTODES

Per tal d'assolir els objectius del treball que aquí es presenta amb la finalitat de donar resposta a la hipòtesi plantejada, varem dur a terme dos estudis paral·lels. D'una banda, en un primer estudi (Estudi 1) ens varem centrar en avaluar la relació entre la HTA-R i el número de CPE circulants en sang perifèrica i també amb la seva proliferació després de cultiu, utilitzant un grup de subjectes normotensos com a grup control. En un segon estudi (Estudi 2), en un subgrup, la majoria, dels malalts amb HTA-R, es va analitzar a més si existia alteració de la vasodilatació arterial endoteli-dependent i si aquesta possible alteració es relacionava amb les CPE. Per tant, en el primer estudi es van examinar un grup de malalts amb HTA-R i un grup de subjectes normotensos, mentre que en el segon estudi l'avaluació va tenir lloc exclusivament en un subgrup dels malalts amb HTA-R.

1. SUBJECTES.

1.1. Subjectes amb hipertensió arterial refractària.

La població objecte d'aquest estudi van ser malalts seleccionats de forma consecutiva a la nostra Unitat d' Hipertensió Arterial del Servei de Nefrologia de l' Hospital del Mar de Barcelona amb diagnòstic clínic d' HTA-R, que acceptessin formar part de l'estudi i que en varen signar el consentiment informat. Prèviament, aquest projecte d'investigació havia rebut l'aprovació del Comitè Ètic del nostre centre.

D'acord amb les guies vigents^{1,2}, es va considerar que un subjecte estava afecte d' HTA-R quan la seva pressió arterial (PA) era ≥ 140 i/o 90 mmHg malgrat rebre un règim terapèutic adequat, és a dir, la indicació de mesures d'estil de vida saludables juntament amb una combinació adequada d' almenys tres fàrmacs de grups farmacològics diferents a dosis plenes, essent un d'ells un diürètic. El període mínim requerit de tractament estable d'acord amb aquesta definició, prèviament a la inclusió en l'estudi, es va establir en 3 mesos. En tots els casos es tractava d'hipertensió arterial essencial, havent-ne descartat les causes d'hipertensió arterial secundària.

Els subjectes eren homes i dones d'edats compreses entre els 35 i els 75 anys. No es van incloure malalts afectes de diabetis tipus 1 o 2 ni aquells amb

insuficiència renal en estadis 4 o 5, és a dir, amb filtrat glomerular estimat inferior a 30 mL/min, així com també es van excloure tots aquells subjectes que tenien patologia inflamatòria activa o neoplàstica coneguda o sospitada, doncs aquestes circumstàncies concomitants podien modificar per sí mateixes el número i funció de les CPE, objecte del nostre estudi. Amb el mateix raonament es van excloure també tots aquells malalts que havien patit algun esdeveniment cardiovascular en els sis mesos previs.

En cap cas es va modificar el tractament farmacològic dels malalts en aquest estudi transversal observacional.

1.2. Grup control: subjectes sans.

El grup control va consistir en un grup de subjectes voluntaris sans en els quals es va confirmar normotensió. Cap d'ells rebia cap tipus de tractament farmacològic, antihipertensiu o no. En ells es va procedir a determinació clínica de la PA segons es descriu a continuació, així com als mateixos estudis d'anàlisis sanguínies i urinàries, exceptuant la determinació de marcadors d'inflamació. Es van seguir els mateixos procediments que en els subjectes amb HTA-R per determinar els nivells circulants de CPE i la seva proliferació després de cultiu *in vitro*.

1.3. Dades demogràfiques, antropomètriques i clíniques dels subjectes amb hipertensió arterial refractària i dels subjectes sans.

En tots els subjectes de l'estudi es va realitzar recollida de dades clíniques i demogràfiques mitjançant revisió de les històries clíniques o anamnesi segons procedís. Les dades antropomètriques van ser enregistrades en la mateixa visita, la única d'aquest estudi transversal observacional, en que també es mesurava la PA i es feia les determinacions analítiques. Aquestes dades van ser predefinides de la següent manera:

1.3.1. Dades demogràfiques i antropomètriques.

Es va registrar l'edat de cada subjecte en el moment de l'estudi i el sexe. Es va determinar la talla (alçada en centímetres) i el pes (en kilograms) i es va calcular l'índex de massa corporal (IMC) d'acord amb la fórmula:

$$\text{IMC (Kg/m}^2\text{)} = \text{Pes (Kg)} / \text{talla}^2 \text{ (m}^2\text{)}$$

1.3.2. Dades clíniques.

En aquest estudi es van definir els diferents factors de risc de la següent manera:

Dislipèmia: si l'analítica mostrava nivells plasmàtics de colesterol total superiors a 220 mg/dL i/o de triglicèrids superiors a 150 mg/dL i/o bé quan el subjecte estava en tractament amb fàrmacs hipolipemians per diagnòstic previ de dislipèmia.

Tabaquisme: es va considerar tabaquisme actiu si durant almenys els 12 mesos previs a l'estudi el subjecte presentava un consum de tabac mantingut.

Sedentarisme: quan hi havia absència d'activitat física durant el lleure, segons informació aportada pel propi subjecte.

Antecedent cardiovascular major previ:

- * història de cardiopatia isquèmica i/o antecedent de cirurgia coronària o d'angioplàstia transluminal percutània.
- * accident cerebrovascular (excepte accident isquèmic transitori): confirmat per clínica i/o radiologia.
- * insuficiència cardíaca: amb confirmació clínica i radiològica.
- * malaltia vascular perifèrica: diagnòstic clínic i/o per tècniques d'ecografia-Doppler i/o angiologia.

Antecedent familiar de malaltia cardiovascular prematura: quan alguna de les patologies cardiovasculars majors esmentades (cardiopatia isquèmica, accident cerebrovascular, insuficiència cardíaca, malaltia vascular perifèrica) o bé l'antecedent d'hipertensió arterial havien estat diagnosticats en algun familiar de primer grau (pares, germans) abans dels 55 anys en el cas dels homes o abans dels 65 anys en el cas de les dones.

2. MESURA DE LA PRESSIÓ ARTERIAL.

2.1. Mesura clínica de pressió arterial.

La mesura clínica de la PA es va dur a terme en tots els casos seguint les recomanacions indicades per a la seva determinació, és a dir, amb el pacient assegut

còmodament en una cadira, amb l'esquena ben recolzada, i el braç descansant a l'alçada del cor, després de 5 minuts de repòs en aquestes condicions, estant en una habitació tranquil·la, sense soroll i amb temperatura ambient adequada. Prèviament, s'havia indicat l'abstinència en els 30 minuts previs de consum d'alcohol, cafè, tabac o altres substàncies que se sap poden interferir amb la mesura de la PA, així com de la realització d'exercici físic. En tots els casos es va procedir a realitzar 3 mesures de PA separades per intervals de 2 minuts, prenent com a xifra de PA clínica el promig de les dues darreres mesures preses en aquestes condicions. Es va considerar el diagnòstic d' HTA segons mesura de PA clínica quan, d'acord amb les condicions esmentades, la PA sistòlica era superior o igual a 140 mmHg i/o la PA diastòlica era superior o igual a 90 mmHg^{1,2}.

Per a la mesura clínica de PA es va utilitzar un aparell semiautomàtic oscil·lomètric, model Omron 705IT (HEM-759-E, Omron Corporation, Kyoto, Japan), validat per la *British Hypertension Society (BHS)* i per l' *Association for Advancement of Medical Instrumentation (AAMI)*¹⁵⁸. D'acord amb les recomanacions de les guies de mesura de la PA es van utilitzar manegots amb *cuff* de grandària adequada al perímetre braquial de cada subjecte i es va comprovar el calibratge adequat de l'aparell.

2.2. Monitoratge ambulatori de pressió arterial.

En tots els subjectes de la població a estudi es va dur a terme monitoratge ambulatori de pressió arterial durant 24 hores (MAPA-24hr) mitjançant aparell validat, model Spacelabs 90207 (Spacelabs Inc., Richmond, Washington, USA), correctament calibrat i utilitzant manegots amb *cuff* de grandària adequada al perímetre braquial de cada subjecte. Segons el protocol utilitzat i aplicat de forma sistemàtica, el braçal es va col·locar en el braç no dominant entre les 8 i les 10 hores, i el monitor va ser programat per enregistrar la PA cada 20 minuts durant les 24 hores, advertint al subjecte que havia de realitzar les activitats habituals que solia dur a terme en un dia laborable normal. Es va definir els períodes diürn i nocturn entre les 10 i les 20 h i entre les 0 i les 6 h, respectivament, i aquests períodes definits així són els que es van considerar per l'anàlisi posterior de les dades del total de la mostra. Es va considerar que un registre de PA de 24 hores era apte per ser inclòs en l'estudi quan hi havia un mínim del 80% de lectures vàlides.

En cas contrari, es va repetir el registre en un dia diferent sempre que el malalt ho acceptés, o en cas contrari aquest va quedar exclòs de l'estudi.

3. ANÀLISIS SANGUÍNIES I URINÀRIES.

3.1. Bioquímica.

Tots els procediments analítics en sang es van dur a terme a partir de l'extracció sanguínia feta en dejú entre les 7.00 h i les 9.00 h. Així, es va obtenir mostra de sèrum per fer-ne la determinació de *colesterol total*, *glucosa* i *triglicèrids* mitjançant mètode enzimàtic d'espectrofotometria i de les fraccions de *colesterol-HDL* (lipoproteïnes d'alta densitat) i *colesterol-LDL* (lipoproteïnes de baixa densitat) per mètode enzimàtic, mentre que es va utilitzar la colorimetria de Jaffé per determinar-ne la *creatininèmia*. A més a més, en sèrum es va determinar la concentració d'*eritropoetina* mitjançant electroquimioluminiscència. També mitjançant el mètode d'electroquimioluminiscència es va fer determinació en plasma d'*homocisteïna*. Quant a l'*hemoglobina glicosilada*, aquesta es va determinar per mètode d'HPLC (*high-performance liquid chromatography*).

D'altra banda, es va recollir mostra d'orina aïllada de la primera micció del matí per fer-ne la determinació del *quocient albúmina/creatinina en orina* (QACO). La tècnica utilitzada va ser la immunoturbidimetria i la colorimetria per determinar-ne l'albúmina i la creatinina, respectivament. Es va realitzar dues determinacions del QACO separades entre 1-4 setmanes i en cas de diferències > 20% se'n va realitzar una tercera, prenent com a valor el promig de les dues determinacions més concordants. Per l'obtenció d'aquest paràmetre analític es va descartar aquelles circumstàncies que podien alterar-ne el resultat, bàsicament infecció urinària concomitant, hematúria, síndrome febril, insuficiència cardíaca congestiva o exercici físic intens previ.

3.2. Marcadors d'inflamació.

La *proteïna C-reactiva d'alta sensibilitat* va ser determinada mitjançant immunonefelometria. D'altra banda, es va utilitzar el mètode coaglatiu per fer-ne la determinació de *fibrinogen* en plasma.

Per la determinació dels següents marcadors d'inflamació, *molècula d'adhesió cel·lular vascular soluble tipus 1 (sVCAM-1)*, *molècula d'adhesió intercel·lular*

soluble tipus 1 (sICAM-1), e-selectina, p-selectina, i proteïna quimiotàctica de monòcits tipus 1 (MCP-1), les mostres de sang es van obtenir també en dejú entre les 7.00 h i les 9.00 h i després de centrifugar-les van ser emmagatzemades a -70°C fins el moment del seu anàlisi, el qual es va fer per duplicat mitjançant un assaig immuno-enzimàtic absorbent (ELISA), utilitzant *kit* comercial disponible per aquest tipus de determinació (ELISA assays, R & D Systems, Minneapolis, MN).

3.3. Altres.

Es va fer determinació d'*insulina* en sèrum per mètode d'electroquimioluminiscència. Aquest paràmetre va ser determinat només en el grup de malalts amb HTA-R, i també en ells es va fer el càlcul de l'*índex de resistència HOMA (homeostatic model assessment)* segons la fórmula comunament acceptada¹⁵⁹:

$$\text{Índex HOMA} = [\text{glucèmia basal (mmol/L)} \times \text{insulinèmia (\mu U/mL)}] / 22.5 ,$$

transformant per tant els valors de glucèmia (en mg/dL) a mmol/L, multiplicant pel factor de conversió 0.05551.

D'altra banda, es va procedir a l'estimació del *filtrat glomerular*, d'acord amb l'equació de predicció simplificada (4 variables) del Modification of Diet in Renal Disease Study (MDRD)¹⁶⁰, considerada com a vàlida per estimar el filtrat glomerular tant per la Sociedad Española de Nefrología¹⁶¹ com per l'American Society of Nephrology¹⁶².

4. CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS.

4.1. Obtenció i processament de mostres.

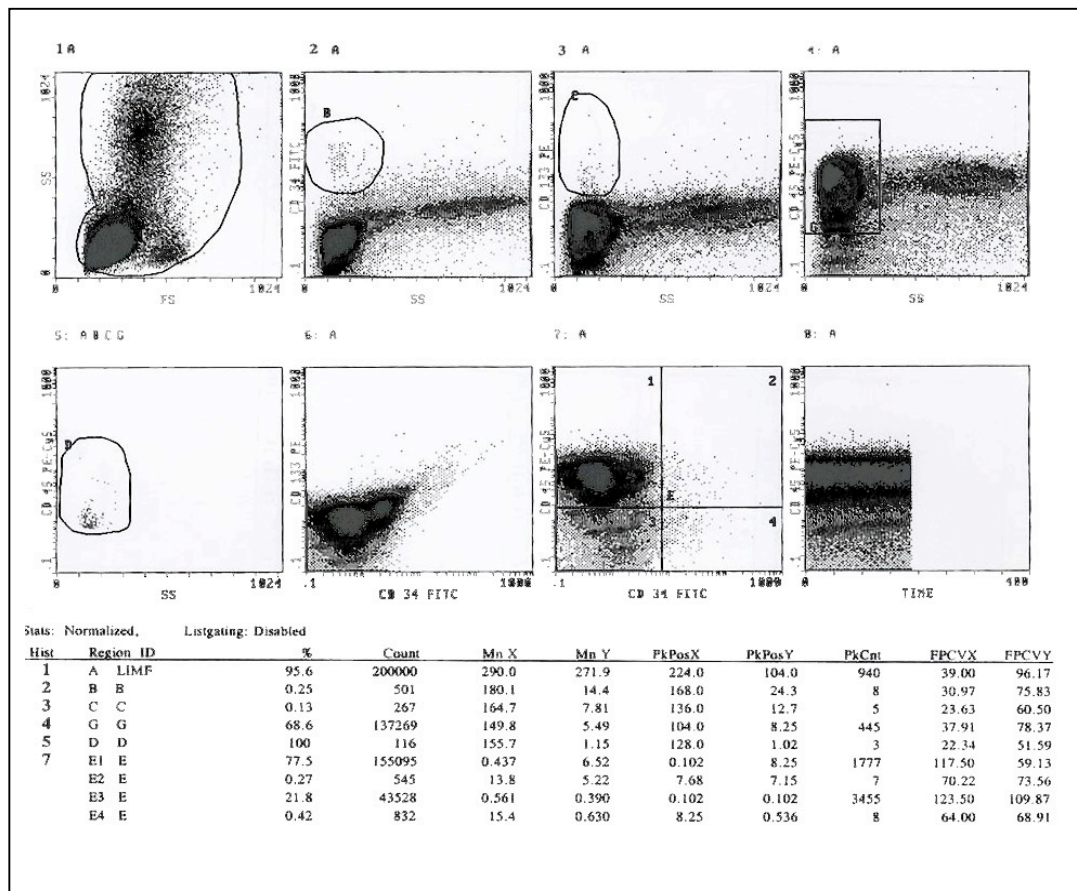
En tots els pacients es va obtenir una mostra de 20 mL de sang, entre les 7.00 h i les 9.00 h, per aïllar les CPE circulants mitjançant un assaig *in vitro*. En primer lloc, mitjançant centrifugació per gradient de densitat Ficoll es van aïllar les cèl·lules mononuclears separant-les dels altres components de la sang perifèrica (Histopaque 1077; Sigma, St Louis, MO, USA).

