

Producción de iNOS y nitración de proteínas en la aorta de ratas expuestas a ozono[†]

Mayor M.C. Dolores Javier **Sánchez-González**,*,** Dr. en C. Rogelio **Hernández-Pando**,***
Tte. Cor. M.C. Martha Patricia **Fernández-Guzmán**,**** Cor. M.C. Ramón Arturo **Valdés-Espinosa**,*****
Biol. Claudia María **Martínez-Martínez**,*,*** Biol. Juan Carlos **León-Contreras**,***
Mayor M.C. Sergio Gabriel **Martínez-Salas**,***** Dra. en C. Guadalupe Cleva **Villanueva-López****

Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Hospital Central Militar. Ciudad de México

RESUMEN

El ozono (O₃) es el principal contaminante fotoquímico del aire, reacciona directamente con biomoléculas en el aparato respiratorio y genera estrés oxidativo directo y sistémico. Induce liberación de citocinas, expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y reclutamiento de leucocitos. El óxido nítrico (NO) reacciona con superóxido (O₂⁻) para formar peroxinitrito (OONO⁻), el cual nitra tirosina y forma nitrotirosina. En este estudio, se expusieron ratas Wistar machos, de 250 g a O₃ 0.25 ppm, y se determinó la iNOS y nitrotirosina por inmunohistoquímica y colágeno, con Tricrómica de Masson en aorta torácica. Con el O₃ se encontró iNOS en células endoteliales y nitrotirosina en todas las capas. El colágeno aumentó significativamente al mes de exposición. Estos resultados sugieren que la generación de peroxinitrito puede ser uno de los mecanismos tóxicos del O₃ a nivel cardiovascular. Este es el primer reporte internacional, donde se demuestra que el O₃ induce la formación de peroxinitrito y de iNOS en tejido vascular.

Palabras clave: ozono, óxido nítrico, iNOS, nitrotirosina, colágeno.

iNOS and protein nitration production in rat aorta exposed at ozone

SUMMARY

The ozone (O₃) is the main photochemical contaminant of the air that reacts directly with biomolecules in the respiratory system generating oxidative stress. It induces the cytokine liberation expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the leukocytes recruitment. The nitric oxide (NO) reacts with superoxide (O₂⁻) to develop peroxynitrite (OONO⁻), which creates nitrotyrosine. In this study, male Wistar rats were exposed from 250 g to O₃ 0.25 ppm, and the iNOS and nitrotyrosine were determined by immunohistochemistry and collagen, with Masson in thoracic aorta. iNOS was found in endothelial cells and nitrotyrosine in all the coats with the O₃. The collagen increased significantly at one month of exposition. These results suggest that the generation of peroxynitrite can be one of the toxic mechanisms of the O₃ at cardiovascular level; in addition, this is the first international report, where the O₃ is shown to induce the formation of peroxynitrite and iNOS in vascular tissue.

Key words: Ozone, nitric oxide, iNOS, nitrotyrosine, collagen.

[†] Este trabajo de investigación fue ganador del primer lugar del XIV Premio Nacional de Investigación en el Área Inédita Básica por el trabajo "Función endotelial en ratas expuestas a ozono", otorgado por la Fundación Glaxo-Smith-Kline el 11 de Septiembre del 2003.

* Departamento de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México. ** Sección de Estudios de Postgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, México. ***Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". ****Jefa de la Sección Académica de la Escuela Médico Militar y Fundadora de la Maestría en Morfología en la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, UDEFA. *****Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, EMGS, UDEFA. *****

Correspondencia:

Dra. en C. Guadalupe Cleva Villanueva-López
Plan de San Luis y Díaz Mirón. C.P. 11340 Del. Miguel Hidalgo. México, D.F. Tel: 5729-6300, Ext. 62773
Correo electrónico: cleva@prodigy.net.mx

Recibido: Octubre 19, 2004.

Aceptado: Mayo 30, 2005.

Introducción

Contaminación

El aire puro es una mezcla gaseosa compuesta por 78% de nitrógeno, 21% de oxígeno y 1% de diferentes compuestos tales como gases nobles, dióxido de carbono y ozono.

La contaminación atmosférica es cualquier cambio en el equilibrio de estos componentes, lo cual altera las propiedades físicas y químicas del aire.

La combustión empleada para obtener calor, generar energía eléctrica o movimiento, es el proceso de emisión de contaminantes más significativo.^{1,2} Los principales contaminantes del aire se clasifican en:

Primarios. Son los que permanecen en la atmósfera tal y como fueron emitidos por la fuente. Para fines de evaluación de la calidad del aire se consideran: óxidos de azufre, monóxido de carbono, óxido de nitrógeno, hidrocarburos y partículas.

