

Oxido nítrico: un gas contaminante con propiedades biológicas. Su importancia en fisiopatología cardiovascular

Dr. Mario R. Testelli Matareli*

Escuela Médico Militar. Ciudad de México

RESUMEN. Se revisa la fisicoquímica y la biología del óxido nítrico (NO), una molécula inorgánica antes conocida como factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Los descubridores de sus propiedades biológicas fueron galardonados con el premio Nobel de Medicina en 1998. NO se forma de la L-arginina por acción de la NO sintetasa (NOS), tiene una vida media muy corta y ejerce una acción paracrina en las inmediaciones del sitio en que se produce. Su mecanismo consiste en la activación de la guanilato ciclasa (GC) con aumento de cGMP intracelular, lo que desencadena mecanismos de transducción distintos en los diversos órganos y sistemas. En el aparato cardiovascular interviene en la homeostasis de la circulación e impide la agregación de plaquetas y leucocitos. Se compara NO endógeno del endotelio con NO exógeno de los nitrovasodilatadores. En el sistema nervioso central NO participa en la plasticidad sináptica, favoreciendo aprendizaje y memoria; en el sistema nervioso autónomo es el neurotransmisor de nervios no adrenérgicos no colinérgicos (NANC), por ello llamados también “nitrgérgicos”. NO ejerce un doble papel: es una señal intercelular de acción citoprotectora y es una molécula citotóxica de la respuesta inmunitaria inespecífica. Su disregulación se ha asociado a distintos procesos patológicos entre los que destacan: aterogénesis, hipertensión, enfermedad coronaria, síndromes isquémicos, miocardiopatías, enfermedad de Alzheimer y otros procesos neurodegenerativos, susceptibilidad a infecciones, enfermedades autoinmunes, desarrollo de tumores e impotencia. El entendimiento de la fisiopatología de NO abre nuevos campos terapéuticos para éstos y otros procesos patológicos.

Palabras clave: óxido nítrico, contaminación, fisiología, patología, corazón, vasos.

A más de 200 años de su descubrimiento por el reverendo J. Priestley, el óxido nítrico adquiere una relevancia insospechada en biología.

1. Hasta 1986, el óxido nítrico o monóxido de nitrógeno (NO) se consideraba tan sólo como un gas tóxico, parte del

SUMMARY. This article reviews the physicochemistry and biology of nitric oxide (NO), an inorganic molecule previously known as endothelium-derived relaxing factor (EDRF). The discoverers of its biological properties were rewarded with the 1998 Nobel Prize in Medicine. NO is formed from L-arginine through the action of NO synthase (NOS), which exists in three isoforms. NO has a short half life of a few seconds and it exerts its paracrine effects on neighbouring cells. Its mechanism consists in activation of guanylate cyclase (GC), thus increasing the intracellular concentration of cGMP. In the cardiovascular system NO modulates the homeostasis of the circulation and inhibits the aggregation of platelets and leucocytes. The endogenous NO is compared with the exogenous NO derived from nitrovasodilators. In the central nervous system NO regulates the processes of learning and memory; in the peripheral nervous system NO is the neurotransmitter of NANC nerves, which are also known as “nitrgergic” nerves. NO has a double action: it is an intercellular signalling with cytoprotective effects as well as a cytotoxic molecule of the inespecific immune response. Its disregulation has been associated with numerous pathological processes such as atherosclerosis, hypertension, coronary artery disease, ischemia/reperfusion injury, cardiomyopathies, autoimmune diseases, Alzheimer disease and many others. Understanding the physiological roles of NO will open new fields in therapeutics of various disease processes.

Key words: nitric oxide, pollution, physiology, pathology, heart, vascular disease.

nebluno (“esmog”) de la atmósfera, producto de industrias contaminantes y precursor de la lluvia ácida. Inhalado el gas NO produce ácido nítrico (H_2NO_3) que es cáustico para las membranas mucosas. La toxicidad de NO se mide por el número de partículas por millón (PPM); los síntomas empiezan alrededor de 50 PPM con irritación de las mucosas (lagrimeo, tos, ardor de garganta) y se agravan con peligro de muerte entre 200 y 700 PPM.³

2. En 1986, esta noción sobre toxicidad de NO cambió radicalmente. Fue en ocasión de un simposio internacional sobre vasodilatación, durante el cual Furchgott e Ignarro demostraron que la propia dilatación se debía a un factor rela-

* Profesor de Fisiología Humana, Escuela Médico Militar y Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Correspondencia:

Dr. Mario R. Testelli Matareli.

Av. Palmas S/N. Col. Lomas de Sotelo. CP 11200. México, D.F.

jante derivado del endotelio (EDRF, en inglés), factor idéntico o muy similar al NO.³⁰ Que una molécula inorgánica tan sencilla fuera un mediador de la relajación del músculo liso vascular causó enorme sorpresa, no exenta de escepticismo.⁵⁵ El escepticismo se debía a que, según el paradigma en voga, los mediadores fisiológicos son grandes moléculas orgánicas o cadenas polipeptídicas del tipo de neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento y compuestos inmunológicos, mediadores todos que operan con mecanismo de llave y cerradura por intermedio de enlaces no covalentes con receptores específicos localizados casi siempre sobre la membrana plasmática. Se sabía que la molécula NO la producían bacterias, pero no los mamíferos y menos que la misma sirviera de señal fisiológica. Como señal fisiológica, NO contraviene el paradigma dominante al producir modificaciones covalentes en la estructura de sus proteínas blanco localizadas en el interior del citoplasma.⁵⁵

3. Desde 1986, en que se descubrió el efecto vasodilatador de NO, ha habido una avalancha de trabajos en campo biomédico. Por una búsqueda en MEDLINE se calcula que desde 1992 a la fecha se han publicado más de 26,000 trabajos sobre NO, confirmando y extendiendo el descubrimiento de Furchgott e Ignarro, quienes junto con Murad fueron galardonados con el premio Nobel de Medicina en 1998 por demostrar que... *“el óxido nítrico es un mediador de señales en el aparato cardiovascular... lo que representa un principio novedoso de transmisión de mensajes en biología”*.⁸⁰ Por cierto, no faltaron protestas a favor de otro investigador;⁷⁷ no obstante queda lo novedoso del NO como señal biológica, rompiendo así un paradigma muy socorrido en fisiología.⁵⁵

Fisicoquímica de NO

NO probablemente se originó en la atmósfera primitiva de nuestro planeta cuando éste empezó a enfriarse.²⁹ Tiene gran afinidad con el grupo heme de proteínas diversas incluyendo muchas enzimas. NO se ha conservado a lo largo de la evolución como molécula mensajera y de defensa inmunitaria en varios sistemas biológicos.²⁹

NO es un gas inodoro e incoloro, compuesto de una molécula inorgánica biatómica, combinación 1:1 de los dos gases más abundantes de la atmósfera. El óxido nítrico (NO) no debe confundirse con el óxido nitroso (N_2O), “gas hilarante” de uso en anestesia y en fisiología para medir el flujo sanguíneo cerebral (método de Kety). Junto con el monóxido de carbono (CO), NO es la molécula lipofílica más pequeña que existe. Incidentalmente, al CO también se le adscribe un papel de mediador fisiológico parecido al de NO.⁷⁶

Como gas lipofílico, NO atraviesa las membranas biológicas sin necesidad de canales o receptores especiales; el movimiento del gas se produce impulsado por su coeficiente de solubilidad y su gradiente de concentración a través de la membrana, de conformidad a la (primera) ley de difusión de Fick. NO por tanto no se acumula en vesículas, ni se libera por exocitosis como los demás transmisores biológicos, sino que se produce y libera localmente en picomoles (10^{-12} mo-

les) en respuesta a la estimulación de su enzima productora, con variaciones según las necesidades metabólicas del organismo.^{30,55}

La molécula de NO posee dos características fisicoquímicas de gran importancia biológica:^{3,55}

- 1) es eléctricamente neutra, y
- 2) contiene un electrón (e-) no apareado en su orbital externo.

Por ser neutra, a partir de la célula donde se produce, la molécula de NO difunde radialmente a las células vecinas, donde ejerce su acción local (paracrina). Su acción es breve, ya que su vida media en el espacio extracelular es de apenas 5-10 segundos antes de convertirse en nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3) en presencia de otras moléculas reactivas.^{30,55} La inestabilidad de NO explica su corta vida media así como la formación continua de un gradiente de concentración químico para el propio NO.