4.2. Citometria de flux i anàlisi de FACS (*fluorescence-activated cell-sorting*).

A partir d'aquestes cèl·lules mononuclears, es van identificar les CPE mitjançant citometria de flux, i per determinar el seu fenotip es va utilitzar tècniques d'immunohistoquímica, prèvia tinció amb els anticossos CD45-conjugat amb fluoresceïna marcada amb un grup isotiocianat (FITC) (Becton Dickinson PharMingen, San Diego, CA, USA), CD34-conjugat amb Cy5-ficoeritrina (PE-Cy5) (Becton Dickinson PharMingen) i amb CD133-conjugat amb ficoeritrina (PE) (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Fluoresceïna i ficoeritrina són dos fluorocroms molt utilitzats per a marcar proteïnes i que emeten a 525 nm i 575 nm respectivament. Una vegada realitzat l'aïllament, sota cabina de Bioseguretat (Bio IIA) i recompte de cèl·lules, es centrifuguen la quantitat de 600.000 cèl·lules durant 10 segons fins a 13.200 rpm. Després, 300.000 cèl·lules per tub es resuspenen suaument en 50µL de tampó FACS (és a dir, solució salina tamponada amb fosfat, amb albúmina a l'1% i àzida sòdica al 0.1%) amb 10µL de Fetal Calf Serum durant 10 minuts a temperatura ambient. Per la reacció de marcatge, es va afegir 3µL de cada un dels anticossos (1µL per 1×10^5 cèl·lules) i es va incubar a temperatura ambient, protegit de la llum, durant 30 minuts. Les mostres es van emmagatzemar a les fosques a 4°C durant una nit abans de la lectura per FACS. Es va utilitzar l'expressió de CD45, antigen comú dels leucòcits present en tots els leucòcits humans, per identificar les cèl·lules progenitores i es van separar per citometria de flux, utilitzant fotodetector amb propietats per mesurar la dispersió lateral de la llum. Es van analitzar un mínim de 2×10^5 cèl·lules CD45 positives. Dintre d'aquesta població de cèl·lules progenitores, es van identificar i separar aquelles que a més expressaven CD34 i CD133 (també anomenada AC133). CD34 és una glicoproteïna transmembranosa que s'expressa en cèl·lules progenitores hematopoètiques, endoteli vascular i alguns teixits fibroblastoids. CD133 s'expressa en cèl·lules precursors endotelials. D'aquesta manera, mitjançant l'anàlisi de FACS, que separa les cèl·lules segons les seves característiques immunofluorescents d'acord amb el marcatge previ realitzat, es van identificar com a cèl·lules progenitores endotelials aquelles que presentaven positivitat per a l'expressió concomitant de CD45, CD34 i CD133. Així, doncs, les cèl·lules circulants es va considerar que eren cèl·lules progenitores endotelials putatives si eren $CD45^+/CD34^+/CD133^+$. Hem expressat la seva concentració en

sang perifèrica com a número absolut de CPE per 1×10^5 cèl·lules mononuclears perifèriques (MN). L'anàlisi mitjançant citometria de flux està representat a la Figura 6.

Figura 6: Gràfic típic d'anàlisi de citometria de flux mostrant els resultats del triple marcatge immunoquímico (CD34, CD133, CD45) en una mostra estàndard. Els resultats van ser avaluats enfront a SS (*side scattering*) per tal d'identificar la població de cèl·lules progenitors endotelials putatives (CPE) com aquelles que presentaven: molt CD34, molt CD133, poc SS i molt poc CD45. El primer requadre de la segona filera correspon a la regió D, on les CPEs van ser identificades donat que complien aquests criteris.



4.3. Avaluació de la proliferació de les cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu *in vitro*.

Després de la identificació i la quantificació de les CPE circulants, varem determinar la seva activitat funcional mitjançant l'avaluació de la seva capacitat de proliferació *in vitro*. Així, doncs, es varen sembrar 0.5×10^6 cèl·lules mononuclears en làmines de metall amb 6 pouets coberts amb fibronectina humana ($10 \mu\text{mL}$; Sigma) en medi basal endotelial-2 (Clonetics) suplementat amb 2mL de medi

cel·lular endotelial microvascular-2 (EGM2) consistent en sèrum boví fetal al 5%, factor de creixement endotelial vascular, factor de creixement de fibroblasts-2, factor de creixement epidèrmic, factor de creixement insulina-like-2 i àcid ascòrbic, en quantitats adequades. Després de quatre dies de cultiu, les cèl·lules no adherents eren eliminades i s'hi afegia medi fresc; les cèl·lules es van cultivar fins el dia 7 amb lipoproteïnes de baixa densitat acetilades (AcLDL) marcades amb 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (AcLDL-Dil) (Molecular Probes) 2.5µg/mL a 37°C durant 4 hores. Les cèl·lules varen ser aleshores fixades amb paraformaldehid a l'1% durant 15 minuts i incubades amb la lectina *Ulex europaeus* aglutinina-1 marcada amb fluoresceïna-isotiocianat (10µ/mL; Sigma) durant 2 hores.

4.4. Microscòpia de contrast de fases invertida.

La quantificació del número de CPE putatives després de 7 dies de cultiu es va fer mitjançant mètode computeritzat. Breument, 10 imatges per camp seleccionades a l'atzar van ser captades en un microscopi de contrast de fases Leica. Les cèl·lules que es lligaven a la lectina *Ulex europaeus* aglutinina-1 i a la vegada captaven AcLDL-Dil, propietats funcionals típiques de cèl·lules endotelials, considerades com a suposades CPE, van ser contades amb un software digital (Metamorph Imaging System; Universal Imaging Corp., West Chester, PA, USA). El número de CPE després de cultiu es va expressar com a número de CPE per camp.

5. ESTUDI ECOCARDIOGRÀFIC.

En tots els malalts de l'estudi es va realitzar estudi ecocardiogràfic dirigit a avaluar l'existència d'hipertrofia de ventricle esquerre (HVE) com a marcador de dany orgànic. Per això es va utilitzar equip d'ecocardiografia mode M, bidimensional, Doppler polsat, continu i color amb software adequat per l'anàlisi (model Siemens, Sequoia, 256). Totes les exploracions es van realitzar amb els pacients en posició de decúbit esquerre parcial. Es van mesurar el diàmetre ventricular intern telediastòlic, el gruix de l'envà interventricular telediastòlic i el gruix de la paret posterior. El càlcul de la massa ventricular esquerre (VE) es va fer d'acord amb les recomanacions de l' American Society of Echocardiography¹⁶³. Així, doncs, es va utilitzar la fórmula recomanada per l'American Society of Echocardiography i

validada per estudis necròpsics per estimar la massa VE a partir de les dimensions lineals del VE¹⁶⁴. La massa VE calculada d'aquesta manera es va ajustar a l'àrea de superfície corporal per obtenir l'índex de massa VE (IMVE). Es va considerar el diagnòstic d' HVE si l' IMVE era superior a 125 g/m² en homes i superior a 110 g/m² en dones¹.

6. ANÀLISI DE FUNCIO ENDOTELIAL.

Es va utilitzar la tècnica de pletismografia d'oclusió venosa no invasiva per a mesurar la vasodilatació endoteli-dependent a nivell de l'artèria braquial, com a mesura indirecta de la funció endotelial³⁴. Tots els estudis per a mesurar la capacitat de dilatació arterial van ser duts a terme per la mateixa persona. Els pacients van ser examinats al matí en dejú, amb abstinència de tabac durant almenys les vuit hores prèvies a l'estudi. L'exploració es va realitzar en una habitació tranquil·la, sense soroll i amb temperatura ambient adequada, estant el pacient en posició de decúbit supí. Es va col·locar un braçal a nivell de la regió més ample del braç i es va connectar a un pletismògraf amb mercuri i amb agulla de Silastic (EC5R; D.E.Hokanson, Inc., Bellevue, WA, USA), procedint-ne al seu inflat ràpid fins a una pressió de 40 mmHg per tal d'interrompre la circulació venosa del braç. Es va col·locar un segon braçal a l'alçada del canell i es va inflar fins a pressió suprasistòlica durant exactament 60 segons abans de cada mesura del flux sanguini en l'avantbraç, per tal d'excloure el llit vascular de la ma. Les mesures de flux sanguini amb el braçal congestionant la part superior del braç es van dur a terme durant 7 segons en cada cicle de 15 segons i el senyal emès era transmès a un sistema d'enregistrament. El flux basal es va determinar a partir del promig de 7 d'aquestes mesures i està expressat com a mL/min/100mL de teixit de l'avantbraç. La hiperèmia reactiva es va induir mitjançant l' inflament del braçal pneumàtic distal a pressió suprasistòlica durant 5 minuts seguit de la seva deflació. La vasoactivitat endoteli-dependent es va definir com l' increment de flux sanguini des del nivell basal fins el flux sanguini màxim després de la deflació del braçal i es va expressar com a percentatge de dilatació mitjançada per flux (% DMF) computada amb la següent fórmula:

$$\% \text{ DMF} = [(\text{flux sanguini màxim} - \text{flux sanguini basal}) \times 100 / \text{flux sanguini basal}]$$

Els valors finals de DMF venen donats pel promig de dues mesures consecutives avaluades en cada pacient (3 en cas d'observar-ne una variabilitat superior al 5%).

7. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES.

Les anàlisis estadístiques es van realitzar amb el paquet estadístic SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Les variables que segueixen una distribució normal es presenten com a mitjanes \pm desviació estàndard (DE); les dades que no tenen una distribució normal es presenten com a mediana [quartil 1; quartil 3]. Les dades categòriques es resumeixen com a percentatges. Les comparacions bivariants de variables contínues entre grups s'han realitzat mitjançant el test de la t de Student o el test no paramètric de la U de Mann-Whitney segons se'n pogués assumir la normalitat. Les comparacions de les variables categòriques es van fer mitjançant el test de la χ^2 i el test exacte de Fisher. Les correlacions bivariants es van fer amb el coeficient de correlació de Spearman o correlació de Pearson segons correspongués. Es van construir diferents models multivariants de regressió lineal múltiple, en els quals els resultats es presenten com a coeficients de regressió, és a dir, el coeficient estandarditzat β que indica el pes relatiu de cada variable explicativa per a l'especificació de la variable dependent avaluada, i el coeficient no estandarditzat B amb l'interval de confiança del 95%, així com els valors de p corresponents. D'una banda, en l'estudi 1, es va construir un model de regressió lineal múltiple amb el número de CPE circulants com a variable dependent i un altre amb el número de CPE després de cultiu com a variable dependent, per tal d'identificar quins dels paràmetres analitzats, entre ells el fet de ser hipertens refractari, es correlacionaven amb aquestes cèl·lules. També es va construir un model de regressió lineal múltiple en l'estudi 2, amb la DMF com a variable dependent per determinar quins eren els factors que la determinaven en els malalts amb hipertensió arterial refractària. En aquest cas es va utilitzar la transformació logarítmica dels valors de DMF per tal de poder analitzar aquests seguint una distribució normal. Es va descartar la col·linealitat entre les variables dels models finals. Es va assumir la significació estadística si es podia rebutjar una hipòtesi nul·la amb una $p < 0.05$.

VI. RESULTATS

VI. RESULTATS.

ESTUDI 1: ESTUDI COMPARATIU DELS MALALTS AMB HIPERTENSIO ARTERIAL REFRACTÀRIA I ELS CONTROLS SANS.

1. CARACTERITZACIÓ DELS MALALTS AMB HIPERTENSIO ARTERIAL REFRACTÀRIA I DELS CONTROLS SANS.

1.1. Característiques clínic-demogràfiques i antropomètriques.

Es varen seleccionar 63 malalts visitats de forma consecutiva en la Unitat d' Hipertensió i Risc Vascular de l' Hospital del Mar de Barcelona, amb el diagnòstic clínic d'HTA-R d'acord amb la definició vigent esmentada prèviament i que varen signar el consentiment informat per participar en aquest estudi. En un total de 9 d'aquests pacients (14.3%) es va desestimar el diagnòstic d'HTA-R veritable després d'haver realitzat la MAPA-24h en obtenir-ne valors de PA diürna inferiors a 135/85 mmHg, considerant doncs que es tractava de malalts amb HTA pseudorefractària. De la cohort de pacients amb HTA-R veritable, es va poder fer determinació de CPE i cultiu de les mateixes en un total de 39 malalts, que són els que finalment s'han avaluat en aquest estudi. Quant al grup control de voluntaris sans, es van examinar un total de 30 subjectes, que van constituir el grup comparador. Les principals característiques demogràfiques, antropomètriques, clíniques i de laboratori d'ambdós grups estan exposades a la Taula 1.

Com es pot observar, els malalts amb HTA-R, eren de major edat que els subjectes del grup control, amb una edat (mitjana \pm DE) de 57.7 ± 11.7 anys enfront a 37.0 ± 9.2 anys ($p < 0.001$) i el seu IMC era també significativament més elevat (31.2 ± 4.8 Kg/m² enfront a 23.5 ± 3.4 Kg/m², respectivament; $p < 0.001$). Pel que fa a la mesura clínica de PA, tant la PA sistòlica com la PA diastòlica van resultar ser, com era d'esperar, més elevades en el grup de malalts amb HTA-R respecte dels controls normotensos (161.2 ± 19.4 mmHg vs. 111.8 ± 11.8 mmHg respectivament pel que fa a la PA sistòlica; $p < 0.001$ i 93.4 ± 13.0 mmHg vs. 69.3 ± 9.1 mmHg respectivament quant a la PA diastòlica; $p < 0.001$). Atenent als altres factors de risc cardiovascular clàssics, tret de la pròpia HTA i de la diabetis, criteri exclouent de l'estudi, no hi va haver diferències quant a la prevalença de tabaquisme però sí respecte a la prevalença de dislipèmia, que era significativament més alta en els malalts amb HTA-R (64.1% vs. 33.3% ; $p = 0.011$). Referent als subjectes de la

mostra que havien presentat algun episodi cardiovascular ben documentat prèviament a la inclusió en aquest estudi, cal assenyalar que 7 malalts amb HTA-R tenien aquest antecedent. En concret, 4 malalts havien patit un accident cerebrovascular, altres 2 pacients havien tingut un infart agut de miocardi i en un altre malalt s'havia enregistrat un episodi d'insuficiència cardíaca congestiva amb necessitat d'hospitalització. Cap subjecte del grup control havia presentat esdeveniments cardiovasculars.

Taula 1. Característiques demogràfiques, antropomètriques, clíniques i analítiques dels malalts amb hipertensió arterial refractària (HTA refractària) i dels subjectes normotensos (controls).

	HTA refractària	Controls	P
Número	N = 39	N = 30	
Edat (anys)	57.7 ± 11.7	37.0 ± 9.2	<0.001
Sexe, homes	15 (38.5%)	11 (36.7%)	0.88
IMC (kg/m ²)	31.2 ± 4.8	23.5 ± 3.4	<0.001
PAS clínica (mmHg)	161.2 ± 19.4	111.8 ± 11.8	<0.001
PAD clínica (mmHg)	93.4 ± 13.0	69.3 ± 9.1	<0.001
<i>Història clínica:</i>			
Dislipèmia	25 (64.1%)	10 (33.3%)	0.011
Tabaquisme	6 (15.4%)	4 (13.3%)	0.81
<i>Perfil lipídic:</i>			
Colesterol total (mg/dL)	208.7 ± 31.9	195.6 ± 32.4	0.10
Colesterol-HDL (mg/dL)	56.2 ± 16.2	61.2 ± 19.6	0.25
Colesterol-LDL (mg/dL)	134.0 ± 23.9	119.9 ± 30.0	0.034
Triglicèrids (mg/dL)	130.2 ± 111.8	93.0 ± 55.2	0.08
<i>Funció renal:</i>			
Creat _{pl} (mg/dL)*	1.05 [0.94; 1.21]	1.08 [0.93; 1.16]	0.82
FGe-MDRD (mL/min/1.73m ²)	64.7 ± 14.4	72.3 ± 9.5	0.014
QACO (µg/mg)*	7.3 [4.6; 37.8]	2.5 [1.9; 4.0]	<0.001
<i>Altres paràmetres de laboratori:</i>			
HbA _{1c} (%)*	4.7 [4.5; 5.1]	4.3 [4.2; 4.4]	<0.001
Homocisteïna (µmol/L)	9.5 ± 3.5	9.5 ± 2.9	0.99
PCR (mg/dL)*	0.50 [0.30; 0.80]	0.20 [0.20; 0.23]	<0.001
Fibrinogen (mg/dL)	332.7 ± 71.7	276.8 ± 65.7	0.004
Nivells EPO (mU/mL)*	19.2 [14.6; 26.3]	17.0 [13.4; 22.2]	0.30

Abreviatures: **IMC** = índex de massa corporal; **PAS** = pressió arterial sistòlica; **PAD** = pressió arterial diastòlica.