Secundarios. Son los que han estado sujetos a cambios químicos, o bien, son el producto de la reacción de dos o más contaminantes primarios en la atmósfera. Entre ellos destacan los oxidantes fotoquímicos y algunos radicales de corta existencia como el ozono (O_3).^{3,4} A nivel nacional, la contaminación atmosférica se limita a zonas de alta densidad demográfica o industrial. Las emisiones anuales de contaminantes en el país son superiores a 16 millones de toneladas, de las cuales 65% son de origen vehicular.

En la Ciudad de México se generan 23.6% de dichas emisiones, en Guadalajara 3.5%, y en Monterrey 3%. Los otros centros industriales del país generan 70% restante.⁴

En julio de 1970, la Casa Blanca y el Congreso de los Estados Unidos, crearon la EPA (Environmental Protection Agency's), para controlar la contaminación. Según la EPA, un índice de la calidad del aire de 100 para el O_3 , corresponde a un nivel de 0.08 partes por millón (ppm) (promedio para ocho horas) (Cuadro 1).²

Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA), México D.F. El Índice de la Calidad del Aire se define como un valor representativo de los niveles de contaminación atmosférica y sus efectos en la salud, dentro de una región determinada.⁴

El IMECA consta de dos algoritmos de cálculo fundamentales: el primero, para la obtención de subíndices correspondientes a diferentes indicadores de la calidad del aire, y el segundo, para la combinación de estos en un índice global (Cuadro 2).⁴

El primero involucra la utilización de funciones segmentadas, basadas en dos puntos de quiebra principales. Estos puntos fueron obtenidos a partir de los criterios mexicanos de la calidad del aire, así como de niveles para los que ocurren daños significativos a la salud. Al primero se le asignó el valor de 100, y al segundo de 500; entre estos dos puntos se definieron tres más, cuyo objetivo es clasificar el intervalo en diferentes términos descriptivos de calidad del aire.⁴

Antecedentes

Ozono. Es un compuesto gaseoso, incoloro, producido en presencia de luz solar. Se origina de reacciones atmosféricas de hidrocarburos y óxidos de nitrógeno bajo la influencia de la luz solar.²

La capa de O_3 es una región de concentración de moléculas en la atmósfera de la Tierra. Esta capa se sitúa en una altitud entre 19 y 30 km. Si no fuese por esta capa, una gran cantidad de radiación ultravioleta (UV) procedente del sol alcanzaría la superficie terrestre, causando daños a todas las especies vivas.

El O_3 se crea en la estratosfera cuando la radiación UV procedente del sol rompe las moléculas de oxígeno (O_2) en dos átomos. Si un átomo de O_2 choca contra una molécula del mismo, se junta a ésta para formar O_3 . Este proceso recibe el nombre de fotólisis. El O_3 también se rompe de manera natural por acción de la radiación solar en la atmósfera, y también por reacción química con varios compuestos que contienen nitrógeno, hidrógeno o cloro.

Cuadro 1. Índice de la Calidad del Aire (EPA), USA.

Valores del Índice	Clasificación	Precauciones para protegerse del Ozono	Color
0 a 50 (0.0 a 0.064 ppm)	Buena	Ninguna.	Verde
51 a 100 (0.065 a 0.084 ppm)	Moderada	Las personas extraordinariamente sensibles deben considerar limitar los esfuerzos prolongados al aire libre.	Amarillo
101 a 150 (0.085 a 0.104 ppm)	Dañina a la salud de los grupos sensibles	Los niños y adultos activos, y las personas con enfermedades respiratorias, tales como asma, deben limitar los esfuerzos prolongados al aire libre.	Mostaza
151 a 200 (0.105 a 0.124 ppm)	Dañina a la salud	Los niños y adultos activos, y las personas con enfermedades respiratorias, tales como asma, deben evitar el esfuerzo prolongado al aire libre; todos los demás, especialmente los niños, deben limitar el esfuerzo prolongado al aire libre.	Rojo
201 a 300 (0.125 a 0.404 ppm)	Muy dañina a la salud	Los niños y adultos activos, y las personas con enfermedades respiratorias tales como asma, debenevitar cualquier esfuerzo al aire libre; todos los demás, especialmente los niños, deben limitar los esfuerzos al aire libre.	Lila
301 a 500	Alto riesgo	Todo mundo debe de evitar actividades al aire libre.	Café

Fuente: <http://www.epa.gov>. Los colores corresponden a sus respectivos índices.