Por contener un electrón no apareado, NO es un compuesto paramagnético (por física) y un radical libre (por química). Como compuesto paramagnético sirve para estudios de resonancia magnética (EPR, en inglés). Como radical libre, NO es una molécula capaz de óxido-reducción, la cual al hacer contacto con otras moléculas reactivas produce muchos más radicales libres, en un proceso autosostenido de realimentación de tipo positivo. Por definición, radicales libres son también los derivados del oxígeno (anión superóxido O_2^- ; peróxido de hidrógeno, H_2O_2 ; y el muy peligroso radical oxidrilo, $OH^\cdot$). Los radicales libres son tóxicos porque, si superan las defensas antioxidantes del organismo, causan reacciones en cadena que trastornan el metabolismo energético de las mitocondrias y del núcleo. Radicales libres de NO y de O_2 se producen en exceso en los síndromes de isquemia/hipoxia y reperfusión/reoxigenación, así como en los procesos inflamatorios y degenerativos con los fenómenos citotóxicos consiguientes, como se verá más adelante.

Síntesis de NO

NO sintetasa (NOS)

NO se forma por desaminación del aminoácido L-arginina por acción de la enzima NO sintetasa (NOS) en presencia de O_2 (Figura 1). La L-arginina (y no su D-isómero) es un aminoácido esencial que se obtiene de la dieta (nueces, mariscos y carnes); al parecer es el único sustrato para la formación de NO, y NOS es su enzima catalítica. La reacción se descubrió en años recientes.^{60,63} El metabolismo de la L-arginina es importante para regular la síntesis de NO y puede tener implicaciones clínicas cuando hay deficiencia de NO.⁶³ O_2 es necesario para la síntesis de NO; por tanto su concentración en sangre arterial debe ser mayor que la de NO. La síntesis de NO se bloquea por acción de análogos de la L-arginina como la NG-MonoMetil-L-arginina (L-NMMA) que es un inhibidor competitivo de NOS (Figura 1), al igual que el Nitro-L-arginina Metil Ester (L-NAME). Ambos compuestos inhiben también el transporte de electrones en la cadena respiratoria de las mitocondrias.¹⁸ Debe mencionarse que hay síntesis endógena de inhibidores de NO, lo que complica la regulación de NO en vivo.^{60,63}

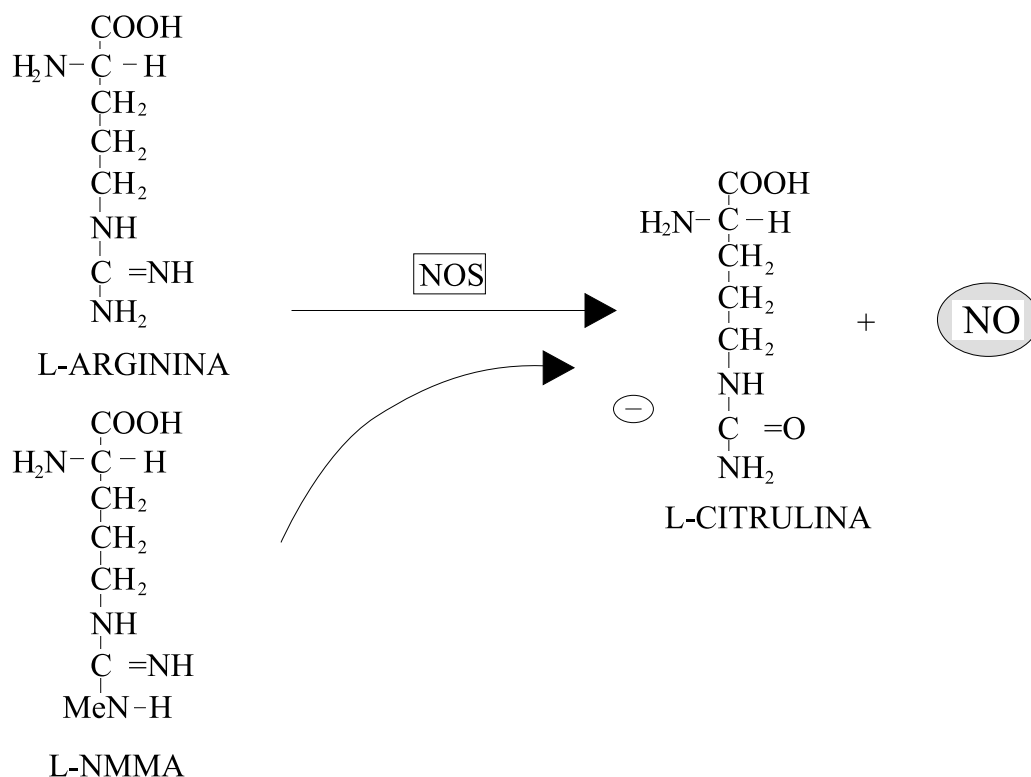


Figura 1. Síntesis de NO. El NO se forma a partir de la L-Arginina por acción de la NO sintetasa (NOS) a L-citrulina. La L-arginina (y no su D-isómero) es el sustrato para la formación de NO, y NOS es su enzima catalítica. Existen tres isoformas de NOS (Ver texto y *cuadro 1*). La síntesis de NO se inhibe (-) por acción de análogos de la L-arginina como la NG-mono-metil-L-arginina. (L-NMMA). (modificado de ref. 60).

Isoformas de NOS

La NOS existe en tres isoformas diferentes que han sido purificadas y clonadas recientemente.⁶³ En el *cuadro 1* se indican clases y tipos con la terminología actual. Para su funcionamiento la NOS neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS) dependen del ion calcio (Ca^{2+}) y de la omnipresente calmodulina (CaM). Es por ello que los inhibidores de CaM inhiben de manera selectiva la formación de NOS.^{18,63} Por otra

parte, la iNOS normalmente está ausente y sólo es inducible en condiciones patológicas por endotoxinas y varias citocinas; además, necesita horas para su activación, es independiente de Ca^{2+} y produce NO en cantidad mucho mayor que las otras isoformas.⁶³ Originalmente la iNOS se describió en macrófagos, hepatocitos y células gliales (astrocitos y microglia) del sistema nervioso central donde contribuye a la neurotoxicidad mediada por NO (véase luego). A pesar de sus diferencias, las tres isoformas de NOS presentan una homología del 50-60% en su secuencia de aminoácidos y una homología del 90% de cada isoforma en las distintas especies.¹⁸ Las tres isoformas dependen de genes distintos y están reguladas por sistemas diversos.^{18,63}

NOS es una hemoproteína muy compleja: contiene un mínimo de seis cofactores y un grupo heme del tipo de citocromo P-450 que forma parte de su núcleo catalítico. Por este núcleo que contiene dominios oxidativos y reductivos, NOS presenta gran semejanza con el citocromo P-450, lo que indica que estas dos familias de enzimas han logrado actividad catalítica similar mediante evolución de tipo convergente.¹⁸

Biología de NO

Sintetizado por tres isoformas de NO sintetasa (NOS), NO es el vasodilatador más potente descubierto hasta la fecha con efectos biológicos diversos en diferentes sistemas y apa-

Cuadro 1. Isoformas de NO sintetasa (NOS).

Clase	Tipo	Papel funcional.
nNOS (neuronal).	Tipo I	- Soluble en el citosol, dependiente de Ca^{2+} y de cGMP - Inducible en condiciones patológicas - Libera NO en picomoles.
iNOS (inducible).	Tipo II	- Citosólica, inducible en condiciones patológicas - Independiente de Ca^{2+} y de cGMP - Identificada en macrófagos, astrocitos y hepatocitos - Libera NO en nanomoles.
eNOS (endotelial).	Tipo III	- Constitutiva de la membrana, dependiente de Ca^{2+} y de cGMP - Inducible en condiciones patológicas. - Libera NO en picomoles.

Modificado de ref. 18,30,60,63

ratos. Los efectos resultantes dependen de si la producción de NO es normal, reducida o excesiva.

Aparato cardiovascular

NO presenta efectos diversos sobre la pared de los vasos sanguíneos (endotelio, fibras musculares lisas), sobre elementos figurados de la sangre (plaquetas y leucocitos) y sobre los elementos constitutivos del miocardio (miocardiocitos).