HDL = lipoproteïnes d'alta densitat; **LDL** = lipoproteïnes de baixa densitat; **Creat_{pl}** = creatinina plasmàtica; **FGe-MDRD** = filtrat glomerular estimat segons l'equació de l'estudi Modification of Diet in Renal Disease; **QACO** = quocient albúmina/creatinina en orina; **HbA_{1c}** = hemoglobina glicosilada; **PCR** = proteïna C-reactiva; **EPO** = nivells plasmàtics d'eritropoetina

(*): Mediana [quartil 1;3]. Resta de paràmetres: mitjana±DE.

Quant a possibles tractaments concomitants que poguessin ser rellevants o interferir amb els resultats de l'estudi, un 44% dels malalts amb HTA-R estaven prenent estatines (inhibidors de l'enzim hidroximetilglutaril-coenzim A reductasa) com a part del seu tractament hipolipemiant. A més, la majoria de pacients amb HTA-R, en concret el 92%, prenia almenys un fàrmac blocador del sistema renina-angiotensina. Cap dels subjectes normotensos prenia aquests tipus de fàrmacs ni d'altres que es conegui poden interferir amb els nivells de CPE circulants o amb la seva capacitat de proliferació després de cultiu.

1.2. Dades de laboratori.

Al observar els paràmetres del perfil lipídic, i tenint en compte com hem esmentat que gairebé la meitat dels malalts amb HTA-R rebien tractament amb estatines, l'únic paràmetre en que hi va haver diferències significatives va ser en els nivells plasmàtics de colesterol-LDL (lipoproteïnes de baixa densitat), que eren més elevats en els malalts hipertensos respecte als controls normotensos (134.0 ± 23.9 mg/dL vs. 119.9 ± 30.0 mg/dL, respectivament; $p=0.034$), mentre que els nivells plasmàtics de colesterol total i de triglicèrids van mostrar una tendència a ser també més alts en els pacients amb HTA-R, sense arribar a la significació estadística. Atenent encara al perfil metabòlic de la mostra a estudi, varem objectivar també un increment significatiu dels nivells d'hemoglobina glicosilada en el grup de malalts amb HTA-R respecte als controls. Així, aquests, expressat com a mediana [quartil 1; quartil 3], van resultar ser de 4.7% [4.5; 5.1] vs. 4.3% [4.2; 4.4], $p<0.001$.

Respecte als paràmetres de funció renal, els malalts amb HTA-R presentaven, en comparació amb els controls normotensos, xifres més baixes del filtrat glomerular estimat per l'equació MDRD, així com xifres més elevades del QACO. Així, el filtrat glomerular estimat va ser de 64.7 ± 14.4 mL/min/1.73m² vs. 72.3 ± 9.5 mL/min/1.73m², respectivament; $p=0.014$, mentre que el QACO va mostrar valors, expressats com a mediana [quartil 1; quartil 3], de 7.3 [4.6; 37.8] µg/mg vs. 2.5 [1.9; 4.0] µg/mg en HTA-R i controls, respectivament ($p<0.001$). En canvi, no es van objectivar diferències apreciables pel que fa a la concentració plasmàtica de creatinina.

Finalment, quant a les proteïnes de fase aguda estudiades, aquestes també van mostrar concentracions plasmàtiques més elevades en el grup de pacients amb HTA-R. Així, doncs, els nivells de PCR d'alta sensibilitat (mediana [quartil 1;

quartil 3]) van ser de 0.50 [0.30; 0.80] mg/dL en HTA-R i de 0.20 [0.20; 0.23] mg/dL en els controls; $p < 0.001$, mentre que els nivells plasmàtics de fibrinogen eren de 332.7 ± 71.7 mg/dL vs. 276.8 ± 65.7 mg/dL, respectivament ($p = 0.004$). Altres paràmetres, com la homocisteïnèmia, no van mostrar diferències entre els dos grups de subjectes.

1.3. Marcadors d'inflamació pròpiament.

Com hem esmentat, es va determinar els marcadors d'inflamació sVCAM-1, sICAM-1, e-selectina, p-selectina, i MCP-1 en el grup de malalts amb HTA-R d'aquest estudi. L'anàlisi descriptiu pel que fa als nivells plasmàtics d'aquests marcadors en els malalts es detalla a la taula 2.

Taula 2. Nivells plasmàtics dels diferents marcadors inflamatoris determinats en els malalts amb hipertensió arterial refractària (n = 39).

N = 39 Marcador inflamatori ^(*)	mediana	quartil 1; quartil 3
MCP-1 (pg/mL)	457.1	337.1; 531.9
sICAM (ng/mL)	261.5	213.1; 292.8
sVCAM (ng/mL)	567.4	492.0; 644.2
e-selectina (ng/mL)	41.1	22.3; 77.2
p-selectina (ng/mL)	130.9	110.4; 161.9

Abreviatures: **MCP-1** = proteïna quimiotàctica de monòcits tipus 1; **sICAM** = molècula d'adhesió intercel·lular soluble tipus 1; **sVCAM** = molècula d'adhesió cel·lular vascular soluble tipus 1.
(*) Mediana [quartil 1;3].

Donat que volíem estudiar si les CPE tenien una relació amb la HTA refractària independent d'altres factors que la poguessin determinar, varem mirar si aquests marcadors d'inflamació es relacionaven amb la HTA. De tots aquests marcadors, únicament MCP-1 ($r = 0.443$; $p = 0.005$) i sVCAM ($r = 0.335$; $p = 0.037$) es van correlacionar directament de forma significativa amb la PA sistòlica de 24 hores, però la seva influència sobre la HTA va perdre significació en les anàlisis de regressió lineal múltiple que comentarem més endavant i en les que també estava inclòs com a variable el número de CPE. D'altra banda, els nivells plasmàtics de cap dels marcadors inflamatoris estudiats no es varen correlacionar amb el número de CPE circulants ni amb la proliferació de les mateixes després de cultiu (Taula 3).

Taula 3. Correlació entre les concentracions plasmàtiques dels diferents marcadors inflamatoris i els nivells de CPE circulants i el número de CPE després de cultiu, respectivament.

N = 39 <i>Marcador inflamatori</i> ^(*)	CPE circulants (R; valor de p)	CPE després de cultiu (R; valor de p)
MCP-1	-0.228; 0.17	-0.032; 0.85
sICAM	0.123; 0.47	0.220; 0.19
sVCAM	-0.233; 0.16	0.012; 0.94
e-selectina	-0.021; 0.90	-0.203; 0.21
p-selectina	-0.142; 0.40	-0.056; 0.74

Abreviatures: *CPE* = cèl·lules progenitores endotelials; *MCP-1* = proteïna quimiotàctica de monòcits tipus 1; *sICAM* = molècula d'adhesió intercel·lular soluble tipus 1; *sVCAM* = molècula d'adhesió cel·lular vascular soluble tipus 1.

1.4. Dades ecocardiogràfiques.

En l'ecocardiograma realitzat als malalts amb HTA-R, es va tenir en compte bàsicament les dades referents a l'IMVE avaluat d'acord amb els mètodes descrits. En el conjunt dels 39 malalts amb HTA-R es va objectivar els següents valors d'IMVE: (mediana [quartil 1; quartil 3]) = 118 [96.0; 143.5] g/m². Aquest índex no es va correlacionar amb el número de CPE circulants ($r=0.151$; $p=0.380$), però sí amb la proliferació d'aquestes després de cultiu ($r=0.417$; $p=0.010$). No obstant, la seva possible implicació com a determinant d'aquest número de CPE després de cultiu va perdre significació en l'anàlisi de regressió lineal múltiple.

2. QUANTIFICACIÓ DE CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS EN ELS MALALTS AMB HIPERTENSIÓ ARTERIAL REFRACTÀRIA I EN ELS CONTROLS SANS.

2.1. Nivells de cèl·lules progenitores endotelials circulants.

Al determinar la concentració plasmàtica de CPE, els nivells de CPE circulants van resultar ser els següents, expressats com a (mediana [quartil 1; quartil 3]): 31 [7; 56] CPE/10⁵MN en els malalts amb HTA-R i 51 [30; 82] CPE/10⁵MN en els controls sans. Atesa la coneguda influència de l'edat en el número de CPE circulants, i donat que les dues cohorts de subjectes tenien diferències significatives quant a l'edat dels mateixos, aquests resultats es varen ajustar per edat. Els nivells

de CPE circulants ajustats per edat i expressats com a mitjana (interval de confiança del 95%) van resultar ser de 33.8 (18.1 – 49.6) CPE/ 10^5 MN i 69.1 (50.7 – 87.5) CPE/ 10^5 MN en els subjectes amb HTA-R i en els controls sans, respectivament, essent-ne la diferència estadísticament significativa ($p=0.014$) (Figures 7 i 8). D'altra banda, al no ajustar-se a una distribució normal, els valors de CPE es van transformar fent-ne el logaritme. Es van calcular les mitjanes i l'interval de confiança del 95% (IC 95%) d'aquests valors transformats, ajustades per edat. Per facilitar-ne la lectura, aquests resultats es tornaren a l'escala original fent-ne l'exponencial. Els resultats presentats d'aquesta manera són: mitjana (IC 95%) = 19.6 (12.1–31.7) CPE/ 10^5 MN pels subjectes amb HTA-R i 50.7 (28.9 – 88.8) CPE/ 10^5 MN en els controls sans, amb diferència estadísticament significativa ($p=0.028$).

Figura 7: Número absolut de cèl·lules progenitores circulants (CPE) per 10^5 cèl·lules mononuclears (MN) en sang perifèrica en pacients hipertensos i subjectes control. Les dades es presenten per gràfic de barres d'error com a mitjanes i intervals de confiança del 95%.

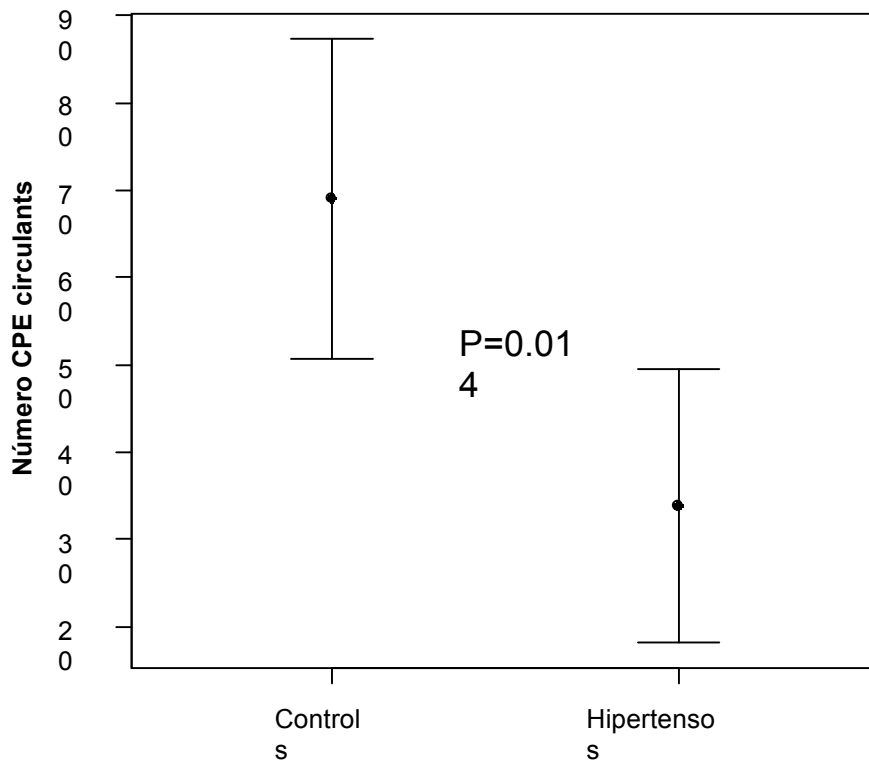
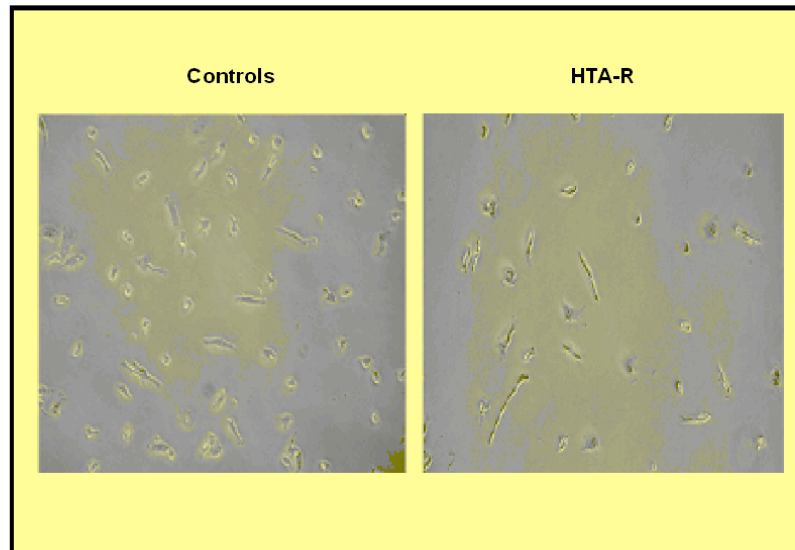
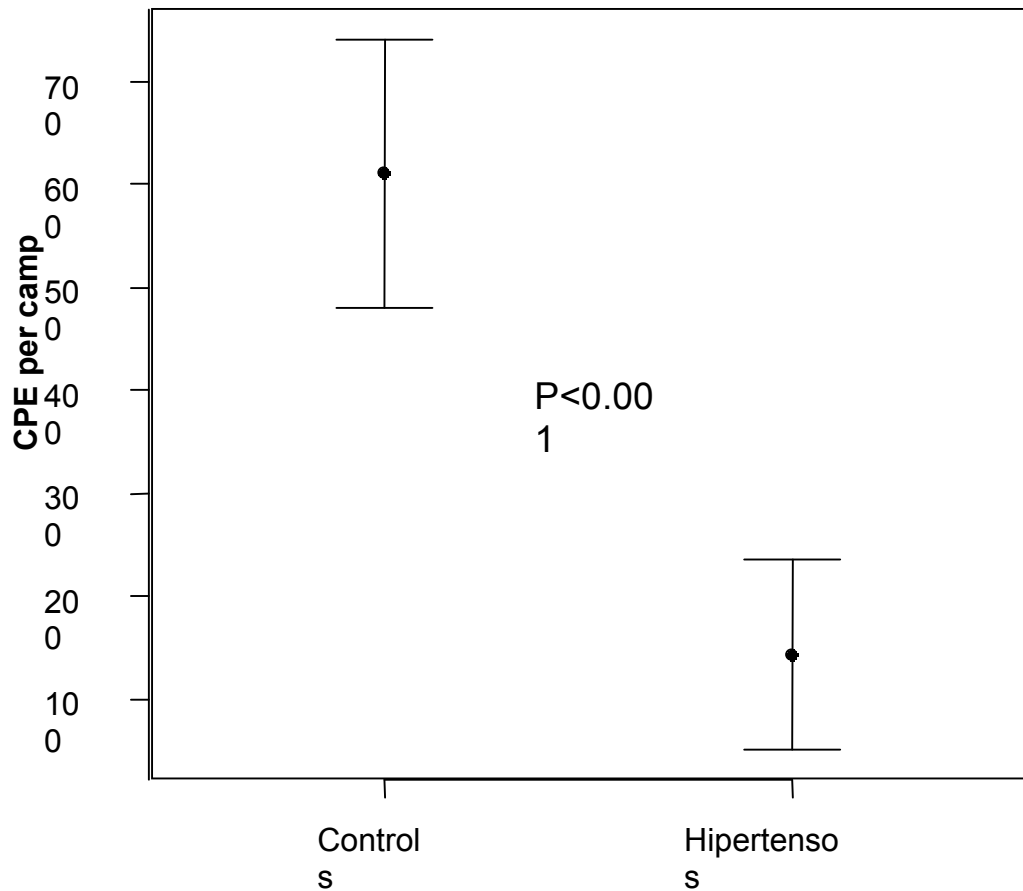


Figura 8: Imatge en microscòpia de CPE en controls sans i en malalts amb HTA-refractària.