Cuadro 2. Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA), México, D.F.

IMECA	Calidad del aire	Efectos	Color
0-100	Satisfactorio	Situación favorable para la realización de todo tipo de actividades.	Verde
101-150	No Satisfactorio	Aumento de molestias menores en personas sensibles.	Amarillo
151-200	No Satisfactorio		Rosa
201-300	Malo	Aumento de molestias e intolerancia relativa al ejercicio en personas con padecimientos respiratorios.	Rojo
301-500	Muy mala	Aparición de diversos síntomas e intolerancia al ejercicio en la población.	Café

Ozono: Un promedio horario máximo de 216 µg/m³ (0.11 ppm), equivalen a 100 puntos IMECA

Fuente: <http://www.imeca.com.mx>. Los colores corresponden a sus respectivos índices.

Cuadro 3. Óxidos de nitrógeno.

NO y especies relacionadas	
Nombre común	Abreviatura/Símbolo
Óxido nítrico (monóxido de nitrógeno) ^{a13}	NO
Anión nitroxil	NO ⁻
Nitrosonio ^b	NO ⁺
Dióxido de nitrógeno	NO ₂
Peroxinitrito	ONOO ⁻
Superóxido ^c	O ₂ ⁻
Nitrito	NO ₂ ⁻
Catión nitril (nitronio) ¹³	NO ₂ ⁺
Nitrato	NO ₃ ⁻
Nitrito + nitrato	NOx
Nitrosotioles	RSNO
Óxido nitroso ¹³	N ₂ O
Trióxido de dinitrógeno (anhídrido del ácido nitroso ¹³)	N ₂ O ₃

a. El electrón impar no se escribe en la abreviatura de NO como NO[•].

b. Aunque algunos agentes nitrosantes actúan como donadores de NO[•]. El NO⁺ no existe como tal en solución.

c. El NO reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito.

Modificado de Moncada S. Pharmacological Reviews 1997; 49: 137-42.

En una atmósfera no contaminada existe un balance entre la cantidad de O₃ que se produce y la que se destruye. Como resultado, la concentración total permanece relativamente constante, pero varía con la altura, encontrándose concentraciones máximas entre 19 y 23 km.

La mayor parte del O₃ en la estratosfera se produce en el Ecuador, en donde el nivel de incidencia de los rayos solares son mayores, y de aquí es transportado por los vientos a otras latitudes.²

La contaminación por O₃ ocurre en días soleados de la mayoría de las áreas urbanas de América del Norte. Este gas es el principal oxidante de las áreas urbanas.^{2,5} Se han documentado síntomas respiratorios producidos por irritación a corto plazo, asma, inflamación bronquioalveolar e incremento en las tasas de mortalidad tanto en las exposiciones controladas como en las exposiciones al aire libre de O₃.^{6,7}

La morbilidad cardiovascular aguda relacionada al O₃, puede resultar de alteraciones primarias en la función cardiovascular o de la integridad vascular pulmonar, producidas por la liberación de hormonas, citocinas o productos derivados de la oxidación, cuyos efectos deletéreos son difíciles de compensar por estos sistemas.⁵⁻⁷

La exposición a O₃ genera una respuesta inflamatoria de la vía aérea.^{5,8,9} La exposición única (entre 0.22 y 3 ppm) causa necrosis del epitelio respiratorio, decremento del volumen respiratorio forzado por segundo (FEV1), incremento de la población de neutrófilos, linfocitos, proteínas totales, interleucina 6 y 8 (IL 6 y 8), y del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF),⁸ reducción en 40% de la enzima glutatión peroxidasa de la mucosa bronquioalveolar, tirosina y uratos en el fluido bronquio alveolar.⁵

El O₃ es un fuerte inductor para el receptor *toll-like 4* (Tlr4) en ratones¹⁰ y de la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (FNT-α) en mamíferos (incluidos la rata y el hombre),¹¹ que a su vez, estimulan la expresión de la enzima sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) en células blanco productoras de la enzima.¹¹⁻¹³ Sin embargo, la exposición diaria (cuatro días) a O₃, atenúa parte de la respuesta inflamatoria generada por él mismo,¹⁴ disminuye la fibronectina, interleucina 6 (IL-6) y la cuenta total de neutrófilos obtenida por lavado bronquioalveolar. Después de siete días de exposición, se incrementa la cantidad total de macrófagos en bronquios, y se observa daño histológico progresivo en bronquiolos de rata.^{7,10,14-16}