Endotelio como órgano

El endotelio (al igual que el endocardio) ocupa una situación anatómica única: es la capa monocelular continua que recubre la superficie interna del aparato cardiovascular en su totalidad. En extensión es el tejido más representado del cuerpo con un área calculada en más de 1,000 metros cuadrados. Antes considerado como una interfase inerte entre la pared del vaso y la sangre circulante, el endotelio hoy se considera un órgano provisto de propiedades biológicas complejas (Cuadro 2). Las células endoteliales están íntimamente unidas y su permeabilidad es muy selectiva, además, su superficie libre es antitrombógena por la liberación de prostaciclina (PGI_2) que también es vasodilatadora.³¹ Numerosos son los estímulos mecánicos y químicos (incluso muchos fármacos) que interactúan con receptores sobre la superficie endotelial, desencadenando mecanismos de transducción los cuales liberan compuestos de tipo vasoactivo, mitógeno y de formación de tejido conectivo⁵⁶⁻⁶⁸ (Cuadro 2). Entre los receptores sobre el endotelio destacan los de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por su importancia en la aterosclerosis.^{11,48,53,87} El endotelio también es el sitio principal de acción de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), que convierte la angiotensina I inactiva en angiotensina II activa de importancia en la insuficiencia cardíaca.^{53,68} Como compuesto vasodilatador predomina el NO (con la prostaciclina, PGI_2); como vasoconstrictor predomina la endotelina (ET_1 , con la prostaglandina, PGH_2). Otro vasoconstrictor es el tromboxano (TXA_2) que se libera por activación de las plaquetas. PGH_2 y TXA_2 se forman a partir del ácido araquidónico por la enzima ciclooxigenasa (COX). Farmacológicamente, la aspirina (ASA) inhibe la COX y por tanto (en pequeñas dosis) inhibe la formación de trombos en vasos cerebrales y miocárdicos.⁶⁶ En contraste, la acción antitrombótica del NO es directa sobre las plaquetas al evitar su adhesión y agregación.^{11,87}

Endotelio y NO

Entendido como órgano, el endotelio de arterias y arteriolas es el sitio principal de formación normal de NO mediante la NO sintetasa (NOS, Figura 2a). En el endotelio, la NOS es constitutiva y depende de Ca^{2+} y calmodulina (CaM). La enzima libera NO y éste a su vez libera cGMP (Figura 2b) en respuesta a la estimulación de su receptor por acción de un agonista (A), como es la acetilcolina (Aco). Histórica es la observación de Furchgott quien al estudiar los efectos de la Aco obtenía resultados contradictorios (contracción o relajación), hasta descubrir que Aco produce relajación cuan-

Cuadro 2. Propiedades del endotelio vascular.

1. Permeabilidad selectiva.
2. Antitrombogenicidad.
3. Metabolismo de sustancias vasoactivas.
 - a) relajación (NO , PGI_2 , EDHF, ADO).
 - b) contracción (ET_{1-2-3} , PGH_2 , TXA_2).
4. Producción de factores de crecimiento (mitógeno).
5. Formación de tejido conectivo.

Modificado de ref. 11,30,48,53,87

NO= óxido nítrico;

PGI_2 = prostaciclina.

EDHF= factor hiperpolarizante derivado del endotelio

ADO= adenosina

ET_1 = endotelinas

PGH_2 = prostaglandina

TXA_2 = tromboxano

do el endotelio está íntegro y contracción cuando está dañado o ausente.³⁰ De ahí surgió el concepto moderno sobre el mecanismo de la vasodilatación producida por Aco u otro agonista de tipo muscarínico (Figura 2).

NO y vasodilatación

1. Una vez liberada por sus terminaciones nerviosas en la pared de los vasos sanguíneos, la Aco (A) se une a su receptor (R) localizado sobre la superficie libre de la célula endotelial del vaso y no sobre la fibra muscular como se suponía (por analogía con el receptor de la norepinefrina sobre el músculo liso).
2. La interacción entre A y R, aumenta de manera transitoria la concentración intracelular de calcio - ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).
3. ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se debe a la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática con liberación secundaria mucho mayor de Ca^{2+} por canales en el retículo sarcoplásmico (RS), sensibles a receptores de rianodina.
4. $[\text{Ca}^{2+}]_i$, junto con la calmodulina (CaM) activa a la NO sintetasa la cual cataliza la oxidación de la L-arginina a L-citrulina con liberación de NO (Figura 2a).
5. Desde su sitio de formación en el endotelio y antes de transformarse en nitritos y nitratos, NO difunde por un lado hacia la luz del vaso donde inhibe la agregación y acumulación de plaquetas y leucocitos (Figura 2a), y por otro lado NO difunde hacia las fibras musculares lisas (FML, Figura 2b), donde se une al ion ferroso del grupo heme de la guanilato ciclasa (GC) citosólica activándola. El ion ferroso es el principal receptor de la GC, la cual se activa por cambios tridimensionales en su conformación inducidos por la unión de NO con el ion.
6. En el interior de las fibras musculares lisas (FML, Figura 2b), la GC activada convierte el guanosintrifosfato (GTP) a guanosinmonofosfato cíclico (cGMP). Este último es el mediador intracelular; se produce en segundos y se degrada rápidamente por una fosfodiesterasa (PDE 5). La inhibición farmacológica de esta PDE mediante el Sildenafil (véase luego) incrementa el efecto vasodilatador de NO endógeno al evitar la degradación del cGMP.

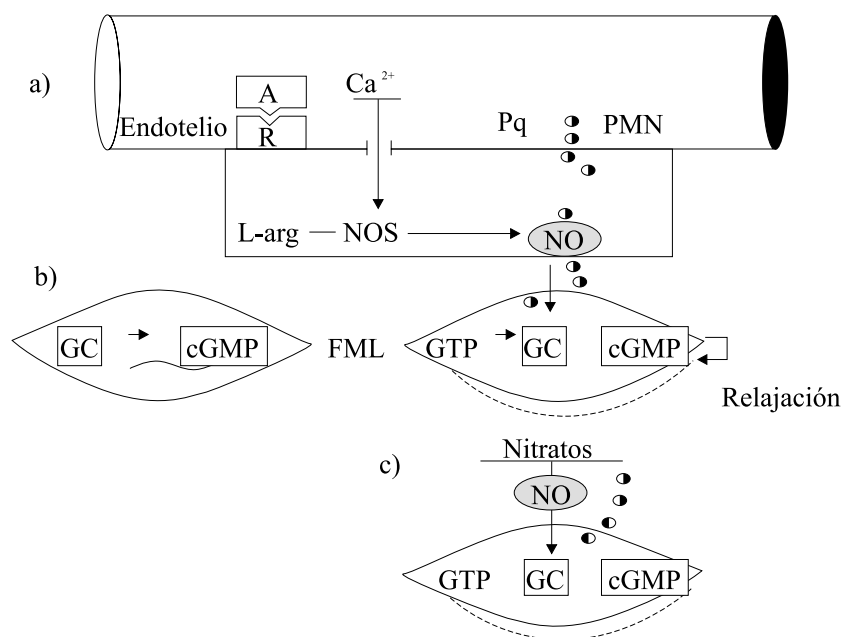


Figura 2. Efecto del NO sobre vasos sanguíneos (endotelio, a; y fibras musculares lisas, b). 1) El endotelio se activa por liberación de un agonista (A) que actúa sobre su receptor (R) localizado en la superficie libre del endotelio. 2) La interacción entre A y R incrementa la concentración intracelular de calcio ($\uparrow[Ca^{2+}]_i$). 3) $\uparrow[Ca^{2+}]_i$ se debe en su mayor parte a la liberación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (RS). 4) $\uparrow[Ca^{2+}]_i$ activa la NOS con liberación de NO. 5) El gas NO difunde hacia la luz del vaso donde inhibe la agregación de plaquetas (Pq) y leucocitos (PMN); NO también difunde hacia las fibras musculares lisas (FML) donde activa la guanilato ciclasa (GC). 6) En el interior de la FML (b), la GC activada convierte el GTP en cGMP. 7) El cGMP disminuye la concentración de calcio intracelular ($\downarrow[Ca^{2+}]_i$). 8) $\downarrow[Ca^{2+}]_i$ desactiva los puentes cruzados entre actina y miosina. 9) La desactivación de los puentes produce relajación del músculo liso y el vaso se dilata. 10) $\downarrow[Ca^{2+}]_i$ y la relajación consiguiente se deben a reaccumulación de Ca^{2+} en el RS por su bomba o ATPasa de Ca^{2+} .¹⁴ c) Efecto de los nitrovasodilatadores (donadores de NO). La vasodilatación producida por los nitratos se debe a un mecanismo directo de NO sobre el músculo liso, independiente del endotelio. Los nitratos eliminan tanto el espasmo coronario («angina típica») como el espasmo esofágico («angina atípica»). Véase el texto. (modificada de ref. 30)

7. Antes de degradarse por acción de la PDE 5, el cGMP disminuye la concentración de calcio intracelular ($\downarrow[Ca^{2+}]_i$).
8. $[Ca^{2+}]_i$ produce reacciones celulares en cadena que desactivan los puentes cruzados entre miosina y actina con alargamiento del sarcómero.
9. Al extenderse el proceso de desactivación, las fibras musculares se relajan y el vaso sanguíneo se dilata (Figura 2b).