2.2. Proliferació de cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu *in vitro*.

Quant a la proliferació de CPE després de cultiu *in vitro*, els resultats obtinguts són els següents (mediana [quartil 1; quartil 3]): 96 [12; 248] CPE per camp en els malalts amb HTA-R i 518 [320; 715] CPE per camp en els controls sans. També en aquest cas es van repetir les anàlisis després d'ajustar per edat. El número de CPE per camp després de cultiu, ajustat per edat i expressat com a mitjana (interval de confiança del 95%), va resultar ser de 142.3 (49.5 – 235.0) CPE per camp en els subjectes amb HTA-R i de 611.0 (480.2 – 741.8) CPE per camp en els controls sans, essent-ne la diferència estadísticament significativa ($p < 0.001$) (Figura 9). Per la mateixa raó que en el cas de les CPE circulants, també aquí es va fer la transformació logarítmica dels valors de CPE després de cultiu, es van calcular les mitjanes i l' IC 95% d'aquests valors transformats, ajustades per edat, i aquests resultats es tornaren a l'escala original fent-ne l'exponencial. Els resultats presentats d'aquesta manera són: mitjana (IC 95%) = 54.3 (32.7 – 90.3) CPE per camp pels subjectes amb HTA-R i 583.9 (285.3 – 1195.2) CPE per camp en els controls sans, amb diferència estadísticament significativa ($p < 0.001$).

Figura 9: Número cèl·lules progenitores circulants (CPE) per camp després de cultiu en pacients hipertensos i subjectes control. Les dades es presenten per gràfic de barres d'error com a mitjanes i intervals de confiança del 95%



3. ANÀLISI DE POSSIBLES DETERMINANTS DE LES DIFERÈNCIES EN LA QUANTIFICACIÓ DE CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS, CIRCULANTS I DESPRÉS DE CULTIU, ENTRE LES DUES POBLACIONS.

3.1. Factors que poden condicionar diferències en els nivells de cèl·lules progenitores endotelials circulants.

Davant la troballa que els malalts amb HTA-R tenien un número de CPE circulants en sang perifèrica significativament inferior al dels controls sans, varem estudiar si el número de CPE en aquests malalts es correlacionava amb algun dels factors que en les anàlisis bivariants es mostraven diferents entre ambdues cohorts de subjectes, és a dir, IMC, diagnòstic previ de dislipèmia, o bé els paràmetres de laboratori glucèmia, filtrat glomerular estimat, QACO, hemoglobina glicosilada, proteïna C-reactiva o fibrinogen. També varem

estudiar si existia correlació entre el número de CPE circulants i l'IMVE, així com amb els marcadors d'inflamació MCP-1 i sVCAM-1, els quals s'havien correlacionat amb la PA sistòlica de 24 hores, o amb alguns altres factors que s'ha vist poden condicionar el número de CPE, com són la història familiar de malaltia cardiovascular, el sedentarisme, les complicacions cardiovasculars prèvies, el tractament amb estatines o el tractament amb blocadors del sistema renina-angiotensina (Taula 4).

Taula 4. Correlacions bivariants entre els factors de risc cardiovascular clàssics, paràmetres bioquímics i inflamatoris, dany orgànic cardíac, tractament amb estatines o blocadors del sistema renina-angiotensina, i la concentració de CPE.

	<i>R</i>	<i>p</i>
Dislipèmia	-0.197	0.844
Sedentarisme	-1.944	0.052
Història familiar	-0.486	0.627
Antecedents CV	-0.542	0.588
IMC	-0.013	0.936
IMVE	0.151	0.380
Glucèmia	-0.412	0.010
Colesterol-LDL	-2.107	0.147
FGe-MDRD	0.043	0.798
QACO	-0.170	0.308
HbA_{1c}	-0.116	0.487
PCR	-0.165	0.322
Fibrinogen	-0.075	0.662
MCP-1	-0.228	0.169
sVCAM-1	-0.233	0.160
Estatines	-1.289	0.197
Blocadors SRA	-0.353	0.728

Abreviatures: **CPE** = cèl·lules progenitores endotelials; **CV** = cardiovascular; **FGe-MDRD** = filtrat glomerular estimat segons l'equació de l'estudi Modification of Diet in Renal Disease; **HbA_{1c}** = hemoglobina glicosilada; **IMC** = index de massa corporal; **IMVE** = index de massa ventricular esquerra; **LDL** = lipoproteïnes de baixa densitat; **MCP-1** = proteïna quimiotàctica de monòcits tipus 1; **PCR** = proteïna C-reactiva; **QACO** = quocient albúmina/creatinina en orina; **SRA** = sistema renina-angiotensina; **sVCAM-1** = molècula d'adhesió cel·lular vascular soluble tipus 1.

L'únic factor que es va correlacionar amb el número de CPE en els malalts amb HTA-R va ser la glucèmia ($r = -.412$; $p = 0.01$). Nivells més elevats de glucèmia es correlacionaven amb un número reduït de CPE. Cap de les altres variables analitzades va mostrar correlació amb la concentració de CPE circulants.

Seguidament varem dur a terme una anàlisi de regressió lineal múltiple en la que es va introduir com a variable dependent la concentració de CPE circulants en sang perifèrica expressada en CPE/ 10^5 MN. Les possibles variables explicatives introduïdes en el model van ser aquelles que havien mostrat correlació amb la HTA-R, és a dir, edat, IMC, glucèmia, nivells de colesterol-LDL, PCR, fibrinogen, QACO i filtrat glomerular estimat. D'aquesta manera, volíem comprovar si la relació amb una reducció de CPE depenia del fet en si de ser HTA-R o d'altres variables associades a la pròpia HTA-R. Com es mostra a la Taula 5, les úniques variables que de forma independent es van mostrar predictives del número de CPE van ser la HTA-R (coeficient de regressió estandarditzat $\beta = -0.455$; $p = 0.006$) i el filtrat glomerular estimat (coeficient de regressió estandarditzat $\beta = 0.288$; $p = 0.037$). Així, els subjectes amb HTA-R presentaven una reducció del 56.3% en el número absolut de CPE circulants respecte als controls normotensos ($p = 0.006$).

Taula 5. Anàlisi de regressió lineal múltiple dels predictors potencials de la concentració de CPE. Model final.

Factor de risc	Coefficient (B) (IC 95%) No estandarditzat	Coefficient (β) Estandarditzat	p
HTA-R	-38.9 (-66.2 a -11.7)	-0.455	0.006
Edat	0.9 (-0.2 a 1.9)	0.302	0.098
FGe-MDRD	0.9 (0.1 a 1.8)	0.288	0.037

Abreviatures: **HTA-R**: hipertensió arterial refractària; **FGe-MDRD**: filtrat glomerular estimat segons l'equació Modification of Diet in Renal Disease.

Les dades s'expressen com a coeficients de regressió i valors de p.

Co-variables incloses: edat, HTA-R, índex de massa corporal, glucèmia, colesterol-LDL, proteïna C reactiva, fibrinogen, quocient albúmina/creatinina en orina i FGe-MDRD.

Variable dependent: concentració de CPE expressat en CPE/ 10^5 MN; $r = 0.417$

3.2. Factors que poden condicionar diferències en la proliferació de cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu *in vitro*.

També en el cas de les CPE després de cultiu, com hem vist, el seu número era significativament inferior en els malalts amb HTA-R respecte als controls sans. Per tant, varem estudiar si el número de CPE després de cultiu en aquests malalts es correlacionava amb algun dels factors que en les anàlisis bivariants es mostraven diferents entre ambdues cohorts de subjectes i per tant en relació amb la HTA-R, o bé amb els que se sap poden influir sobre les CPE. És a dir, varem estudiar les possibles correlacions entre les CPE després de cultiu i els mateixos factors que hem considerat en l'apartat anterior en relació al número de CPE circulants. De totes les variables estudiades en aquests malalts amb HTA-R, la única que es va associar de forma significativa va ser l'IMVE, que es va correlacionar de forma directa amb el número de CPE després de cultiu ($r=0.417$; $p=0.01$). A més, els nivells plasmàtics de PCR varen mostrar una tendència a correlacionar-se de forma inversa amb el número de CPE després de cultiu sense arribar-ne a la significació estadística ($r= - 0.294$; $p=0.069$).

Seguidament varem dur a terme una anàlisi de regressió lineal múltiple en la que es va introduir com a variable dependent el número de CPE després de cultiu, expressada en CPE per camp. Les possibles variables explicatives introduïdes en el model van ser novament aquelles que havien mostrat correlació amb la HTA-R, és a dir, edat, IMC, glucèmia, nivells de colesterol-LDL, PCR, fibrinogen, QACO i filtrat glomerular estimat. Com es mostra a la Taula 6, la HTA-R va ser la única variable que de forma independent es va mostrar predictiva del número de CPE després de cultiu (coeficient de regressió estandarditzat $\beta = -0.716$; $p < 0.001$). Els subjectes amb HTA-R presentaven una reducció del 76.7% en el número de CPE després de cultiu respecte als controls normotensos ($p < 0.001$).

Taula 6. Anàlisi de regressió lineal múltiple dels predictors potencials del número de CPE després de cultiu. Model final.

Factor de risc	Coefficient no estandarditzat (B) (IC 95%)	Coefficient (β) Estandarditzat	p
HTA-R	-468.7 (-650.2 a -287.2)	- 0.716	<0.001
Edat	2.8 (-3.0 a 8.7)	0.134	0.339

Abreviatures: **HTA-R** = hipertensió arterial refractària

Les dades s'expressen com a coeficients de regressió i valors de p.

Co-variables incloses: edat, HTA-R, index de massa corporal, glucèmia, colesterol-LDL, proteïna C reactiva, fibrinogen, quocient albúmina/creatinina en orina, FGe-MDRD i index massa ventricular esquerra.

Variable dependent: número de CPE després de cultiu expressat en CPE per camp; $r=0.632$

3.3. Validació dels resultats obtinguts

Varem observar diferències de 28.2 en la concentració de CPE (CPE / 10^5 MN) i de 408.8 en el número de CPE per camp després de cultiu. Varem dur a terme un càlcul de potència estadística sobre la grandària de la nostra mostra, confirmant que té una potència del 80% per detectar diferències fins i tot més petites, de 27 i 173, respectivament.

Tenint en compte la diferència d'edat entre els malalts amb HTA-R i els subjectes sans, varem realitzar anàlisis estadístiques posteriors amb una mostra de 13 parells de subjectes (casos/controls) aparellats per edat, de tal manera que els 13 malalts amb HTA-R tenien una edat (mitjana \pm DE) de 45 ± 7.6 anys i els 13 subjectes controls presentaven una edat (mitjana \pm DE) de 45 ± 7.8 anys. Les anàlisis de regressió corresponents al número de CPE circulants (CPE / 10^5 MN) i al número de CPE després de cultiu (CPE per camp) van mostrar un coeficient no estandarditzat (B) amb els corresponents intervals de confiança del 95% i valors de p de -53.8 (-94.0 a -13.6), $p=0.011$, i -464.5 (-721.8 a -207.2), $p=0.001$, respectivament (Taules 7 i 8, respectivament).

Taula 7. Model final de l'anàlisi de regressió lineal múltiple dels predictors potencials de la concentració de CPE, corresponent a la mostra de 13 parells de subjectes (casos/controls) aparellats per edat.

Factor de risc	Coefficient no estandarditzat (B) (IC 95%)	Coefficient (β) Estandarditzat	p
HTA-R	-53.8 (-94.0 a -13.6)	- 0.491	0.011

Abreviatures: **HTA-R**: hipertensió arterial refractària; **FGe-MDRD**: filtrat glomerular estimat segons l'equació Modification of Diet in Renal Disease.

Les dades s'expressen com a coeficients de regressió i valors de p.

Co-variable: HTA-R.

Variable dependent: concentració de CPE expressat en CPE/ 10^5 MN; $r=0.491$

Taula 8. Model final de l'anàlisi de regressió lineal múltiple dels predictors potencials del número de CPE després de cultiu, corresponent a la mostra de 13 parells de subjectes (casos/controls) aparellats per edat.

Factor de risc	Coefficient no estandarditzat (B) (IC 95%)	Coefficient (β) Estandarditzat	p
HTA-R	-464.5 (-721.8 a -207.2)	- 0.644	0.001

Abreviatures: **HTA-R** = hipertensió arterial refractària

Les dades s'expressen com a coeficients de regressió i valors de p.

Co-variable: HTA-R.

Variable dependent: número de CPE després de cultiu expressat en CPE per camp; $r=0.644$

ESTUDI 2: RESULTATS QUANT A L'ESTUDI DE LA VASODILATACIÓ ENDOTELI-DEPENDENT EN ELS MALALTS AMB HIPERTENSÍO ARTERIAL REFRACTÀRIA

1. Justificació de la mostra.

Malgrat que hi ha poca informació a la literatura respecte a la relació entre DMF i CPE, nosaltres creiem que aquesta deu ser almenys de 0.5 o superior. Per tant, varem calcular que 31 malalts serien suficients per a obtenir un poder estadístic del 80% per trobar un índex de correlació significatiu ≥ 0.5 . A més, varem afegir un 20% més de malalts tenint en compte els hipotètics abandonaments o pèrdues de subjectes per qualsevol causa. Finalment, no varem aconseguir completar les dades per 8 dels pacients degut a un problema tècnic de l'equip de mesura de la DMF; aquests subjectes es van considerar del tot perduts en el moment de la selecció i per tant varen ser eliminats de les anàlisis posteriors.

2. Característiques del subgrup de malalts en que es va fer anàlisi de vasodilatació arterial endoteli-dependent.

2.1. Característiques clínic-demogràfiques i antropomètriques.

De la mostra anteriorment analitzada de malalts amb HTA-R confirmada amb MAPA-24hr, un total de 29 subjectes van ser sotmesos a més a estudi de vasodilatació endoteli-dependent, prèvia signatura de consentiment informat. Les dades clínic-demogràfiques i antropomètriques es van recollir tal i com s'ha descrit en l'Estudi 1 i els factors de risc es van definir segons els criteris que hem

assenyalat prèviament. Les característiques basals dels subjectes eren les següents: edat (mitjana \pm DE): 58.3 ± 10.1 anys; homes / dones: 38% / 62%; IMC: 31.0 ± 4.4 kg/m². Del total de la població estudiada, 65.5% presentaven hiperlipidèmia i 13.8% eren fumadors. Un total de 5 malalts (17.2%) havien patit prèviament algun episodi cardiovascular, en concret un accident cerebrovascular isquèmic en 3 pacients i un infart agut de miocardi en els altres 2 casos. El 44% dels malalts rebien una estatina com a part del seu tractament hipolipemiant, i un 90% del total de malalts estaven tractats amb algun blocador del sistema renina-angiotensina com a part del seu tractament antihipertensiu.

Les dades corresponents a la pressió arterial sistòlica i diastòlica, tant determinades a la clínica com per monitoratge de 24 hores, es mostren a la Taula 9.

2.2.Dades de laboratori i ecocardiogràfiques.

A la mateixa taula 9 s'exposen les dades corresponents als paràmetres basals de laboratori determinats, així com el resultat de l'estudi ecocardiogràfic realitzat en els subjectes de la mostra, en concret l'IMVE.

2.3.Marcadors d'inflamació.