El O₃ incrementa la expresión de la iNOS en macrófagos alveolares y neumocitos tipo II de ratas, asociado con la activación del factor de transcripción nuclear NF-kappa B (NF-kB).¹⁷⁻¹⁹ El transductor de señal y activador de transcripción 1 (Stat 1) favorece la sobreexpresión de NF-kB para que active al promotor de la iNOS.¹⁹ En ratas, el complejo promotor NF-kB de la iNOS se ha identificado a 76-85 y a 962-971 pares de bases (pb) río arriba del sitio de inicio de la transcripción; mientras que en el humano, este complejo se ha identificado entre 5.2 y 6.1, y a 8.3 kilobases (kb).^{9,11,20}

Óxido nítrico (NO). El NO (también llamado monóxido de nitrógeno) es un gas ligeramente soluble en algunos solventes y puede difundir relativamente fácil en membranas biológicas pero su solubilidad en agua es baja.^{21,22}

El NO se forma por la conversión enzimática del aminoácido L-arginina (isómero levógiro) a L-citrulina mediante la acción de las sintasas de óxido nítrico (NOS), aunque puede formarse a partir de nitritos en agua oxigenada (*Cuadro 3*).²¹⁻²³ La producción de NO en células endoteliales ocurre de manera constitutiva en respuesta a estímulos físicos, tales como la tensión que ejerce el flujo sanguíneo sobre la pared vascular (tensión de fricción o “*shear stress*”), esencial para la regulación del flujo y la presión sanguínea, y de manera inducible por estímulos inflamatorios.²⁴

El NO producido por el endotelio o las plaquetas, también inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión de leucocitos, y modula la proliferación de células musculares lisas. El NO se sintetiza en neuronas del sistema nervioso central, donde actúa como neurotransmisor, con funciones como la formación de la memoria, coordinación entre actividad neuronal y flujo sanguíneo, y modulación del dolor.

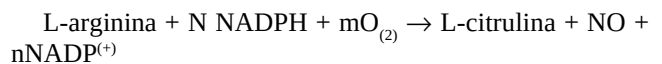
En el sistema nervioso periférico, el NO es un mediador liberado por una amplia red de nervios previamente reconocidos como no adrenérgicos y no colinérgicos. Estos median algunas formas de vasodilatación neurogénica y regulan ciertas funciones gastrointestinales, respirato-

rias y genitourinarias. Se les conoce como nervios nitrérgicos.^{21,22}

El NO también se genera en grandes cantidades durante los mecanismos de defensa del hospedero en reacciones inmunológicas. Tal generación de NO fue observada primero en macrófagos activados,²¹ donde contribuye a su toxicidad contra células tumorales y microorganismos invasores.

Las acciones citostáticas/citotóxicas del NO, resultan de sus acciones inhibitorias sobre enzimas llave de la cadena respiratoria y de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) en células diana. El NO también puede interactuar con radicales derivados del oxígeno para producir otras sustancias tóxicas, tales como el peroxinitrito (ONOO⁻). Así, el NO participa en la defensa inmunológica del hospedero y también está involucrado en la patogénesis del choque séptico y la inflamación.^{21,25}

Sintasas de óxido nítrico. La NOS es una enzima que contiene un grupo hemo con secuencia similar a la citocromo P-450 reductasa.²² Según el banco de datos de las enzimas,²⁶ la NOS se tipifica como E.C.1.14.13.39, donde E.C. significa clasificación de enzimas; E.C. 1 corresponde a oxidorreductasas o deshidrogenasas; E.C.1.14. indica las enzimas que actúan en donantes pares con incorporación de oxígeno molecular; E.C.1.14.13. son las enzimas que utilizan nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como donador, e incorporan un átomo. E.C.1.14.13.39 es específica para la NOS y cataliza la siguiente reacción:^{26,27}



Existen tres isoformas de NOS, dos de las cuales son constitutivas y una es inducible por estímulos inmunológicos.²⁸ La NOS constitutiva (cNOS) fue descubierta en endotelio vascular, por lo que se denominó eNOS, mientras que la iso-

Cuadro 4. Isoformas de sintasas de óxido nítrico.