En definitiva, Aco y otros agonistas de la vasodilatación actúan sobre los vasos (arterias y venas) de manera indirecta –y no directa como se pensaba– porque primero estimulan al endotelio para que libere NO (Figura 2a) y sólo luego las fibras musculares lisas se dilatan al producirse en su interior cGMP (Figura 2b), como descubrieron Furchgott, Ignarro y Murad.⁸⁰ Lo “novedoso” como se catalogó su descubrimiento,⁸⁰ consiste en que NO, en vez de actuar como los demás mensajeros biológicos con receptores específicos sobre la superficie externa de las membranas celulares, NO como gas difunde libremente, activando la enzima GC intracelular con la consiguiente producción de cGMP y relajación final del músculo. Sin embargo, quedaba por explicar el mecanismo último de la relajación vascular que se inicia con NO y termina con cGMP.

10. El último paso en la vasodilatación lo demostraron recientemente Cohen et al.¹⁴ Según estos autores, la vasodilatación se debe a reaccumulación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico por efecto de su ATPasa (SERCA, en inglés) e inhibición secundaria de la entrada de Ca^{2+} , efectos ambos que causan $\downarrow[Ca^{2+}]_i$ con la desactivación ya mencionada de los puentes entre miosina y actina.¹⁴

La fotorrelajación también se atribuye a formación de cGMP en el interior de las FML de las arterias. Según Furchgott, la luz “fotoactiva” la formación de NO a ciertas longitudes de onda (con un pico a 310 nm); en seguida, NO estimula la GC a producir cGMP con la relajación resultante.³⁰ En el cuadro 3 se indican el gran número de enzimas o procesos regulados por NO o por cGMP.

Como otro mecanismo de vasodilatación debido a NO a baja concentración e independiente de Ca^{2+} , se menciona que NO activa canales de potasio dependientes de ATP (canales K_{ATP}) que producen hiperpolarización con relajación secundaria del músculo liso.⁶¹ Altas concentraciones de NO, por otra parte, inhiben la Na/K ATPasa con despolarización de las fibras.⁵¹ Interesa subrayar que ambas modificaciones de la polarización normal –despolarización e hiperpolarización– de todo músculo (el corazón incluido) resulta en su relajación (y paro). Que el paro cardíaco se pueda

Cuadro 3. Enzimas o procesos regulados por óxido nítrico (NO) o guanosinmonofosfato cíclico (cGMP).

Enzimas
Guanilato ciclasa (GC)
Proteincinasas (PCK)
Fosfodiesterasas (PDE)
Ciclooxigenasa (COX II)
Modificación y reparación de DNA
Hemoproteínas (heme)
Receptores a glutamato (NMDA)
Fosfolipasa C (PLC)
Procesos
Vasodilatación coronaria, cerebral, pulmonar, fototransducción retiniana
Secreción y transporte iónico intestinal
Regulación tubuloglomerular del riñón
Permeabilidad endotelial
Adhesión y agregación plaquetaria
Secreción de insulina
Producción y secreción de hormonas
Neurotransmisión
Aprendizaje y memoria (potenciación de largo plazo) regulación de transcripción
Lesión e inflamación tisular
Citotoxicidad a patógenos
Citotoxicidad a tumores
Transporte y redistribución de calcio

Modificado de ref. 31,51,60,61,63,84

obtener farmacológicamente eliminando (despolarización) o incrementando (hiperpolarización) el potencial de reposo del corazón es relevante en cirugía cardiovascular de corazón abierto.

Vasodilatación y homeostasis de la circulación

Entre los muchos factores (de orden mecánico, neuroendocrino y metabólico) que intervienen en la regulación de la circulación, un papel preponderante se le atribuye a la liberación de sustancias vasoactivas por el endotelio ligada a la integridad del propio endotelio.⁸⁴ Como se mencionó más arriba, el endotelio es un órgano complejo que libera varias sustancias capaces de producir relajación y constricción (*Cuadro 2*). Además, el endotelio “sensa” el pO₂ de la sangre local⁵¹ de suerte que un menor pO₂ produce apertura de canales de Ca²⁺, desencadenando la secuencia conocida Ca²⁺ → NOS → NO → GC → cGMP y relajación final, como se muestra en las *figuras 2 a y b*). En años pasados, se pensaba que la presión arterial (aórtica) se debía a sustancias vasoconstrictoras como la norepinefrina (noradrenalina) o más recientemente al sistema renina-angiotensina. Hoy día se sabe que el “tono” vascular normal se debe a predominio de la acción vasodilatadora de NO, lo que se atribuye a estimulación mecánica del endotelio por el flujo oscilatorio de la sangre.⁸⁴ En seguida, la dilatación microvascular permite la distribución del flujo en los tejidos de acuerdo a las necesidades metabólicas de cada cual. Esta función del endotelio depende una vez más de su integridad anatómica, pues una

misma sustancia como la Aco produce vasodilatación con endotelio normal y vasoconstricción con endotelio dañado.³⁰ Abundando sobre el tema de la Aco, no sobra mencionar que la misma produce contracción en el músculo esquelético (a diferencia del liso) por su acción en la placa neuromuscular, relajación en el corazón (“efecto vagal”) y secreción en varias glándulas.

Por su vida media tan corta, los efectos de NO disminuyen espontáneamente; por tanto para la homeostasis de la circulación, se requiere un estado constante de vasodilatación activa mediada por NO.⁸⁴ Estos estudios sobre función y disfunción endotelial tienen implicaciones en muchas enfermedades vasculares (*Cuadros 3 y 4*), destacando desde luego la enfermedad coronaria con sus variantes clínicas,⁷²⁻⁷⁴ la hipertensión arterial⁴⁻⁶ y la insuficiencia cardíaca.³⁵⁻⁵⁷ Pero se aplica por igual a la circulación cerebral, renal, esplácnica y también a la pulmonar.^{16,54} Por ejemplo se sabe que NO de síntesis endógena está presente en el aire espirado, por lo que su análisis sirve para el monitoreo de la hipertensión y enfermedades pulmonares.^{16,21} Además, la inhalación de NO se usa para el tratamiento de la hipertensión pulmonar en especial de cardiopatías congénitas.^{17,50}

Nitrovasodilatadores y NO exógeno

La nitroglicerina es un compuesto propenso a explotar y A. Nobel (de la fundación homónima) inventó un procedimiento para estabilizar el compuesto, descubriendo así la dinamita cuya industrialización fue (y sigue siendo) sumamente lucrativa. Desde hace más de un siglo la nitroglicerina se usaba empíricamente en pacientes con dolores precordiales de tipo anginoso.⁶⁴ Al propio Nobel(*) le prescribieron la nitroglicerina sublingual por sufrir de angina de pecho, pero el ingeniero se rehusó a tomarla porque dudaba de su eficacia y porque le producía un molesto rubor de cara y cuello (debido —ya se sabe— a dilatación arteriolar subcutánea) acompañado de una intensa cefalea de tipo punzante (debida a dilatación de las arterias meníngeas); al parecer, el descubridor de la dinamita prefería el dolor de pecho al dolor de cabeza (ASA no se conocía entonces).