Es va determinar la concentració en sang dels marcadors d'inflamació sVCAM-1, sICAM-1, e-selectina, p-selectina, i MCP-1 en aquesta cohort de malalts amb HTA-R d'acord amb la metodologia descrita prèviament. L'anàlisi descriptiu pel que fa als nivells plasmàtics d'aquests marcadors en els malalts es detalla a la Taula 10.

2.4.Cèl·lules progenitores endotelials circulants i després de cultiu *in vitro*.

CPE circulants. En el global de la mostra estudiada, la concentració de CPE circulants va resultar ser de: (mediana [quartil 1; quartil 3]) = 23.0 [4.5; 53.8] CPE / 10⁵ MN.

CPE després de cultiu. En aquesta població de 29 malalts amb HTA-R, la quantificació de CPE després de cultiu *in vitro* va mostrar els següents resultats: (mediana [quartil 1; quartil 3]) = 96.0 [12.0; 244.0] CPE per camp.

Taula 9. Paràmetres de pressió arterial, de laboratori i ecocardiogràfiques dels malalts amb HTA refractària sotmesos a estudi de vasodilatació endoteli-dependent (n = 29).

N=29	
Pressió arterial	
PAS clínica (mmHg)	161.7 ± 19.3
PAD clínica (mmHg)	92.6 ± 12.2
PAS-24hr (mmHg)	143.6 ± 14.2
PAD-24hr (mmHg)	82.2 ± 11.7
Paràmetres de laboratori	
Colesterol total (mg/dL)	207.0 ± 23.7
Colesterol-LDL (mg/dL)	131.5 ± 19.3
Colesterol-HDL (mg/dL)	59.4 ± 17.1
Triglicèrids (mg/dL)*	101 [81.5; 126.0]
Glucèmia (mg/dL)	100.6 ± 11.3
HbA _{1c} (%)*	4.7 [4.5; 5.1]
Insulina (mcIU/mL)*	9.1 [6.4; 14.8]
HOMA*	2.2 [1.6; 3.6]
PCR (mg/dL)*	0.40 [0.20; 0.75]
Homocisteïna (µmol/L)	9.3 ± 3.2
Creat _{pl} (mg/dL)	1.02 ± 0.14
FGe-MDRD (mL/min/1.73m ²)	67.8 ± 10.6
QACO (mg/g)*	6.5 [4.2; 30.0]
Paràmetres ecocardiogràfics	
IMVE (g/m ²)*	118.0 [95.0; 144.0]

Abreviatures: **PAS** = pressió arterial sistòlica; **PAD** = pressió arterial diastòlica; **HDL** = lipoproteïnes d'alta densitat; **LDL** = lipoproteïnes de baixa densitat; **HOMA** = homeostasis model assessment of insulin resistance; **PCR** = proteïna C-reactiva; **Creat_{pl}** = creatinina plasmàtica; **FGe-MDRD** = filtrat glomerular estimat segons l'equació de l'estudi Modification of Diet in Renal Disease; **QACO** = quocient albúmina/creatinina en orina; **IMVE** = índex de massa ventricular esquerra.

(*) Mediana [quartil 1;3]. Resta de paràmetres: mitjana±DE.

Taula 10. Nivells plasmàtics dels diferents marcadors inflamatoris determinats en els malalts amb HTA refractària sotmesos a estudi de vasodilatació endoteli-dependent (n = 29).

N = 29	Mitjana ± DE
Marcador inflamatori	
MCP-1 (pg/mL)	442.0 ± 120.3
sICAM (ng/mL)	244.4 ± 51.1
sVCAM (ng/mL)	575.0 ± 126.4
e-selectina (ng/mL)	51.9 ± 35.0
p-selectina (ng/mL)	143.3 ± 49.9

Abreviatures: **DE** = desviació estàndard; **MCP-1** = proteïna quimiotàctica de monòcits tipus 1; **sICAM** = molècula d'adhesió intercel·lular soluble tipus 1; **sVCAM** = molècula d'adhesió cel·lular vascular soluble tipus 1.

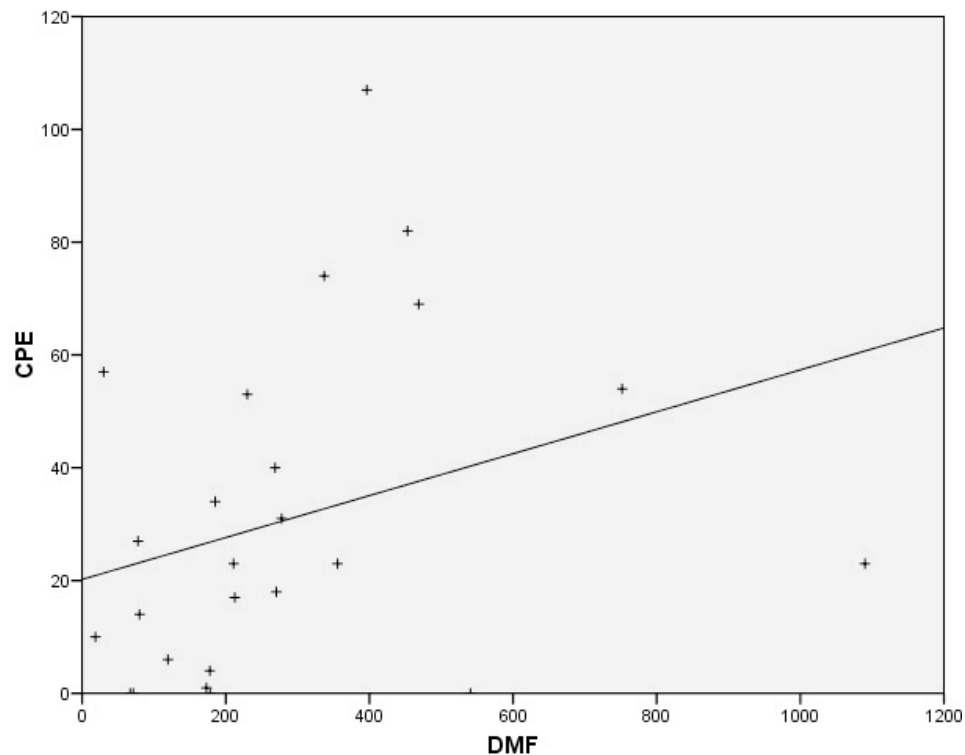
3. Paràmetres de vasodilatació endoteli-dependent.

Quant a l'avaluació de la vasodilatació endoteli-dependent, mesurada segons el percentatge de variació del flux sanguini en artèria braquial després d'hiperèmia reactiva, és a dir, dilatació mitjançada per flux (DMF), els resultats obtinguts en el grup de 29 malalts amb HTA-R en que es va realitzar aquest estudi van ser els següents: DMF (mediana [quartil 1; quartil 3]) = 211.7% [79.5; 365.8].

4. Anàlisi dels possibles determinants de la funció endotelial en els malalts amb hipertensió arterial refractària.

Varem estudiar a continuació si la reactivitat arterial braquial mitjançada per flux es correlaciona, en aquesta cohort de malalts amb HTA-R, amb els factors de risc cardiovascular clàssics i els reconeguts més recentment, així com amb les CPE circulants i després de cultiu *in vitro* i/o amb els nivells de marcadors inflamatoris avaluats. Les anàlisis bivariants van mostrar una relació inversa entre la DMF i els nivells sèrics de MCP-1 ($r = -0.52$; $p = 0.006$), e-selectina ($r = -0.57$; $p = 0.002$) i p-selectina ($r = -0.41$; $p = 0.041$). D'altra banda, no es va trobar cap relació entre la DMF i els nivells sèrics de PCR, sVCAM-1 o sICAM-1. Respecte a la resta de les anàlisis bivariants, després d'ajustar per edat les úniques correlacions significatives amb la DMF van ser les del número de CPE circulants ($r = 0.47$; $p = 0.018$) (Figura 10) i la concentració d'homocisteïna en plasma ($r = -0.41$; $p = 0.045$).

La correlació de la DMF amb la PAS-24hr va ser marginalment significativa ($r = -0.39$; $p = 0.05$). Es van examinar altres correlacions amb la DMF, que no van resultar ser significatives en les anàlisis bivariants: edat, sexe, IMC, paràmetres de mesura clínica de PA, PAD-24hr, paràmetres de laboratori bioquímics, factors de risc cardiovascular clàssics com la dislipèmia o el tabaquisme (recordem que s'havia exclòs els pacients diabètics en aquest estudi), sedentarisme, episodis cardiovasculars previs, o tractament amb fàrmacs del grup de les estatines o blocadors del sistema renina-angiotensina (Taula 11). Es va observar una tendència a la correlació entre el número de CPE després de cultiu i la DMF, però no va arribar a ser estadísticament significativa ($r = 0.35$; $p = 0.08$).

Figura 10: Associació entre el número de CPE i la DMF després d'hiperèmia reactiva ($R = 0.47$; $p = 0.018$).

Abreviatures: **CPE** = cèl·lules progenitores endotelials; **DMF** = dilatació mitjançada per flux.

Taula 11. Correlacions bivariants entre els factors de risc cardiovascular clàssics, paràmetres antropomètrics i de pressió arterial, paràmetres bioquímics i inflamatoris, número de CPE circulants i després de cultiu, tractament amb estatines o blocadors dels sistema renina-angiotensina, i la dilatació mitjançada per flux de l'artèria braquial (DMF).

	<i>R</i>	<i>P</i>		<i>R</i>	<i>P</i>
Edat	0.095	0.645	Concentració CPE	0.469	0.018
Sexe	-0.545	0.586	Nº CPE / camp	0.350	0.080
IMC	-0.339	0.090	Glicèmia	-0.353	0.077
Dislipèmia	-1.054	0.292	HbA_{1c}	0.071	0.729
Tabaquisme	-1.279	0.201	Colesterol-LDL	0.156	0.457
Sedentarisme	-0.056	0.956	FGe-MDRD	0.061	0.766
Antecedents CV	0.000	1.000	QACO	-0.052	0.802
Estatines	-0.441	0.659	Homocisteïna	-0.414	0.045
Blocadors SRA	-0.441	0.659	PCR	-0.305	0.130
PAS-c	-0.358	0.072	MCP-1	-0.520	0.006
PAD-c	-0.182	0.373	e-selectina	-0.569	0.002
PAS-24h	-0.385	0.052	p-selectina	-0.412	0.041
PAD-24h	-0.251	0.217	sVCAM-1	-0.234	0.251
IMVE	0.245	0.248	sICAM-1	0.018	0.933

Abreviatures: **CPE** = cèl·lules progenitores endotelials; **CV** = cardiovascular; **FGe-MDRD** = filtrat glomerular estimat segons l'equació de l'estudi Modification of Diet in Renal Disease; **HbA_{1c}** = hemoglobina glicosilada; **IMC** = índex de massa corporal; **IMVE** = índex de massa ventricular esquerre; **LDL** = lipoproteïnes de baixa densitat; **MCP-1** = proteïna quimiotàctica de monòcits tipus 1; **PAS-c** = pressió arterial sistòlica clínica; **PAD-c** = pressió arterial diastòlica clínica; **PAS-24h** = pressió arterial sistòlica-24 hores; **PAD-24h** = pressió arterial diastòlica-24 hores; **PCR** = proteïna C-reactiva; **QACO** = quocient albúmina/creatinina en orina; **sICAM-1** = molècula d'adhesió intercel·lular soluble tipus 1; **SRA** = sistema renina-angiotensina; **sVCAM-1** = molècula d'adhesió cel·lular vascular soluble tipus 1.

Per tal d'estimar el valor predictiu de la concentració de CPE circulants per explicar la variabilitat de la vasodilatació endoteli-dependent mesurada mitjançant DMF, varem realitzar una anàlisi de regressió lineal múltiple. Hi varem incloure com a variables explicatives aquelles que es coneix poden influir en la funció vascular i progressió de l'aterosclerosi i que en les anàlisis bivariants s'havien correlacionat amb la DMF. Així, considerant com a variable dependent la DMF, concretament la transformació logarítmica de la mateixa donada la dispersió dels seus valors (log-DMF), les variables predictives incloses en el model van ser el número de CPE circulants, la concentració plasmàtica d'homocisteïna i els nivells sèrics d' e-selectina. No es van incloure els valors de MCP-1 i de p-selectina perquè mostraren forta col·linealitat amb e-selectina. Com es mostra a la Taula 12, després d'ajustar per edat, només el número de CPE circulants i els nivells plasmàtics d'homocisteïna van resultar ser predictors independents de la vasodilatació endoteli-dependent mesurada com a DMF de l'artèria braquial després d'hiperèmia reactiva ($R^2 = 0.556$; $p = 0.004$).

Taula 12. Anàlisi de regressió lineal múltiple (ajustat per edat): factors independents associats amb la dilatació mitjançada per flux (DMF).

Factors de risc	Coefficient no estandarditzat (B) (IC 95%)	Coefficient (β) Estandarditzat	p
Homocisteïna	-0.171 (-0.280 to -0.061)	-0.547	0.004
CPE circulants	0.012 (0.002 to 0.022)	0.385	0.027

Abreviatures: **CPE** = cèl·lules progenitores endotelials.

Les dades s'expressen com a coeficients de regressió i valors de p.

Co-variables incloses: edat, e-selectina, homocisteïna, cèl·lules progenitores endotelials circulants.

Variable dependent: log-DMF (transformació logarítmica de dilatació mitjançada per flux). $R^2=0.556$, $p=0.004$.

Per tal de reafirmar els nostres resultats, varem fer una anàlisi recíproca de tal manera que varem dividir els subjectes de la mostra en dos grups d'acord amb el número de CPE circulants (Taula 13). Demostrem altra vegada amb aquesta nova anàlisi que hi ha una relació estreta entre el número de CPE circulants i la DMF. Els malalts amb HTA-R que estaven en el grup dels subjectes amb el tercil més baix de concentració de CPE en comparació amb els malalts que pertanyien al grup de

subjectes que tenien una concentració de CPE dintre dels dos terçils superiors de les mateixes, van mostrar una DMF significativament reduïda ($p = 0.031$). En canvi, no hi havia diferències entre els dos grups quant a altres determinants coneguts de les CPE, com són l'edat, la PAS-24hr o els nivells d'homocisteïna, ni tampoc quant als biomarcadors d'inflamació, tot i que tots ells van mostrar una tendència a ser més elevats en el tercil amb el número més baix de CPE circulants.

Taula 13. Característiques dels malalts amb HTA refractària sotmesos a estudi de vasodilatació endoteli-dependent ($n = 29$) segons el número de CPE circulants (CPE / 10^5 MN) després de fer-ne la distribució en terçils.

	Tots els subjectes	Nº CPE en el tercil inferior (≤ 15)	Nº CPE en els dos terçils superiors (≥ 16)	P
Edat (anys)	58.3±10.1	60.1±9,7	57.3±10.7	0.49
PAS-24hr (mmHg)	143.6±14.2	146.6±7.9	140.9±16.3	0.23
MCP-1 (pg/mL)	457.1[332.0-531.9]	488.8 [351.4-562.6]	380.2[309.9-521.6]	0.21
E-selectina (ng/mL)	38.9[22.3-77.8]	68.0[22.0-81.2]	33.0[21.5-73.9]	0.33
P-selectina(ng/mL)	129.8[110.9-171.4]	141.3[125.7-185.0]	119.5[103.7-164.6]	0.052
Homocisteïna (μmol/L)	9.3±3.2	10.6±3.3	8.9±2.6	0.19
Log-DMF (%)	5.2±1.0	4.7±0.9	5.6±0.8	0.031

Dades expressades com a Mitjana \pm DE o Mediana [quartil 1;3].

Els valors de P s'han calculat mitjançant una comparació entre els grups amb recompte més baix o més alt de CPE.

Abreviatures: **CPE** = cèl·lules progenitores endotelials; **Log-DMF** = transformació logarítmica de dilatació mitjançada per flux; **MCP-1** = monocyte chemotactic protein type 1; **MN** = cèl·lules mononuclears; **PAS**=pressió arterial sistòlica.