Isoformas de NOS			
	NOS endotelial (eNOS) ^a (NOS Tipo III, NOS-3)	NOS neuronal (nNOS) ^a (NOS Tipo I, NOS-1, bNOS)	NOS inducible (iNOS) ^a (NOS Tipo II, NOS-2, macNOS, hepNOS)
Regulación primaria	Ca ²⁺ /calmodulina	Ca ²⁺ /calmodulina	Expresión génica
Localización subcelular	Membrana y citosol	Citosol?	Citosol y membrana
Cantidad de NO ^b producida	baja (pmolar)	baja (pmolar)	alta (μmolar)
Función	Señalización celular	Señalización celular	Citotóxica Citostática Citoprotectora
a. Abreviaturas alternativas.			

Tomado de Moncada S. Pharmacological Reviews 1997; 49: 137-142.

Cuadro 5. Biología molecular de las isoformas de NOS humanas.

Gen	eNOS	nNOS	iNOS
Localización	7q35-7q36	12q24.2	17cen-17q11.2
Estructura	26 exones	29 exones	27 exones
Tamaño	21 CV	160 CV	37 Kb
Péptido	1203 aa	1434 aa	1153 aa
Peso	133 KDa	160 kDa	131 kDa

Tomado de Pharmacological Reviews 1997; 49: 137-142.

forma neuronal se encuentra en el cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico y fue denominada nNOS. La isoforma de NOS inducida por estímulos inmunológicos, infecciosos, lipopolisacáridos (LPS) e inflamatorios, es conocida como iNOS (*Cuadro 4*).^{17,22,29,30}

La eNOS también se expresa en plaquetas y en ciertas poblaciones de neuronas en el cerebro, mientras que la nNOS se ha detectado en el epitelio respiratorio y en el músculo esquelético. Se han descubierto diferencias entre iNOS obtenidas de tejidos diferentes en la misma especie.^{31,32} La eNOS constitutiva puede inducirse en ciertas situaciones, tales como ejercicio crónico o embarazo, mientras que iNOS está presente constitutivamente en tejidos como el epitelio bronquial, riñón y algunos tejidos fetales (*Cuadro 5*).^{10,22}

La transcripción del gen de la iNOS a través de las vías de transducción de señales de la cinasa Janus (JAK)-Stat 1 y Stat 6,^{33,34} tanto en humanos como en ratas, es regulada por interferón gama (IFN- γ), ILs 1,6,10 y 11, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), GM-CSF, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, oncostatina M, hormona del crecimiento, prolactina y factor estimulante de colonias 1.

La interleucina 4 (IL-4) por sí sola no induce la expresión de iNOS, pero potencia la acción del IFN- γ .³⁵ La regulación de la expresión de la iNOS es controlada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional.^{19,23,25,33}

Homología de la iNOS entre humano y rata. La rata tiene 21 cromosomas en su genoma. Comparte con el humano el superreino *Eukaryota*, reino *Metazoa*, *phylum Chordata*, *subphylum Craniana*, *Vertebrata*, *Euteleostomi*; clase *Mammalia*, *Eutheria*. La diferencia taxonómica empieza en el orden *Rodentia*, suborden *Sciurognathi*, familia *Muridae*, subfamilia *Murinae*, género *Rattus*.³⁶⁻³⁸

El ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de la iNOS humana contiene 3,444 pb, y codifica para una proteína de 1,147 aminoácidos (aa).³² mientras que el mRNA de la rata para la iNOS contiene 3,614 pb,³⁶ pero codifica para una proteína de igual tamaño (1,147 aa).

La homología de la iNOS entre estas especies es de 99.7%, además de que presentan *splicing* alternativo, dependiendo el estímulo, lo que genera variaciones en el producto final pero mantiene la actividad biológica.³² El locus dónde se localiza este gen en la rata es el 24,599 del cromosoma 10,^{37,38} y el humano se localiza en el cromosoma 17.^{22,29}

Estrés oxidativo. Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón impar, característica que los hace inestables y reactivos porque tratan de completar sus electrones tomándolos de moléculas estables, que al perder uno de sus electrones se vuelven radicales libres.

Cada átomo de oxígeno tiene un electrón impar para su órbita externa, lo que le confiere la condición de radical libre y la molécula de oxígeno tiene dos electrones impares, o sea, es un birradical libre.^{39,40}

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y el superóxido son en gran parte generados por el metabolismo celular. El estrés oxidativo ocurre cuando la capacidad de defensa, consistente en pequeñas moléculas de antioxidantes y enzimas cooperadoras redox, se afectan debido a la producción excesiva de ROS.