Mecanismo de acción. Una vez aclarado el mecanismo de acción de NO endógeno (liberado por el endotelio vascular normal), lógico era suponer que él mismo tendría que explicar la acción de la nitroglicerina y sus derivados (*Figura 2c*). Estos compuestos se consideran como donadores de NO porque, como lo demostró Murad,⁶³ forman NO biológico

Cuadro 4. Enfermedades por disfunción endotelial.

Aterosclerosis
Enfermedad coronaria
Isquemia/reperfusión
Hipertensión arterial sistémica (HTA)
Eclampsia
Hipertensión y enfermedades pulmonares
Insuficiencia cardíaca
Susceptibilidad a infecciones
Impotencia

Modificado de ref. 11,20,48,53,68,83

*Nobel dejó escrito...“es algo irónico que ahora mi médico me prescriba la nitroglicerina”⁸⁰

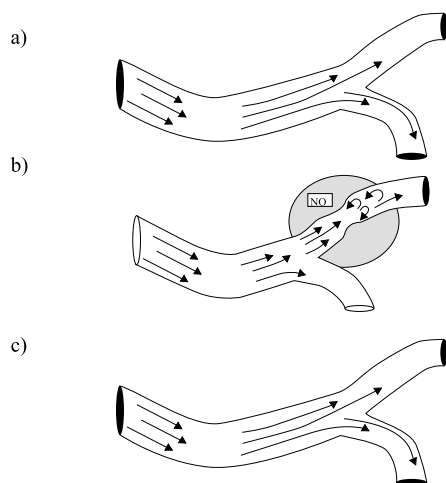


Figura 3. Mecanismo de acción de los nitratos. Los nitratos se consideran donadores exógenos de NO porque forman NO biológicamente activo sin necesidad de la sintetasa NOS. La vasodilatación resultante se debe a un mecanismo directo de NO sobre el músculo liso, independiente del endotelio. Esto es, NO se produce y actúa esté o no el endotelio intacto. El proceso para convertir nitratos orgánicos a NO existe sólo en las coronarias, no en el miocardio. a) Arteria coronaria epicárdica en condiciones de control. b) Espasmo coronario. Liberación de NO por los nitratos. c) Vasodilatación coronaria con eliminación del espasmo. (modificado de ref. 3).

camente activo y la vasodilatación resultante se debe a un mecanismo directo de NO sobre el músculo liso independiente del endotelio. Esto es, NO se produce y actúa esté o no el endotelio intacto,⁶³ y luego sigue la misma vía final común GC → cGMP que el NO endógeno (Figuras 2 b,c). Con cierta razón, al NO endotelial se le conoce también como “nitroglicerina endógena”.⁴¹ En efecto, numerosos estudios han demostrado que en la enfermedad coronaria hay disfunción endotelial con producción disminuida de NO.⁷²⁻⁷⁴ De ahí la indicación precisa de los vasodilatadores coronarios en la aterosclerosis coronaria.^{1,41} Al respecto debe mencionarse que el proceso para convertir los nitratos orgánicos a NO existe sólo en los vasos sanguíneos y no en el miocardio.²² En el miocardio, NO que difunde del endotelio (y del endocardio) regula la fase de relajación (diastólica) del ciclo cardíaco; por tanto su desregulación tiene importancia en la insuficiencia cardíaca de causas conocidas o no (como suelen ser las miocardiopatías).^{25,35}

NO endógeno y NO exógeno

El NO *endógeno* derivado del endotelio (y del endocardio) tiene efectos locales de vasodilatación y antitrombosis a nivel del sitio donde se produce, mientras que el NO *exógeno* derivado de los nitrovasodilatadores tiene efectos generales de tipo hemodinámico y relaja el músculo liso de cualquier órgano, sea el de los vasos (arterias y venas) de cualquier segmento de la circulación o de órganos como esófago, bronquios, uréter, vías biliares, etc. Así al actuar sobre la circulación sistémica, NO dilata vasos de conductancia y de resistencia disminuyendo la poscarga cardíaca, dilata tam-

bién las venas disminuyendo retorno venoso y precarga cardíaca, todo lo cual mejora la función de bomba del corazón insuficiente.^{1,41} Al actuar sobre la circulación coronaria (Figura 3), NO dilata arterias epicárdicas (originarias o neoformadas) y las transmiocárdicas, mejorando así el riego subendocárdico en comparación con otros vasodilatadores como el dipiridamol.⁴¹

Angina “típica” y angina “atípica”. La angina “típica” o “verdadera” por cardiopatía isquémica estable se debe a espasmo coronario (con esfuerzo o en reposo y signos de isquemia subendocárdica en el ECG), mientras que la “atípica” o “espuria” se debe a espasmo esofágico o de vías biliares (sin cambios del segmento ST en el ECG). En ambos casos el dolor anginoso se elimina mediante nitratos de acción rápida porque eliminan el espasmo del músculo liso sea vascular (Figura 3) o del esófago. En ambos casos también los efectos sistémicos son los mismos, rubor, cefalea, hipotensión y taquicardia refleja.^{1,41} En los pacientes con angina típica de esfuerzo, una buena medida profiláctica es administrar el vasodilatador antes del esfuerzo, porque cualquier tipo de estrés (físico o mental) produce vasoconstricción en el sitio de una estenosis coronaria.³⁸ Interesa desde luego mencionar que esta respuesta patológica al estrés (físico o emocional) desaparece si se logra una regresión de la aterosclerosis coronaria.⁸⁶ Por razones de claridad, conviene mencionar otras dos formas de angina de pecho.

Angina “variante” y síndrome X. Otra forma de angina verdadera es la “variante” (o de Prinzmetal): también se debe a espasmo coronario, pero típicamente se produce en reposo, se acompaña de signos de isquemia transmural en el ECG y responde a los antagonistas del calcio (en vez de los nitratos). Una última forma rara de angina de pecho es la que se presenta con arterias coronarias normales (demostradas por coronariografía): su patogénesis se desconoce, de ahí su nombre de síndrome X o también de angina “microvascular” por una supuesta disautonomía neurovegetativa (o simpátovagal). En cambio su pronóstico sí se conoce y es bueno a largo plazo.^{68,72}

Además de molécula mensajera en el aparato cardiovascular, NO también lo es en el sistema nervioso central y periférico como lo demostró inicialmente Ignarro.⁴²

NO y sistema nervioso central

En el sistema nervioso central (SNC), NO normalmente se forma de la L-arginina por acción de dos enzimas: 1) la nNOS neuronal a nivel de sinapsis, y 2) la eNOS del endotelio vascular (y de la barrera hematoencefálica). La enzima NOS es más fácil de localizar que NO el cual es volátil. Por estudios inmunohistoquímicos, la nNOS se ha localizado en zonas discretas del cerebro (corteza e hipocampo), cerebelo y médula espinal.^{8,49} En condiciones patológicas y síndromes isquémicos, NO se forma por activación de astrocitos y células gliales.³⁴ Los trabajos originales de Ignarro⁴² han sido confirmados y ampliados por otros autores.^{8,49} De ahí surgió el concepto moderno sobre neurotransmisión a nivel de sinapsis excitadoras.

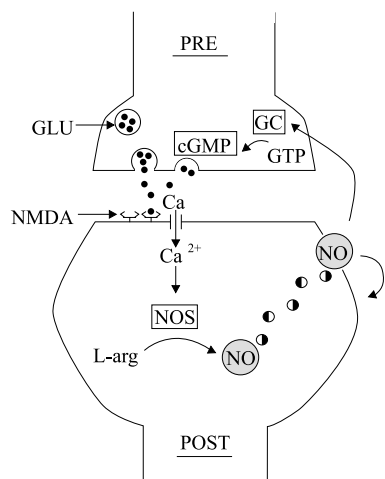


Figura 4. Efecto del NO sobre el sistema nervioso central. La liberación de glutamato (GLU) por exocitosis en la hendidura sináptica y la interacción con su receptor NMDA, abre un canal en la membrana sub-o-postsináptica por donde entra Ca^{2+} . El incremento de Ca^{2+} activa a la nNOS, produciéndose NO. El óxido nítrico difunde a la terminal presináptica, donde aumenta la concentración de cGMP, lo que se relaciona con el aumento en la cantidad de neurotransmisor liberado. La terminal postsináptica también es afectada por el NO liberado. En esta terminal, el NO aumenta la respuesta al neurotransmisor liberado, lo que se refleja en un incremento del tamaño de los potenciales postsinápticos excitadores. Ambas respuestas están involucradas en la potenciación de largo plazo, que es la base electrofisiológica de la memoria y el aprendizaje. (modificado de ref. 42).