D'altra banda, a més a més d'avaluar la DMF també varem analitzar si el flux sanguini basal en l'artèria braquial es correlacionava amb el número de CPE circulants o bé després de cultiu, sense observar-ne cap relació ($r=0.113$; $p=0.59$ i $r=0.371$; $p=0.06$, respectivament). Tampoc es va correlacionar amb cap dels altres paràmetres analitzats, tant els de laboratori, les mesures de PA o les dades ecocardiogràfiques com els corresponents a característiques antropomètriques i demogràfiques, antecedents patològics o tractaments farmacològics.

VII. DISCUSSIÓ

VII. DISCUSSIÓ

1. Síntesi dels objectius i resultats

La hipertensió arterial refractària constitueix un problema important en la població general degut a que, amb una prevalença no menyspreable^{2,16}, comporta un elevat risc cardiovascular amb la consegüent morbimortalitat associada¹²⁻¹⁵, afegint-s'hi, per definició, una considerable dificultat en el seu maneig. La seva etiopatogènia és encara ara una gran incògnita. Creiem, per tant, que qualsevol avenç en el coneixement dels mecanismes que condueixen a la HTA pot contribuir a millorar el seu abordatge i a prevenir o, si més no, reduir, la morbimortalitat que comporta.

D'altra banda, la caracterització fenotípica i funcional de les CPE ha revolucionat en la darrera dècada la recerca en el camp de l'angiogènesi, dels factors que s'hi relacionen i també de les possibilitats terapèutiques d'aquestes cèl·lules enfront de la isquèmia d'òrgans i teixits. El número de CPE circulants i les característiques funcionals de les mateixes s'han vist reduïts en presència de la majoria de factors de risc cardiovascular, tant els clàssics com els identificats més recentment, també anomenats emergents o "nous" factors de risc cardiovascular. No obstant, fins ara cap estudi ha avaluat de forma acurada la concentració de CPE circulants en relació amb la HTA, i en qualsevol cas no s'ha aconseguit demostrar una disminució de la mateixa en aquests malalts, enfront al que seria d'esperar¹²⁰.

La importància de la present Tesi Doctoral creiem que rau en la demostració d'un número disminuït de CPE circulants i després de cultiu en malalts amb HTA de grau sever, en concret amb HTA-R, respecte a voluntaris sans normotensos¹⁶⁵.

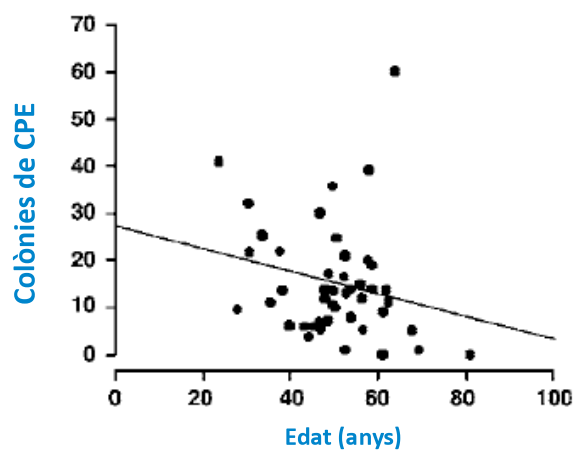
Més enllà d'aquesta troballa, també hem pogut demostrar que un menor número de CPE circulants es relaciona de forma directa amb una pitjor vasodilatació endoteli-dependent. Diversos estudis assenyalen que aquesta alteració sembla estar present en l'inici del procés d'aterosclerosi i podria explicar la major morbimortalitat cardiovascular dels malalts amb HTA-R.

Aquests dos aspectes, la relació de les CPE amb la HTA-R i l'associació de la reducció de CPE amb una disminució de la vasodilatació endoteli-dependent en aquests malalts, que són els que han estat els objectius respectius dels dos estudis que constitueixen aquesta Tesi Doctoral, són els que desenvoluparem amb detall i per separat a continuació.

2. Alteració en els nivells de cèl·lules progenitores endotelials circulants en els malalts afectes d'hipertensió arterial refractària.

La majoria d'estudis han mostrat que la concentració de CPE en sang perifèrica està reduïda en presència dels diferents factors de risc cardiovascular. Un dels més importants és l'edat, amb la constatació que l'envelliment s'associa a una reducció en el número de CPE circulants⁹⁹, com queda palès en el treball de Hill⁹⁶ (veure Figura 11) però, sobretot, en les seves característiques funcionals, com va mostrar Heiss en el seu treball, en que sobretot la proliferació i la migració de les CPE era clarament inferior en la població estudiada de major edat respecte als més joves¹⁰².

Figura 11: Disminució del recompte de colònies de CPE d'acord amb l'edat en població sana. (adaptat de Khakoo⁵⁷, sobre el treball de Hill⁹⁶).



Modificat de Khakoo, sobre el treball de Hill -NEJM-2003

Una altra condició que determina una disminució en el número i activitat funcional de les CPE és la diabetis, i aquesta relació ha estat confirmada en pràcticament tots els estudis que ho han avaluat^{59,123-125}. Com ja hem comentat, altres factors de risc que exerceixen de forma evident un efecte modulador negatiu sobre el número de CPE circulants són la hipercolesterolèmia^{59,96,100}, la insuficiència renal¹²⁶, el tabac^{56,100,128,129} o els nivells elevats d'homocisteïnèmia^{130,131}. No obstant, respecte a un dels factors de risc cardiovascular clàssics més important, la HTA, hi ha més controvèrsia quant als possibles efectes sobre les CPE.

En aquest estudi hem observat que els malalts amb HTA-R presenten una reducció significativa en el número de CPE circulants respecte als controls normotensos. Per tal de minimitzar la interferència en aquests resultats de possibles confusors que podien determinar les diferències en el número i proliferació de les CPE entre les dues poblacions analitzades, varem excloure els diabètics d'aquest estudi. Quant a l'edat, si bé és cert que hi ha una diferència notable i significativa d'edat mitjana entre la cohort de malalts amb HTA-R i la de voluntaris sans normotensos, totes les anàlisis dutes a terme es van fer ajustant per edat. No només això, sinó que varem analitzar un subgrup de 13 parelles (casos-control) aparellades per edat, obtenint uns resultats absolutament superposables als obtinguts inicialment en la totalitat de la població estudiada.

Diferents factors poden ser els responsables de les diferències d'aquesta troballa en el nostre estudi respecte als altres treballs que han avaluat el número de CPE en relació amb la HTA, diferències que possiblement es puguin explicar per l'heterogeneïtat en els marcadors antigènics utilitzats per identificar les CPE d'una banda i la diversitat de les poblacions a estudi per una altra. Així, Werner i Vasa^{59,100} van estudiar les CPE en subjectes amb malaltia coronària confirmada, mentre que en la població estudiada en el present estudi només dos pacients havien patit un infart agut de miocardi i no hi havia constància de malaltia coronària pel que fa a la resta de la mostra. Potser les CPE representen un marcador de risc que unificaria les interaccions complexes de múltiples factors negatius i potser en aquesta població amb malaltia coronària tinguin més importància altres factors més que no pas la HTA. A més, aquests dos investigadors van utilitzar la positivitat per CD34 i KDR com a mètode per identificar les CPE. És possible que en el present estudi, en que teníem com a requisit que a més les cèl·lules fossin CD133 positives

i mostressin una lleugera positivitat per CD45, haguem treballat amb una població de CPE en estadi molt més precoç que el detectat per aquests altres autors. Respecte a l'altre treball d'interès que avalua la relació entre nivells circulants de CPE i la HTA, el de Delva i col.¹²², cal esmentar que la població estudiada eren malalts amb HTA essencial i nivells de PA promig de 148/91 mmHg pel que fa a les pressions sistòlica i diastòlica respectivament, estant la majoria d'ells sense tractament antihipertensiu o amb monoteràpia, tractant-se, per tant, de subjectes amb HTA en un estadi força menys sever que els estudiats en el present estudi.

S'ha apuntat a diversos mecanismes com a possibles responsables d'aquesta associació entre un baix número de CPE circulants i la HTA, com ara un augment en el consum de CPE degut a un major dany endotelial, un empitjorament en el procés de mobilització d'aquestes cèl·lules des del moll d'os a la sang perifèrica o un increment en l'apoptosi de CPE. Alguns autors també han suggerit amb els seus experiments que en els malalts hipertensos podria haver una reducció de l'activitat funcional de les CPE degut a un increment o acceleració de l'envelliment de les mateixes mesurat per una menor activitat de telomerasa¹¹⁹. D'altra banda també s'ha dit que la disminució de CPE en malalts hipertensos es podria explicar per una regulació positiva de NAD(P)H oxidasa en presència d'angiotensina II, la qual augmentaria l'estrès oxidatiu intracel·lular, que a la vegada comportaria una marcada acceleració en l'envelliment de les CPE¹¹⁴. Un altre dels possibles mecanismes que podrien relacionar la HTA amb la disminució del número de CPE és l'assenyalat per Pirro i col. en un treball recent¹⁶⁶. En ell mostren una associació entre l'expressió gènica reduïda d'homeobox A9, que en condicions fisiològiques contribueix a que les CPE desenvolupin la seva acció, i la reducció de CPE circulants en malalts hipertensos, suggerint doncs que l'expressió d'homeobox A9 podria contribuir a modular el número de CPE circulants i per tant intervenir en el dany endotelial induït per HTA. En qualsevol cas, el treball que aquí es presenta no va plantejar com a objectiu estudiar els possibles mecanismes etiopatogènics d'aquesta relació entre HTA i CPE.

També hi ha altres factors que promouen una modulació positiva d'aquestes CPE circulants. D'ells, potser dels que en tenim major evidència són l'exercici físic¹⁰⁶, els estrògens^{104,105} i alguns fàrmacs, dels quals els més importants són els blocadors del sistema renina-angiotensina¹¹³⁻¹¹⁶ i els inhibidors de l'HMG-CoA reductasa^{100,108-110}.

Respecte a l'exercici físic, no vam trobar diferències valorables pel que fa a la seva pràctica entre les dues poblacions comparades.

Quant a la possible acció dels estrògens, no ens va ser possible en aquest estudi tenir en consideració aquest paràmetre, i això podria suposar una limitació al mateix. No obstant, el fet que molts dels estudis en humans fets fins ara sobre CPE s'hagin limitat a la població masculina creiem que deixa un cert buit respecte al paper de les mateixes en les dones. En el present estudi no vam trobar diferències entre ambdós sexes, lo que creiem que li confereix un valor afegit al que aquest treball aporta.

Pel que fa a la possible modulació positiva de les CPE per part d'alguns fàrmacs, hem d'assenyalar que el 44% de la població hipertensa estudiada rebia una estatina com a part del seu tractament hipolipemiant i el 92% un fàrmac blocador del sistema renina-angiotensina com a part del règim antihipertensiu indicat, mentre que cap dels subjectes del grup control prenia cap fàrmac d'aquests tipus. Aquest fet, tenint en compte que aquests fàrmacs exerceixen una regulació positiva de les CPE, creiem que dona més valor a les diferències trobades en el present estudi entre els normotensos i la població hipertensa, que tot i rebre majoritàriament substàncies d'aquestes classes terapèutiques presenten un número reduït de CPE circulants. Això suggereix que probablement l'acció de la HTA-R sobre les CPE és certament molt potent.

A més a més de la HTA-R com a predictor independent del número de CPE circulants, en el present estudi hem trobat que també una pitjor funció renal determinada mitjançant el FGe-MDRD es correlaciona de forma directa, independent i significativa, amb el número de CPE circulants. Aquesta dada ve a confirmar els resultats obtinguts per de Groot i col. en que van mostrar que els malalts amb insuficiència renal avançada, avaluats segons la creatinina plasmàtica (mitjana \pm DE: 5.67 ± 0.39 mg/dL), tenien un número reduït de CPE respecte a controls sans amb funció renal normal¹²⁶. Si bé la mesura de la funció renal utilitzada no és la mateixa i el grau de insuficiència renal entre aquest estudi i el nostre no són comparables, la troballa en el present estudi de que la reducció del FGe-MDRD en HTA-R respecte als normotensos, amb valors de 64.7 ± 14.4 mL/min/1.73m² respecte a 72.3 ± 9.5 , és predictora independent d'una reducció en les CPE, ens permet suggerir que probablement un grau d'insuficiència renal més lleu a l'avaluat per Groot determina ja una disminució de les CPE circulants.

3. Alteració en la proliferació de cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu *in vitro* en els malalts afectes d'hipertensió arterial refractària.

Al estudiar la proliferació de les CPE després de 7 dies de cultiu *in vitro* en medi adequat, trobem novament que la HTA-R n'és l'únic determinant independent. Altra vegada l'efecte de la HTA-R enfront de la normotensió sobre les CPE després de cultiu és independent d'altres factors que hi podrien influir, com són els nivells de colesterol-LDL, els paràmetres de funció renal o les proteïnes de fase aguda com el fibrinogen i la PCR.

En les anàlisis bivariants vam observar una correlació positiva entre el número de CPE després de cultiu i l'IMVE. Una hipòtesi per explicar aquesta dada seria que podria tractar-se d'una resposta davant el dany dels petits vasos induït per la hipoxèmia degut a la HVE, i per tant la regulació positiva de les CPE seria un intent d'estimular la neovascularització i de millorar l'angiogènesi a aquest nivell. En qualsevol cas, això no ha estat investigat en el present estudi i finalment aquesta associació perd significació en l'anàlisi multivariant, enfront de la pròpia HTA-R.

4. Associació entre les CPE circulants i la vasodilatació endoteli-dependent.

En el present estudi hem observat com en aquests malalts amb HTA-R el número de CPE circulants en sang perifèrica es relaciona de forma directa amb la capacitat de dilatació a nivell de les artèries de conducció, concretament de l'artèria braquial, al avaluar-ne la DMF després d'hiperèmia reactiva. Aquesta associació entre els nivells de CPE en sang perifèrica i la vasodilatació endoteli-dependent s'havia demostrat en altres grups poblacionals, en concret en malalts amb malaltia coronària¹⁶⁷ i en una petita població d'homes sans del Regne Unit d'origen sudasiàtic¹³⁴, però no en hipertensos. Altres autors han trobat resultats similars, però en el cas de Hill i col. es tractava d'homes sans amb diversos graus de risc cardiovascular dels quals només un 22% eren hipertensos⁹⁶. D'altra banda, en l'estudi de Heiss es demostra una relació entre la DMF i la migració i proliferació de CPE en individus sans d'edat més avançada respecte als més joves, sense factors de risc cardiovascular majors, però en canvi no troben relació amb un número de CPE reduït¹⁰².

La HTA s'ha relacionat amb una funció endotelial anòmal en la circulació perifèrica, coronària i renal en la majoria d'estudis i aquest podria ser un mecanisme pel qual la HTA afavoriria el desenvolupament i progressió de la malaltia vascular que sovint s'hi associa. Tot i que hi ha evidència de que la HTA sostinguda atenua la DMF en les artèries de conducció en la circulació perifèrica i coronària, la patogènesi d'aquesta associació és poc coneguda¹⁶⁸.

Creiem, doncs, que en aquest treball demostrem per primera vegada l'associació entre una disminució de CPE en sang perifèrica i la disfunció endotelial avaluada d'acord amb la mesura de la DMF, en una població d'homes i dones amb HTA-R. Això ens permet suggerir que la disfunció endotelial observada en malalts amb HTA podria estar relacionada amb un desequilibri en l'homeòstasi endotelial com a conseqüència d'una modulació negativa de les CPE.