NO y sinapsis excitadoras. El glutamato es el principal aminoácido excitador en las sinapsis centrales (75%). Se almacena en vesículas en la terminal presináptica. Sus efectos están mediados por varios subtipos de receptores, el principal de los cuales es el NMDA (N-metil-D-aspartato), un aminoácido sintético que actúa de manera selectiva a nivel de este subtipo de receptor del glutamato.

NO y función sináptica

1. Por la llegada de un impulso nervioso ortodrómico, el glutamato (GLU) se libera por exocitosis de sus vesículas presinápticas (Figura 4).
2. GLU difunde a la hendidura sináptica, donde se une al subtipo especial de receptor que es el NMDA.
3. La interacción GLU-NMDA abre canales de calcio (Ca^{2+}) en la membrana sub- o postsináptica.
4. La entrada de calcio aumenta la concentración del calcio intracelular [Ca^{2+}].
5. El aumento de [Ca^{2+}] activa la nNOS, la cual cataliza la oxidación de la L-arginina con liberación de NO.
6. Desde su sitio de formación, NO difunde radialmente a la neuronas vecinas y por tanto en dirección retrógrada a la terminal presináptica.
7. En esta terminal (Figura 4), NO activa a la guanilato-ciclasa (GC) con la formación de cGMP.
8. El cGMP aumenta la eficacia de la transmisión sináptica,
9. Esta mayor eficacia se consigue por incremento ya

Cuadro 5. Enfermedades atribuidas a sobreproducción de NO o cGMP.

Accidente vascular cerebral
Choque hemorrágico
Choque séptico
Colitis crónica
Diabetes de tipo inmune
Artritis
Artritis reumatoide
Cirrosis hepática
Encefalomiелitis
Meningitis
Pancreatitis
Peritonitis
Rechazo de órganos
Inflamación infección
Neumopatías
Asma bronquial
Cáncer
Migraña
Psoriasis.
Enfermedad de Alzheimer
Esclerosis múltiple
Enfermedad por revascularización

Modificado de ref. 11,20,30,53,63

sea del número o la sensibilidad de los receptores a nivel de las sinapsis.

- 10.El resultado último es promover lo que se conoce como potenciación de largo plazo que es la base electrofisiológica de la memoria y el aprendizaje.³³

NO y sistema nervioso autónomo

La división “nitrérgica”

La clasificación funcional del sistema nervioso autónomo (SNA) comprende tres divisiones: la adrenérgica (A), la colinérgica (C) y la no adrenérgica no colinérgica (NANC). A través de los años, como neurotransmisor de la división NANC se han propuesto varias sustancias (adenosina, ATP, PIV, sustancia P, etc.). Estudios recientes indican que NO es el transmisor biológico de estos nervios, por ello llamados “nitrérgicos”.⁶⁹ Las principales evidencias estriban en:

- 1) Presencia de la sintetasa de NO (NOS) demostrada por estudios inmunohistoquímicos.
- 2) La estimulación eléctrica de estos nervios produce relajación de los músculos correspondientes.
- 3) La relajación muscular se bloquea por inhibidores de NOS.

Son nitrérgicos los nervios del:

- a) plexo mioentérico que regula la fase relajante de la peristalsis gastrointestinal y de los esfínteres al paso del bolo alimenticio.
- b) plexo pélvico del cual depende el funcionamiento del aparato genitourinario incluida la erección. Esta misma es obtenible farmacológicamente con el Sildenafil,⁸⁸ mejor conocido como Viagra. El fármaco inhibe la fosfodiesterasa específica (PDE-5) con lo cual se bloquea la catálisis de cGMP. Esto

equivale a un aumento de NO endógeno y consiguiente vasodilatación de los cuerpos cavernosos. La asociación de Sildenafil con nitratos es peligrosa por el efecto acumulativo de NO endógeno y NO exógeno, lo que puede resultar en hipotensión grave y choque (antes de un priapismo).

En definitiva, la división nitrérgica modula el funcionamiento de los aparatos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario.⁶⁹

NO y enfermedades del sistema nervioso

En 1960, se descubrió una técnica especial de tinción que permitía ubicar a neuronas que en su cuerpo o en el axón contenían la NOS cerebral.^{29,33,49}

A estas neuronas se les denominó diaforasas porque mediaban procesos oxidativos; constituyen un 2% de la corteza cerebral. En los años 80 se descubrió que las mismas neuronas eran resistentes a procesos degenerativos del cerebro tan diferentes como enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, Parkinson, corea de Huntington, demencia por SIDA y neurotoxicidad por glutamato.^{32,49} En modelos de neurotoxicidad puede haber necrosis del 90% de las neuronas, en tanto que las diaforasas se preservan.¹³

En dichas enfermedades y el Alzheimer en especial intervienen numerosos factores entre hereditarios, orgánicos y ambientales. Estudios inmunohistoquímicos revelan que la nNOS participa en el desarrollo de placas seniles y marañas neurofibrilares.⁸¹ Se supone que estas alteraciones inducen la producción de radicales libres derivados del oxígeno, cuyo exceso conduce al llamado “estrés oxidativo”,²⁸ el cual incrementa el proceso patológico. Este último a su vez aumenta el estrés oxidativo, produciendo además inflamación local y activación de células gliales, creando un círculo vicioso autosostenido.⁷⁵ La participación del estrés oxidativo en la patogénesis del Alzheimer es real pues hay actividad disminuida de la superóxido dismutasa (SOD) en el líquido cefalorraquídeo de estos pacientes, lo que sugiere que las defensas antioxidantes del organismo han sido superadas.¹⁹

Los síndromes isquémicos en todas sus variedades privan de oxígeno y nutrientes a las neuronas, iniciándose una cascada neurotóxica. La vía metabólica arginina-NO se activa y participa en la lesión del SNC. Entre los muchos transmisores y segundos mensajeros involucrados, destaca el glutamato.¹³ Su neurotoxicidad es secundaria al incremento del $[Ca^{2+}]_i$, lo que activa a la NOS produciéndose un exceso de NO. El exceso de NO agota los mecanismos naturales de depuración de los radicales libres (tocoferol, ácido ascórbico, glutatión) y los enzimáticos (superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POx), superóxido catalasa (SOC).

Como radical libre, el NO se vuelve muy reactivo cuando llega en contacto con el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), en cuyo caso se forma el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) el cual es muy tóxico para las células. El exceso de radicales libres participa entonces en la peroxidación de las membranas lipídicas, de las proteínas estructurales y enzimáticas y del DNA nuclear, mecanismos que participan en la destrucción de bacterias y células tumorales (ver adelante).

El empleo de antioxidantes (Vit. E, C, o incluso la SOD) puede disminuir el daño tisular en enfermedades producidas por lesiones secundarias a síndromes isquémicos tanto de cerebro²⁸ como del miocardio.⁷⁹

NO e inmunología

Citoprotección y citotoxicidad

La molécula de NO —cual Jano bifronte— desempeña un doble papel en biología en apariencia paradójico: es una señal intercelular de acción citoprotectora,¹⁵ y la misma es una molécula citotóxica de la respuesta inmunitaria inespecífica.⁷⁸ Como molécula fisiológica NO se sintetiza por la NOS constitutiva (cNOS) por cortos períodos de tiempo (segundos a minutos), como molécula “asesina” NO se sintetiza por la NOS inducible (iNOS) la cual se expresa por largos períodos de tiempo (horas a días). La gran diferencia entre cNOS e iNOS depende el tiempo que dura la producción de NO y su concentración, además de otros componentes del entorno biológico. El efecto protector normal de NO se debe a la inhibición de la agregación y consiguiente activación de plaquetas y leucocitos. Este efecto antiagregante junto con la vasodilatación explica la acción antiaterogénica de NO y por tanto su acción protectora sobre el endotelio intacto.^{30,42,60,63}

Apoptosis, necrosis y estrés oxidativo

El efecto citotóxico de NO depende de su unión con moléculas ferrosas de enzimas clave para la cadena respiratoria y para la síntesis de DNA en células blanco.^{10,40} Además, hay que considerar los efectos de compuestos secundarios a la activación de macrófagos, neutrófilos y del propio endotelio. La combinación resultante de necrosis, apoptosis y estrés oxidativo es altamente patológica.^{45,78} La muer-

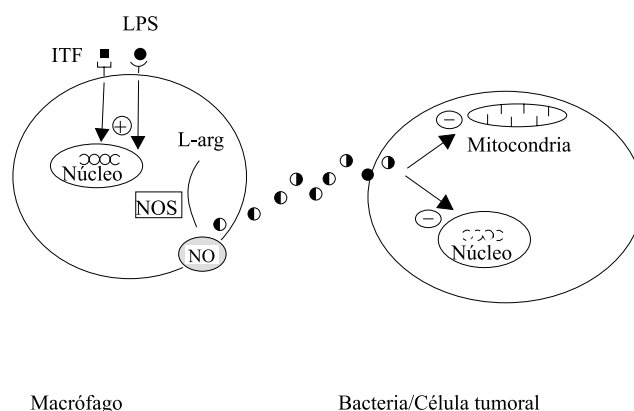


Figura 5. La presencia de interferón γ (ITF) o de lipopolisacáridos (LPS) de origen bacteriano induce a que el macrófago active a la NO sintetasa (NOS). La NOS activada provoca la conversión de L-arginina a L-citrulina con la liberación de NO en grandes cantidades. NO difunde hacia las células vecinas donde: 1) produce peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática, 2) inhibe (-) la cadena respiratoria en las mitocondrias, y 3) inhibe (-) la síntesis del DNA nuclear de la bacteria o de la célula tumoral. (modificado de ref. 30).

te por apoptosis (apó = desde, ptosis = caída, por el símil poético con la caída de las hojas muertas) sucede por un mecanismo intrínseco, genéticamente determinado que resulta en condensación del núcleo y fragmentación del DNA; en cambio, la muerte por necrosis sucede por edema intracelular, rotura de la membrana plasmática y salida de su contenido con la consiguiente respuesta inflamatoria. Las células apoptóticas se conservan intactas hasta que sus fragmentos quedan inglobados por macrófagos locales y sometidos a una desaparición sumamente rápida y limpia que llega a pasar desapercibida.^{12,23}

Una diferencia entre la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) presente en los macrófagos (iNOS) y la encontrada en las células endoteliales (eNOS) y el cerebro (nNOS), es que la forma inducible se puede detectar en el citoplasma de los macrófagos sólo si previamente activados por lipopolisacáridos (LPS) o interferón gamma (ITF γ)⁷¹ y previa síntesis de proteínas, lo que causa un retraso de hasta 8 horas para su expresión. A diferencia de la NOS en cerebro, endotelio y plaquetas, la presente en los macrófagos es inhibida por la L-canavanina. Los macrófagos también pueden ser activados por linfocitos sensibilizados a un antígeno específico y de una manera similar convertirse en citotóxicos para las células neoplásicas, efecto independiente de la fagocitosis y que puede ser citostático y a veces citolítico.^{12,23} El efecto de la liberación de NO por el macrófago resulta en la inhibición de la replicación del DNA en la célula tumoral, así como en la inhibición del transporte de electrones y con ello del mecanismo energético en las mitocondrias (*Figura 5*).

Por lo general las enzimas afectadas por la actividad del macrófago, contienen en su porción catalítica átomos de sulfuro coordinados con grupos férricos no heme (Fe-S). La inhibición enzimática provoca una liberación intracelular de fierro, y la exposición de estos grupos Fe-S al NO produce complejos nitroso-férricos.^{3,18,30} La formación de este complejo nitroso-fierro-sulfuro dependiente de L-arginina ya ha sido demostrada en los macrófagos activados mediante respuesta inmune celular.⁷¹ Estos resultados muestran el mecanismo molecular que enlaza la vía de L-arginina- NO con la citotoxicidad inducida por macrófagos.^{39,40}

La vía metabólica L-arginina-NO ha sido propuesta como mecanismo de defensa primario contra parásitos intracelulares, protozoarios y hongos. Esta inmunidad no sólo es inespecífica en términos del estímulo que la desencadena, sino en la variedad de células capaces de expresarla.^{12,23}

Peroxinitrito

El peroxinitrito (O-N-O-O $\cdot$) es una molécula altamente oxidante y su vida media depende en gran medida del pH circundante.⁶² A pH alcalino es muy estable; a pH neutro se descompone rápidamente a nitrato. El peroxinitrito se forma cuando el NO con su electrón no apareado se une al electrón no apareado del anión superóxido (O $_2^{\cdot-}$), de donde resulta el anión O-N-O-O $\cdot$. Esta reacción es irreversible, ya que consume energía (22 Kcal/mol). La configuración estructural (cis-peroxinitrito) le permite atravesar las membranas celulares,

donde es fragmentado a especies extremadamente oxidantes, como el radical oxidrilo (OH $\cdot$). Contribuye a su toxicidad la gran distancia que puede difundir (100 mm), y la reacción que lo produce es un millón de veces más rápida que la que forma peróxido de hidrógeno, además difunde 10,000 veces más rápido. El O-N-O-O $\cdot$ está también involucrado en la lesión por isquemia/reperfusión, ya que la formación del O-N-O-O $\cdot$ es 10 veces más rápida que la de NO.⁶²

En resumen, el descubrimiento de que el gas NO tiene tantas y diversas propiedades biológicas, acaba de abrir un fecundo campo de investigación sobre señales fisiológicas con resultados difíciles de sospechar pocos años atrás.

Agradecimiento

El autor quiere agradecer a la Dra. Iriabeth E. Villanueva López sus amables comentarios y numerosas sugerencias; también agradece al Sbtte. M.C. Alfonso Garfias-Arvizu su colaboración en la preparación de las figuras.

Referencias

1. Abrams J. Beneficial actions of nitrates in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 1996; 77: 87-104.
2. Ashley RM, Brammer MJ, Marchbank R. Measurement of intrasynaptosomal free calcium by using the fluorescent indicator quin-2. *Biochem J* 1984; 219: 149-58.
3. Beckman JS. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. En Lancaster JR: Principles and Actions of nitric oxide. New York, Academic Press 1996: 1-82.
4. Benjamin N, Vane J. Nitric oxide and hypertension. *Circulation* 1996; 94(6): 1197-8.
5. Blum A, Miller H. Role of cytokines in heart failure. *Am Heart J* 1998; 35: 181-6.
6. Bonlanger CM. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(1): 39-49.
7. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-8.
8. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-5.
9. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9030-3.
10. Brune B, Von Kneter A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998; 351(3): 261-72.
11. Cannon RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998; 44: 1809-19.
12. Chakreborty T, Das S, Mondale L et al. Oxidant stress, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signalling* 1999; 11(2) 77-5.
13. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron* 1998; 1: 623-34.
14. Cohen RA, Weisbrod RM, Genicke M et al. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca $^{2+}$ ATPase and inhibition of stored-operated Ca $^{2+}$ influx. *Circ Res* 1999; 84(2): 210-219.
15. Cooke JP, Tsao PS. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation* 1993; 88: 2451-4.
16. Cooper CJ, Jevnikar FW, Walsh et al. The influence of basal nitric oxide activity on pulmonary vascular resistance in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1998; 82: 609-14.
17. Cooper CJ, Lancizberg MJ, Anderson TJ et al. Role of nitric oxide in the local regulation of pulmonary vascular resistance. *Circulation* 1996; 93: 266-71.