D'altra banda, en el present estudi hem demostrat també que els nivells elevats d'homocisteïna plasmàtica s'associen de forma independent amb una pitjor vasodilatació endoteli-dependent. Varem descartar que hi hagués col·linealitat entre les CPE i la homocisteïna, indicant per tant que la disminució de CPE circulants en els malalts amb HTA-R pot modificar la funció endotelial per un mecanisme diferent al relacionat amb l'homocisteïna. Tot i que algun autor ha trobat una correlació inversa entre CPE i homocisteïna¹⁶⁹, el nostre estudi previ va objectivar un número reduït de CPE en malalts amb HTA-R respecte a subjectes sans amb nivells d'homocisteïna plasmàtica equivalents¹⁶⁵. En malalts fins i tot amb hiperhomocisteïnèmia lleu i sense cap altre factor de risc vascular identificable s'ha demostrat una pitjor vasodilatació endoteli-dependent, però els mecanismes patobiològics subjacents a aquesta associació no acaben d'estar ben determinats¹⁷⁰. Es creu que probablement el mecanisme més important estigui en relació amb l'efecte de l'homocisteïna sobre la biodisponibilitat d'òxid nítric, un mediador de vasoreactivitat¹⁷¹. A més a més, s'ha vist que nivells elevats d'homocisteïna semblen exercir una modulació positiva de diverses quemoquines i molècules d'adhesió¹⁶⁸. En el present estudi trobem una relació entre la DMF i alguns marcadors inflamatoris, com E- i P-selectines i MCP-1. No obstant, en l'anàlisi multivariant perden significació, mentre que el número de CPE i els nivells d'homocisteïna romanen com a predictors independents de la DMF, suggerint que potser aquests siguin marcadors més potents de disfunció endotelial i que els marcadors inflamatoris podrien dependre d'un d'ells o d'ambdós.

Aquesta troballa demostrada en el present estudi d'una associació entre la disfunció de la vasodilatació endoteli-dependent mitjançada per flux i una disminució del número de CPE circulants en malalts amb HTA-R, es veu refermada per l'anàlisi que mostrem en la Taula 11. Al dividir el número de CPE en tercils, els individus que tenien una concentració dins del tercil inferior presentaven una DMF significativament més baixa que aquells amb un número de CPE circulants dins dels dos tercils superiors, i aquesta va ser la única diferència significativa entre aquests dos subgrups de malalts, malgrat que l'edat, la PAS-24hr, els nivells plasmàtics d'homocisteïna i dels diferents biomarcadors d'inflamació van mostrar una tendència no significativa a presentar tots ells valors més elevats en aquest grup amb menys CPE.

5. Associació entre les CPE després de cultiu *in vitro* i la vasodilatació endoteli-dependent.

En el present estudi no varem trobar una associació entre la proliferació de CPE després de cultiu i la vasodilatació endoteli-dependent avaluada per DMF, tot i que es va observar una tendència a aquesta correlació sense que arribés a ser estadísticament significativa. Tot i que semblaria lògica també aquesta associació, el cert és que de forma semblant Werner i col. van trobar, en malalts coronaris, relació entre el número de CPE circulants i disfunció endotelial però no amb les CPE després de proliferació en cultiu¹⁶⁷. D'altra banda, Hill i col. van mostrar com el número d'unitats formadores de colònies de CPE es correlacionava amb la funció endotelial mesurada per DMF en l'artèria braquial en homes sans amb diferents graus de risc cardiovascular⁹⁶. En el nostre cas, i donada la tendència observada, no podem descartar que aquesta manca de relació estigui en relació amb la grandària de la mostra.

VIII. CONCLUSIONS

VIII. CONCLUSIONS

1. La concentració de cèl·lules progenitores endotelials circulants està disminuïda en els malalts afectes d'hipertensió arterial refractària respecte a normotensos sans.
2. La proliferació de cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu està disminuïda en els malalts afectes d'hipertensió arterial refractària respecte a normotensos sans.
3. A més, en els malalts amb hipertensió arterial refractària hi ha una correlació directa i independent entre el grau de funció renal avaluada per estimació del filtrat glomerular i el número de cèl·lules progenitores endotelials circulants en sang perifèrica.
4. En malalts amb hipertensió arterial refractària, la reducció del número de cèl·lules progenitores endotelials circulants es correlaciona de forma independent amb una vasodilatació endoteli-dependent disminuïda.
5. A més, en malalts amb hipertensió arterial refractària hem trobat una associació inversa significativa entre els nivells d'homocisteïna plasmàtica i la vasodilatació endoteli-dependent.
6. En malalts amb hipertensió arterial refractària no hem trobat correlació entre la proliferació de les cèl·lules progenitores endotelials després de cultiu i la vasodilatació endoteli-dependent, si bé hi ha una tendència a aquesta associació.

IX. IMPORTÀNCIA I RELLEVÀNCIA CLÍNICA

IX. IMPORTÀNCIA I RELLEVÀNCIA CLÍNICA

Els resultats de la present Tesi Doctoral creiem que poden ser rellevants tant pel que fa a l'avaluació del risc cardiovascular en els malalts amb HTA-R i del pronòstic dels mateixos, com en referència a la recerca dels mecanismes fisiològics i patogenètics de la malaltia vascular.

D'una banda, la troballa d'aquesta clara associació independent entre el número i la proliferació després de cultiu de les CPE en els malalts amb HTA-R permet avaluar amb un paràmetre diferent, i potser integrador dels diferents marcadors de risc, el grau d'aterosclerosi i de risc cardiovascular d'aquesta població. Efectivament, s'ha suggerit que aquestes cèl·lules circulants, les CPE, podria representar una nova classe de biomarcadors que de forma natural integrin diversos efectes genètics i ambientals, les complexes interaccions positives i negatives dels diferents mediadors que afecten la monocapa endotelial. En aquesta Tesi Doctoral demostrem que l'associació d'una modulació negativa de les CPE amb la HTA-R és més potent que la d'altres factors de risc ben coneguts, com són la dislipèmia o el tabaquisme, i fins i tot més enllà de la influència de l'edat.

A més a més, les dades aportades en l'Estudi 2 d'aquesta Tesi Doctoral permeten relacionar directament la disminució de les CPE circulants amb una reducció de la vasodilatació endoteli-dependent, i per tant amb una mesura d'alteració a nivell vascular. És a dir, que posem en evidència que aquest paràmetre, la concentració de CPE en sang perifèrica, ens serveix com a mesura indirecta de dany orgànic.

Aquesta troballa, per tant, obre tot un camp a futures investigacions que permetin ampliar el coneixement dels mecanismes subjacents al desenvolupament de l'aterosclerosi i a les interrelacions entre un factor de risc tan prevalent, la HTA, i la patologia cardiovascular. Certament, però, els mecanismes responsables de la reducció en el número i capacitat funcional de les CPE resten encara pendents d'aclarir.

D'altra banda, el fet que aquestes alteracions les haguem trobat en malalts amb HTA refractària, sobretot pel que fa a la modulació negativa de les CPE, quan prèviament no s'havia pogut demostrar en malalts amb HTA de grau menys sever, reafirma el concepte que la HTA refractària implica una major alteració a nivell de l'endoteli vascular i de la neoangiogènesi, amb la conseqüent probable relació amb

una major morbimortalitat cardiovascular, tot i que aquest darrer punt no ha estat investigat en el present estudi transversal.

Els coneixements actuals permeten afirmar que determinades substàncies, entre elles i de forma remarcable les estatines i els blocadors del sistema renina-angiotensina, però també altres factors com l'exercici físic, són moduladors positius de les CPE. El resultat dels treballs que constitueixen la present Tesi Doctoral donen peu a suggerir que tots ells haurien de ser considerats per optimitzar el tractament dels malalts amb HTA-R.

Finalment, no podem deixar d'esmentar que, donada la rellevància que semblen tenir les CPE en l'avaluació i el coneixement de la malaltia cardiovascular, es fa palès la necessitat peremptòria d'estandarditzar-ne les tècniques d'identificació i d'arribar a un consens sobre la seva caracterització fenotípica per tal d'avançar més en el seu coneixement. A la vegada, urgeix també la investigació sobre mètodes a ser possible més senzills i assequibles per a la seva quantificació.

X. BIBLIOGRAFIA

X. BILBIOGRAFIA

1. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007; 25:1105-1187.
2. de la Sierra A, Gorostidi M, Marín R, Redón J, Banegas JR, Armario P, et al. Evaluation and management of hypertension in Spain. A consensus guide. *Med Clin* 2008; 131:104-116.
3. Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Ruilope LM, Graciani A, Luque M, de la Cruz-Troca JJ, et al. Hypertension magnitude and management in the elderly population of Spain. *J Hypertens* 2002; 20:2157-2164.
4. Banegas JR, Segura J, Ruilope LM, Luque M, Garcia-Robles R, Campo C, et al. (CLUE Study Group Investigators). Blood pressure control and physician management of hypertension in hospital hypertension units in Spain. *Hypertension* 2004; 43:1338-1344.
5. Banegas JR. Epidemiología de la hipertensión arterial en España. Situación actual y perspectivas. *Hipertensión* 2005; 22:353-362.
6. Gorostidi M, Sobrino J, Segura J, Sierra C, de la Sierra À, Hernández del Rey R, et al., on behalf of the Spanish Society of Hypertension ABPM Registry investigators. *J Hypertens* 2007; 25:977-984.
7. Sarafidis PA, Bakris GL. State of hypertension management in the United States: confluence of risk factors and the prevalence of resistant hypertension. *J Clin Hypertens* 2008; 10:130-139.
8. Muxfeldt ES, Bloch KV, Nogueira Ada R, Salles GF. True resistant hypertension: is it possible to be recognized in the office? *Am J Hypertens* 2005; 18:1534-1540.
9. Kaplan NM. Resistant hypertension. *J Hypertens* 2005; 23:1441-1444.
10. Cuspidi C, Macca G, Sampieri L, Michev I, Salerno M, Fusi V, et al. High prevalence of cardiac and extracardiac target organ damage in refractory hypertension. *J Hypertens* 2001; 19:2063-2070.
11. Hernández del Rey R, Armario P, Martín-Baranera M, Sánchez P, Cárdenas G, Pardell H. Target-organ damage and cardiovascular risk profile in resistant hypertension. Influence of the white-coat effect. *Blood Press Monit* 1998; 3:331-337.

12. Pierdomenico SD, Lapenna D, Bucci A, Di Tommaso R, Di Mascio R, Manente BM, et al. Cardiovascular outcome in treated hypertensive patients with responder, masked, false resistant, and true resistant hypertension. *Am J Hypertens* 2005; 18:1422-1428.
13. Redón J, Campo C, Narciso ML, Rodicio JL, Pascual JM, Ruilope LM. Prognostic value of ambulatory blood pressure monitoring in refractory hypertension: a prospective study. *Hypertension* 1998; 31:712-718.
14. Park J, Campese V. Clinical characteristics of resistant hypertension: the importance of compliance and the role of diagnostic evaluation in delineating pathogenesis. *J Clin Hypertens* 2007; 9:7-12.
15. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R: Prospective Studies Collaborative. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002; 360:1903-1913.
16. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD, et al. Resistant Hypertension: Diagnosis, Evaluation and Treatment: A scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 2008; 51:1403-1419.
17. Black HR, Elliott WJ, Neaton JD, Grandits G, Grambsch P, Grimm RH Jr., et al. Baseline characteristics and early blood pressure control in the CONVINCE Trial. *Hypertension* 2001; 37:12-18.
18. The ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA* 2002; 288:2981-2997.
19. Otero F, Grigorian L, Lado M, Lado Á, Turrado V, Santos JA, et al. Asociación entre hipertensión refractaria y riesgo cardiometabólico. Estudio HIPERFRE. *Nefrología* 2008; 28:425-432.
20. Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function. A barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002; 106:640-642.
21. Schwartz SM, Benditt EP. Clustering of replicating cells in aortic endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73:651-653.
22. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells. Mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1185-1189.
23. Hirsch EZ, Chisolm 3rd GM, White HM. Reendothelialization and maintenance of endothelial integrity in longitudinal denuded tracks in the thoracic aorta of rats. *Atherosclerosis* 1983; 46:287-307.

24. Reidy MA, Bowyer DE. Distortion of endothelial repair. The effect of hypercholesterolaemia on regeneration of aortic endothelium following injury by endotoxin. A scanning electron microscope study. *Atherosclerosis* 1978; 29:459-466.
25. Taddei S, Salvetti A. Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications. *J Hypertens* 2002; 20:1671-1674.
26. Lahera V, Cediel N, de las Heras N, Vázquez-Pérez S, Sanz-Rosa D, Vázquez-Cruz B, Cachofeiro V. Alteraciones del endotelio en la hipertensión. *Nefrología* 2003; 23:3-12.
27. Ward NC, Croft KD, Hodgson J, Rich L, Beilin LJ, Puddey IB. Brachial artery vasomotor function is inversely associated with 24-h ambulatory blood pressure. *J Hypertens* 2004; 22:967-972.
28. Mitchell GF, Parise H, Vita JA, Larson MG, Warner E, Keaney JF Jr., et al. Local shear stress and brachial artery flow-mediated dilation: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004; 44:134-139.
29. Plavnik FL, Ajzen SA, Christofalo DM, Barbosa CS, Hohlmann O Jr. Endothelial function in normotensive and high-normal hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 2007; 21:467-472.
30. Landmesser U, Drexler H. Endothelial function and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2007; 22:316-320.
31. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1149-1160.
32. Joannides R, Bellien J, Thuillez C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function – a focus on resistance arteries. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2006; 20:311-320.
33. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340:1111-1115.
34. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsura H, Kajiyama G, Oshima T. A noninvasive measurement of reactive hyperemia that can be used to assess resistance artery endothelial function in humans. *Am J Cardiol* 2001; 87:121-125.
35. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: A statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005; 23:7-17.

36. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1235-1241.
37. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound measurement of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:257-265.
38. Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 106:653-658.
39. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104:2673-2678.
40. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wolf G, Kostner K, Maurer G, Weidinger F. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol* 2000; 86:207-210.
41. Yoshida T, Kawano H, Miyamoto S, Motoyama T, Fukushima H, Hirai N, Ogawa H. Prognostic value of flow-mediated dilation of the brachial artery in patients with cardiovascular disease. *Intern Med* 2006; 45:575-579.
42. Gokce N, Keaney JF Jr., Menzoian JO, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 2002; 105:1567-1572.
43. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104:191-196.
44. Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:505-510.
45. Muiesan ML, Salvetti M, Pajni A, Monteduro C, Galbassini G, Poisa P, et al. Prognostic role of flow-mediated dilatation of the brachial artery in hypertensive patients. *J Hypertens* 2008; 26:1612-1618.
46. Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007; 115:2390-2397.

47. Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation* 2005; 112:976-983.
48. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351:88-92.
49. Haim M, Tanne D, Boyko V, Reshef T, Goldbourt U, Leor J, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease: data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:1133-1138.
50. Thøgersen AM, Jansson J, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998; 98:2241-2247.
51. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JCW. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1995; 332:635-641.
52. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, Dahlén G, Szamosi A, Landou C, et al. Plasminogen activator inhibitor in plasma : risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987; 2:3-9.
53. Omland T, Lie RT, Aakvaag A, Aarsland T, Dickstein K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89:1573-1579.
54. Witte DR, Broekmans WM, Kardinaal AF, Klöpping-Ketelaars IA, van Poppel G, Bots ML, et al. Soluble intercellular adhesion molecule 1 and flow-mediated dilatation are related to the estimated risk of coronary heart disease independently from each other. *Atherosclerosis* 2003; 170:147-153.
55. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; 9:702-712.
56. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events. *Circulation* 2005; 111:2981-2987.
57. Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med* 2005; 56:79-101.

58. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964-967.
59. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353:999-1007.
60. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004; 95:343-353.
61. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 2004; 8:498-508.
62. Szmitko PE, Fedak PWM, Weisel RD, Stewart DJ, Kutryk MJB, Verma S. Endothelial progenitor cells. New hope for a broken heart. *Circulation* 2003; 107:3093-3100.
63. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107:1164-1169.
64. Leri A, Kajstura J. Endothelial progenitor cells. Unexpected disclosures. *Circ Res* 2005; 97:299-301.
65. Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* 2008; 197:496-503.
66. Aicher A, Rentsch M, Sasaki KI, Ellwart JW, Fändrich F, Siebert R, et al. Nonbone Marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res* 2007; 100:581-589.
67. Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292:1-18.
68. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1567-1572
69. Kong D, Melo LG, Gnechi M, Zhang L, Mostoslavsky G, Liew CC, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation* 2004; 110:2039-2046.
70. Wu Y, Ip JE, Huang J, Zhang L, Matsushita K, Liew CC, et al. Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res* 2006; 99:315-322.