18. Crane BR, Awai AS, Gachhui R et al. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* 1997; 278: 425-30.
19. DE-Deyn PP, Hiromatsu M, Borgreeve F et al. Superoxide dismutase activity in cerebrospinal fluid of patients with dementia and some other neurological disorder. *Alz Dis Ass Dis* 1998; 12(1): 26-32.
20. Dicarletto PE, Gimbrone MA. Vascular endothelium. In: Fuster V, Ross R, Topol E: *Atherosclerosis and coronary artery disease* Philadelphia, Raven Press 1996: 387-400.
21. Dinh-Xijan AT. Disorders of endothelium-dependent relaxation in pulmonary disease. *Circulation* 1993; 87: 81-7.
22. Drexler H. Hypertension, heart failure and endothelial function. *Am J Cardiol* 1998; 82: 205-25.
23. Du G, Monithys-Mickalad A, Sense F. Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of this function during anoxia and reoxygenation *in vitro*. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(9): 1066-1.
24. Eiserich JP, Patch RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med* 1998; 19(4-5): 221-357.
25. Ferrari R, Bachetti T, Agnoletti L et al. Endothelial function and dysfunction in heart failure. *Eur Heart J* 1998; 19: 41-7.
26. Ferrendelli JA, Blank AC, Gross RA. Relationship between zeisuric activity and cyclic nucleotide levels in brain. *Brain Res* 1980; 200: 93-103.
27. Fewerstein G, Yue TL, Ma X et al. Novel mechanism in the treatment of heart failure: inhibition of oxygen radicals and apoptosis by carvedilol. *Progr Cardiovasc Dis* 1998; 48: 17-24.
28. Fortscher M. Oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer disease and antioxidant neuroprotection. *Neurol Psychiatr* 1998; 6: 113-21.
29. Franchini A, Conte A, Ottaviani E. Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. *Adv Neuroimmunol* 1995; 5(4): 463-78.
30. Furchgot. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA* 1996; 276: 1186.
31. Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983; 53: 557-61.
32. Garthwaite J, Garthwaite M. Cellular origin of cyclic GMP response to excitatory amino acid receptor agonist in rat cerebellum *in vitro*. *J Neurochem* 1987; 48: 29-39.
33. Garthwaite J. Glutamate nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *TINS* 1991; 14: 6067.
34. Garthwaite J. Nitric oxide synthesis linked to activation of excitatory neurotransmitter receptors in the brain. In *Nitric Oxide form L-arginine: A Bioregulatory System*. Ed. Moncada S, Higgs EA. Elsevier Amsterdam 1990: 115-37.
35. Ghali JK. Contemporary issues in heart failure. *Am Heart J* 1999; 138: 5-8.
36. Glasser SP, Selwyn AF, Ganz P. Atherosclerosis; risk factors and the vascular endothelium. *Am Heart J* 1996; 13: 1501-11.
37. Godhart DM, Anderson TJ. Role of nitric oxide in coronary arterial vasomotion and the influence of coronary atherosclerosis and its risk. *Am J Cardiol* 1998; 82(9): 1034-9.
38. Gordon JB, Ganz P, Nobel EG et al. Atherosclerosis and endothelial function influence the coronary response to exercise. *J Clin Invest* 1989; 83: 1946-52.
39. Grisham MB, Jourdain H, Wink DA. Nitric oxide: physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276(2pt1): G315-21.
40. Harris DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 1997; 20(11 suppl 2): 11-7.
41. Harrison DG, Bates JM. The nitrovasodilators: new ideas about old drugs. *Circulation* 1993; 87: 1461-7.
42. Ignarro LJ. Nitric oxide as a communication signal in vascular and neuronal cells. In *Lancaster JR: Principles and Actions of nitric oxide*. New York, Academic Press 1996; 111-3.
43. Ikeda U, Shimada K. Nitric oxide and cardiac failure. *Clin Cardiol* 1997; 20(10): 837-41.
44. James KL, Brian TW, Jinkins PA et al. Superoxide release of neutrophils causes a reduction in nitric oxide gas. *Am J Physiol* 1998; 275(GPT1): L1120-26.
45. Jones KL, Brian TW, Jinkins PA. Superoxide released from neutrophils causes a reduction in nitric oxide gas. *Am J Physiol* 1998; 275(6pt): L1120-6.
46. Katz SD, Kahn T, Zeballos GA et al. Decreased activity of the L-arginine nitric oxide metabolic pathway in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1999; 99: 2113-7.
47. Katz SD. Mechanism and implications of endothelial dysfunction in congestive heart failure. *Curr Opin Cardiol* 1997; 12(3): 259-64.
48. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996; 79(3): 363-80.
49. Knowles RG, Palacios M, Palmer RJM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5159-62.
50. Kulik TJ. Inhaled nitric oxide in the management of congenital heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1996; 11: 75-80.
51. Lane P, Gross SS. Cell signalling by nitric oxide. *Semin Nephrol* 1999; 19(3): 215-29.
52. Lloyd-Jones DM, Block KD. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Ann Rev Med* 1996; 47: 365-75.
53. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 87-104.
54. Loscalzo J. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 117-9.
55. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide, a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227-37.
56. Lüscher TF, Noll G. Endothelium-dependent vasomotion in aging, hypertension and heart failure. *Circulation* 1993; 87: 97-103.
57. Lüscher TF. The endothelium and cardiovascular disease: a complex relation. *N Engl J Med* 1994; 330: 1081-83.
58. Metha S, Stewart DJ, Langleben D et al. Short-term pulmonary vasodilation with L-arginine in pulmonary hypertension. *Circulation* 1995; 92: 1539-46.
59. Miyachi T, Goto K. Heart failure and endothelial receptor antagonist. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20(5): 210-7.
60. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-11.
61. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Review* 1991; 43(2): 109-42.
62. Muijers RB, Folkerts G, Henricks PA et al. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci* 1997; 60(21): 1833-5.
63. Murad F. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA* 1996; 276: 1189-92.
64. Murrel W. Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* 1879; 1: 80, 113, 51, 225.
65. Panza JA. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin Cardiol* 1997; 20(II): 26-33.
66. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 1994; 331: 1287-98.
67. Paulus WJ. Endothelial control of vascular and myocardial function in heart failure. *Cardiovasc Drugs* 1994; 8(3): 437-46.
68. Quyyumi AA. Endothelium function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 1998; 105: 325-95.
69. Rand MJ, Li CK. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Ann Rev Physiol* 1995; 57: 682-98.
70. Rehman A, Whiteman M, Halliwell B. Scavenging of hydroxyl radicals but not of peroxynitrite and substrates of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1997; 122(8): 1702-6.
71. Ricevuti G. Host tissue damage by phagocytes. *Ann NY Acad Sci* 1997; 832: 426-48.
72. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a prospective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-8.
73. Ruschitzka FT, Noll G, Luscher TF. The endothelium in coronary artery disease. *Cardiology* 1997; 88 Suppl 30: 3-19.
74. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 3: 23-37.
75. Smith MA, Hirai K, Hsiao K, Papolla MA et al. Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *J Neurochem* 1998; 70: 2212-5.
76. Snyder SH. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 1992; 257: 494-6.
77. Spain's cardiologists rally to Moncada. *Nature* 1998; 395: 734-6.
78. Stefanelli C, Pignatti C, Tantini B et al. Nitric oxide can function as either a killer molecule or as an antiapoptotic effector in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1450(3): 406-13.

79. Testelli MR, Garfias-Arvizu A. ATP y metabolismo cardiaco. Acerca del tratamiento metabólico del infarto agudo del miocardio. *Rev Sanid Milit Mex* 1999; 53(4): 259-67.
80. The 1998 Nobel Prizes in Science. *Sci Am* 1999; 16-9.
81. Thorns V, Hansen L, Masliah. nNOS expressing neurons in the entorhinal cortex and hippocampus are affected in patients with Alzheimer disease. *Exp Neurol* 1998; 150: 14-20.
82. Tsao PS, Cooke JP. Endothelial alterations in hypercholesterolemia: more than simply vasodilation dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32(2): 548-53.
83. Tschudi MR, Lüscher TF. Nitric oxide: the endogenous nitrate in cardiovascular system. *Herz* 1996; 21: 50-60.
84. Umans JG, Levi R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 771-90.
85. Van Camp JR, Yian C, Lupinetti FM. Regulation of pulmonary vascular resistance by endogenous and exogenous nitric oxide. *Ann Thorac Surg* 1994; 58(4): 1025-9.
86. Wang By, Ho HK, Schwarzscher SP et al. Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation* 1999; 99: 1236-61.
87. Wittie BJ. Nitric oxide in physiology and pathology. *Histochem J* 1995; 27(10): 727-37.
88. Zusman RM, Morales A, Glasser DB et al. Overall cardiovascular profile of sildenafil citrate. *Am J Cardiol* 1999; 83: 35-44.