71. Duan H, Cheng L, Sun X, Wu Y, Hu L, Wang J, et al. LFA-1 and VLA-4 involved in human high proliferative potential-endothelial progenitor cells homing to ischemic tissue. *Thromb Haemost* 2006; 96:807-815.
72. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10:858-864.
73. Fadini GP, Agostini C, Sartore S, Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007; 194:46-54.
74. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularisation. *Nat Med* 1999; 5:434-438.
75. Khan SS, Solomon MA, Mc Coy JP, Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 64:1-8.
76. Kovacic JC, Moore J, Herbert A, Ma D, Boehm M, Graham RM. Endothelial progenitor cells, angioblasts, and angiogenesis – Old terms reconsidered from a current perspective. *Trends Cardiovasc Med* 2008; 18:45-51.
77. Popa ER, Harmsen MC, Tio RA, van der Strate BW, Brouwer LA, Schipper M, et al. Circulating CD34⁺ progenitor cells modulate host angiogenesis and inflammation in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41:86-96.
78. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95:3106-3112.
79. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95:952-958.
80. Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res* 2006; 98:e20-e25.
81. Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, Lazzeri E, Mazzinghi B, Frosali F, et al. CD14⁺CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating progenitors. *Circ Res* 2005; 97:314-322.
82. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 2003; 93:1023-1025.

83. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Hypertension* 2004; 24:1-6.
84. Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 2005; 112:1618-1627.
85. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005; 106:1525-1531.
86. Stevens T, Rosenberg R, Aird W, Quertermous T, Johnson FL, Garcia JG, et al. NHLBI workshop report: endothelial cell phenotypes in heart, lung, and blood diseases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281:C1422-C1433.
87. Blann AD, Pretorius A. Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells: Two sides of the same coin, or two different coins? *Atherosclerosis* 2006; 188:12-18.
88. Werner N, Nickenig G. Endothelial progenitor cells in health and atherosclerotic disease. *Ann Med* 2007; 39:82-90.
89. van Zonneveld AJ, Rabelink TJ. Endothelial progenitor cells: biology and therapeutic potential in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:167-172.
90. Rustemeyer P, Wittkowski W, Jurk K, Koller A. Optimized flow cytometric analysis of endothelial progenitor cells in peripheral blood. *J Immunoassay Immunochem* 2006; 27:77-88.
91. Young PP, Vaughan DE, Hatzopoulos AK. Biological properties of endothelial progenitor cells (EPCS) and their potential for cell therapy. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 49:421-429.
92. Rohde E, Bartmann C, Schallmoser K, Reinisch A, Lanzer G, Linkesch W, et al. Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro. *Stem Cells* 2007; 25:1746-1752.
93. Bahlmann FH, de Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004; 103:921-926.
94. Thomas HE, Redgrave R, Cunnington MS, Avery P, Keavney BD, Arthur HM. Circulating endothelial progenitor cells exhibit diurnal variation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:e21-e22.

95. Smythe J, Fox A, Fisher N, Frith E, Harris AL, Watt SM. Measuring angiogenic cytokines, circulating endothelial cells, and endothelial progenitor cells in peripheral blood and cord blood: VEGF and CXCL12 correlate with the number of circulating endothelial progenitor cells in peripheral blood. *Tissue Eng Part C Methods* 2008; 14:59-67.
96. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348:593-600.
97. Ben-Shoshan J, George J. Endothelial progenitor cells as therapeutic vectors in cardiovascular disorders: From experimental models to human trials. *Pharmacol Ther* 2007; 115:25-36.
98. Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:257-266.
99. Jie KE, Goossens MH, van Oostrom O, Lilien MR, Verhaar MC. Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis* 2008; doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.012.
100. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89:e1-e7.
101. Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, et al. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:2073-2080.
102. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1441-1448.
103. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 2003; 108:3115-3121.
104. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003; 107:3059-3065.
105. Fadini GP, Kreutzenberg S, Albiero M, Coracina A, Pagnin E, Baesso I, et al. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile. The role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:997-1004.

106. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis *Circulation* 2004; 109:220-226.
107. Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, et al. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005; 181:305-310.
108. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; 105:3017-3024.
109. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108:391-397.
110. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; 108:399-405.
111. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102:1340-1346.
112. Bahlmann FH, de Groot K, Duckert T, Niemczyk E, Bahlmann E, Boehm SM, et al. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney Int* 2003; 64:1648-1652.
113. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D. Stimulation of endothelial progenitor cells. A new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 2005; 45:526-529.
114. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens* 2005; 23:97-104.
115. Min TQ, Zhu CJ, Xiang WX, Hui ZJ, Peng SY. Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2004; 18:203-209.
116. Yu Y, Fukuda N, Yao EH, Matsumoto T, Kobayashi N, Suzuki R, et al. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *Am J Hypertens* 2008; 21:72-77.
117. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmítko PE, Zucco L, Wang CH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function. Further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 109:2058-2067.

118. Wang X, Chen J, Tao Q, Zhu J, Shang Y. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug Chem Toxicol* 2004; 27:243-255.
119. Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2005; 23:1831-1837.
120. Watson T, Goon PKY, Lip GYH. Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10:1079-1088.
121. Boos CJ, Goon PKY, Lip GYH. Endothelial progenitor cells in the vascular pathophysiology of hypertension: arterial stiffness, ageing and more. *J Hum Hypertens* 2006; 20:475-477.
122. Delva P, Degan M, Vallerio P, Arosio E, Minuz P, Amen G, et al. Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2007; 25:127-132.
123. Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, et al. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 2004; 109:2972-2975.
124. Loomans CJM, de Koning EJP, Staal FJT, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction. A novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53:195-199.
125. Tepper OM, Gagne PJ, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106:2781-2786.
126. de Groot K, Bahlmann FH, Sowa J, Koenig J, Menne J, Haller H, et al. Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney Int* 2004; 66:641-646.
127. Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, et al. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1-9.
128. Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 2006; 187:423-432.
129. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1442-1447.

130. Zhu J, Wang X, Chen J, Sun J, Zhang F. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells from patients with hyperhomocysteinemia. *Arch Med Res* 2006; 37:484-489.
131. Chen JZ, Zhu JH, Wang XX, Zhu JH, Xie XD, Sun J, et al. Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:233-239.
132. Thum T, Tsikas D, Stein S, Schultheiss M, Eigenthaler M, Anker SD, et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1693-1701.
133. Pellegatta F, Bragheri M, Grigore L, Raselli S, Maggi FM, Brambilla C, Reduzzi A, Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. In vitro isolation of circulating endothelial progenitor cells is related to the high density lipoprotein plasma levels. *Int J Mol Med* 2006; 17:203-208.
134. Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, Richter S, Passauer, Fischer S, Gross P. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 2005; 183:163-167.
135. Oliveras A. Células progenitoras endoteliales y enfermedad cardiovascular. *Hipertensión* 2008; 25(2):3-13.
136. Murphy C, Kanaganayagam GS, Jiang B, Chowienczyk PJ, Zbinden R, Saha M, et al. Vascular dysfunction and reduced circulating endothelial progenitor cells in young healthy UK South Asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:936-942.
137. Lau KK, Chan YH, Yiu KH, Li SW, Tam S, Lau CP, et al. Burden of carotid atherosclerosis in patients with stroke: relationships with circulating endothelial progenitor cells and hypertension. *J Hum Hypertens* 2007; 21:445-451.
138. Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, Matsui K, Yoshioka T, Takahashi M, et al. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Heart* 2004; 90:685-686.
139. Hughes AD, Coady E, Raynor S, Mayet J, Wright AR, Shore AC, et al. Reduced endothelial progenitor cells in European and South Asian men with atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 2007; 37:35-41.
140. Andreou I, Tousoulis D, Tentolouris C, Antoniadis C, Stefanadis C. Potential role of endothelial progenitor cells in the pathophysiology of heart failure: clinical implications and perspectives. *Atherosclerosis* 2006; 189:247-254.
141. Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, Tentolouris C, Stefanadis C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: Therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2008; doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.034.

142. Dong C, Crawford LE, Goldschmidt-Clermont PJ. Endothelial progenitor obsolescence and atherosclerotic inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1458-1460.
143. Nishiwaki Y, Yoshida M, Iwaguro H, Masuda H, Nitta N, Asahara T, Isobe M. Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:512-518.
144. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, et al. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelization as endothelial progenitor cells. *Cir Res* 2003; 93:980-989.
145. Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, et al. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28:90-98.
146. Rosenzweig A. Circulating endothelial progenitors – Cells as biomarkers. *N Engl J Med* 2005; 353:1055-1057.
147. Shantsila E, Watson T, Lip GYH. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:741-752.
148. Ghani U, Shuaib A, Salam A, Nasir A, Shuaib U, Jeerakathil T, et al. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke* 2005; 36:151-153.
149. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, Li H. The role of endothelial progenitor cells in ischemic cerebral and heart diseases. *Cell Transplant* 2007; 16:273-284.
150. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001; 88:167-174.
151. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103:2776-2779.
152. Massa M, Rosti V, Ferrario, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005; 105:199-206.
153. George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J* 2004; 25:1003-1008.

154. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004; 110:1209-1212.
155. Zhang ZG, Zhang L, Jiang O, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* 2002; 90:284-288.
156. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Brea D, et al. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 2007; 38:2759-2764.
157. Yip H, Chang W, Lu Ch, Liou Ch, Lan M, Liu JS, et al. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke* 2008; 39:69-74.
158. Coleman A, Freeman P, Steel S, Shennan A. Validation of the Omron 705IT (HEM-759-E) oscillometric blood pressure monitoring device according to the British Hypertension Society protocol. *Blood Press Monit* 2006; 11:27-32.
159. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from plasma fasting glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419.
160. Levey AS, Bosch JP, Breyer J, Green T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Ann Intern Med* 1999; 130:461-470.
161. Marín R, Goicoechea MA, Gorostidi M, Cases A, Díez J, Escolar G, et al; en representación del Comité de Expertos de la SEN Guía sobre Riñón y Enfermedad Vascul. Guía de la Sociedad Española de Nefrología sobre riñón y enfermedad cardiovascular. Versión abreviada. *Nefrología* 2006; 26:31-44.
162. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39:S1-S266.
163. ASE Committee Recommendations. Recommendations for chamber quantification: A report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standard Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18:1440-1463.
164. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986; 57:450-458.

165. Oliveras A, Soler MJ, Martínez-Estrada OM, Vázquez S, Marco-Feliu D, Vila JS, et al. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *J Hum Hypertens* 2008; 22:183-190.
166. Pirro M, Schillaci G, Menecali C, Bagaglia F, Paltriccia R, Vaudo G, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients. *J Hypertens* 2007; 25:2093-2099.
167. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Schiegl T, Kosiol S, Link A, et al. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 2007; 102:565-571.
168. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-Mediated Vasodilation. A diagnostic instrument, or an experimental tool?. *Chest* 2005; 127:2254-2263.
169. Zhu JH, Chen JZ, Wang XX, Xie XD, Sun J, Zhang FR. Homocysteine accelerates senescence and reduces proliferation of endothelial progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40:648-652.
170. Bilsborough W, Green DJ, Mamotte CD, van Bockxmeer FM, O'Driscoll GJ, Taylor RR. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism, homocysteine, cholesterol and vascular endothelial function. *Atherosclerosis* 2003; 169:131-138.
171. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation in humans. *Circulation* 1997; 95:1119-1121.

XI. ANNEXES

XI. ANNEXES

a. Publicacions

- María José Soler, Ofelia María Martínez-Estrada, Josep María Puig-Marí, Dídac Marco-Feliu, Anna Oliveras, Joan Vila, Marisa Mir, Antonia Orfila, Senén Vilaró and Josep Lloveras. Circulating endothelial progenitor cells after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5 :2154-2159.
- Oliveras A, Soler MJ, Martínez-Estrada OM, Vázquez S, Marco-Feliu D, Vila JS, Vilaró S, Lloveras J. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *J Hum Hypertens* 2008; 22:183-190.
- Oliveras A. Células progenitoras endoteliales y enfermedad cardiovascular. *Hipertensión* 2008; 25 (en premsa).
- Oliveras A, de la Sierra A, Martínez-Estrada OM, Larrousse M, Vázquez S, Soler MJ, Zuasti M, Reina M, À. Roca-Cusachs, Lloveras J. Circulating putative endothelial progenitor cells are significantly associated with flow-mediated dilation in patients with refractory hypertension. *Blood Press* 2008 (submitted).

b. Comunicacions a congressos directament relacionades amb el treball que es presenta en aquesta Tesi Doctoral

i. Comunicacions orals

- La concentración y proliferación de células progenitoras endoteliales circulantes está significativamente disminuída en pacientes con hipertensión refractaria. A. Oliveras, MJ. Soler, OM. Martínez Estrada, S. Vázquez, JS Vila, D. Marco-Feliu, JM. Puig, A. Orfila, S. Vilaró, J. Lloveras. 11ª Reunión Nacional de la SEH-LELHA. Madrid, 7-10 de març de 2006.
- Las células progenitoras endoteliales están disminuídas en la HTA refractaria. A. Oliveras, MJ. Soler, OM. Martínez Estrada, S. Vázquez, JS Vila, E. Rodríguez, J. Lloveras. V Congreso Iberoamericano de Nefrología / XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Madrid, 18-21 d'octubre de 2006.
- Les cèl.lules progenitores endotelials en la hipertensió arterial. A. Oliveras. III Reunió de Joves Investigadors en Hipertensió Arterial. Cardona, 26 i 27 de gener de 2007.
- La disminución de células progenitoras endoteliales se relaciona con una peor vasodilatación endotelio-dependiente en pacientes con hipertensión arterial

refractaria. A. Oliveras, M. Zuasti, M. Larrousse, S. Vázquez, OM Martínez-Estrada, MJ Soler, A. de la Sierra, J. Lloveras. 1^a Reunión de Investigación en Fisiopatología Vasculard de la SEH-LELHA. 13^a Reunión Nacional Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. Valencia, 1-4 d'abril de 2008.

ii. Comunicacions pòster

- Reduced concentration and proliferation of circulating endothelial progenitor cells in refractory hypertensives are independent of other cardiovascular risk factors. Anna Oliveras, M^aJosé Soler, Ofelia M^a Martínez, Susana Vázquez, Joan Vila, Dídac Marco-Feliu, Josep M^a Puig, Antonia Orfila, Senén Vilaró and Josep Lloveras. 21st Scientific Meeting of the American Society of Hypertension. New York, May 16-20, 2006.
- Endothelial progenitor cells number and proliferation are reduced in patients with refractory hypertension. Anna Oliveras, M^aJosé Soler, Ofelia M^a Martínez, Susana Vázquez, Joan Vila, Dídac Marco-Feliu, Josep M^a Puig, Marisa Mir, Senén Vilaró and Josep Lloveras. 21st Scientific Meeting of the American Society of Hypertension. New York, May 16-20, 2006.
- Endothelial progenitor cells number and functional capacity are independently reduced in refractory hypertensives. Oliveras A, Soler M^aJ, Martínez- Estrada OM^a, Vázquez S, Vila J, Marco-Feliu D, Puig JM^a, Orfila A, Mir M, Vilaró S, Lloveras J. Sixteenth European Meeting on Hypertension. Madrid, 12-15 juny 2006.
- Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. Anna Oliveras, M^aJosé Soler, Ofelia M^a Martínez, Susana Vázquez, Dídac Marco-Feliu, Joan Vila, Josep M^a Puig, Antonia Orfila, Marisa Mir, Senén Vilaró and Josep Lloveras. 60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research and Council on the Kidney in Cardiovascular Disease. San Antonio, October 4-7, 2006.
- Decreased circulating endothelial progenitor cells level determines impaired flow-mediated dilation in patients with refractory hypertension. Oliveras A, Martínez-Estrada OM, Larrousse M, Vázquez S, Soler MJ, Zuasti M, de la Sierra A, Lloveras J. 23rd Annual Scientific Meeting of the American Society of Hypertension. New Orleans, May 14-17, 2008.
- Reduced endothelial progenitor cells number determines decreased flow-mediated dilation in patients with refractory hypertension. Oliveras A, Larrousse M, Martínez-Estrada OM, Vázquez S, Soler MJ, Zuasti M, de la Sierra A, Lloveras J. 18th Scientific Meeting European Society of Hypertension – 22nd Scientific Meeting International Society of Hypertension. Berlin, June 14-19, 2008.