Los estímulos oxidativos pueden ser transmitidos a través de vías de transducción de señales celulares al núcleo, para control de la división celular y supervivencia de la célula. Existe evidencia de que en condiciones de estrés oxidativo, muchas proteincinasas y factores reguladores de la transcripción son activados, como el NF- κ B, por ROS.^{41,42}

El estrés oxidativo sistémico está presente en condiciones patológicas, como la vasculopatía de la hipertensión esencial.^{41,42} En la aterosclerosis, se sabe que el estrés oxidativo tiene un papel importante en el desarrollo de enfermedad vascular, en la cual los leucocitos, macrófagos y células endoteliales contribuyen a la producción de radicales libres.^{43,44}

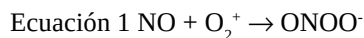
La formación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno se origina por reacciones bioquímicas de oxidación-reducción del metabolismo normal en las que interviene el oxígeno (catabolismo del triptófano, formación del colágeno y reducción de ribonucleótidos); fagocitosis, como parte de una reacción inflamatoria controlada; respuesta a la exposición de radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del cigarro, hiperoxia, ozono, ejercicio excesivo, dióxido de nitrógeno, metales pesados, hidrocarburos halogenados.⁴⁴

Algunas de las sustancias que pueden modificar los niveles de radicales libres aumentándolos son: halotano, acetaminofén, adriamicina, menadiona, ozono, cloramfenicol, nitrofurantoína, aminoglucósidos, digitálicos, tetraciclina, etcétera, y disminuyéndolos: quelantes, vitaminas A, E, C, B6, selenio y captopril.^{40,45}

Los síndromes, enfermedades o procesos degenerativos que están relacionados con el estrés oxidativo afectan órga-

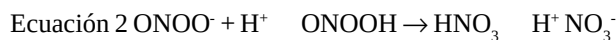
nos, aparatos y sistemas, tales como el sistema nervioso central (esquizofrenia, enfermedades de Parkinson y Alzheimer, esclerosis múltiple, distrofia muscular de Duchenne y ataxia-telangiectasia), ojos (cataratas, degeneración macular, retinopatías del diabético y del prematuro), sistema respiratorio (asma, cáncer pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria del adulto), sistema cardiovascular (aterosclerosis, infarto del miocardio, hipertensión, miocardiopatía), sistema digestivo (hepatitis, cirrosis hepática, diabetes mellitus, pancreatitis, cáncer del colon, colitis), sistema genito-urinario (insuficiencia renal, infertilidad masculina), sistema osteomioarticular (artritis reumatoidea, artritis psoriática, síndrome del hombro rígido), piel (eczema, melanoma y dermatitis por contacto), entre otros (mutagénesis, caquexia, síndrome de Werner y envejecimiento).⁴⁰⁻⁴⁵

Peroxinitrito. El superóxido es un derivado del oxígeno, capaz de inactivar al NO mediante una reacción química para formar peroxinitrito ($6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$) (Ecuación 1), un radical anión inestable.⁴⁶⁻⁴⁸

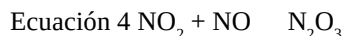
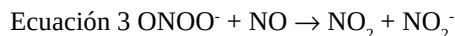


El ONOO⁻ (0.5 mM) tiene una vida media muy corta, entre 1 y 4.4 segundos, dependiendo de su entorno.^{49,50}

A pH fisiológico y en presencia de metales, el ONOO⁻ desarrolla descomposición heterolítica para formar el anión hidroxilo (OH⁻) y el ión nitronio. El ONOO⁻ puede isomerizar, vía su conjugado ácido (ácido peroxinitroso), para nitrar, el cual tiene una menor actividad biológica (Ecuación 2).⁴⁸



Sin embargo, el ONOO⁻ por sí mismo es un fuerte oxidante que puede reaccionar con un amplio número de biomoléculas, como lípidos, proteínas y ADN.⁵¹ Posteriormente, el ONOO⁻ puede reaccionar con el NO remanente para formar dióxido de nitrógeno (NO₂), el cual permite la formación del agente nitrosante N₂O₃ (Ecuaciones 3 y 4).⁴⁸



El ONOO⁻ produce nitración de la tirosina de gran variedad de proteínas.⁵²⁻⁵⁵ Aunque el dióxido de nitrógeno, nitritos ácidos o el cloruro de nitrilo pueden nitrar a la tirosina libre, se requieren grandes cantidades de estos compuestos para formar nitrotirosina. Por otra parte, los antioxidantes endógenos previenen eficazmente la nitración por dióxido de nitrógeno, nitritos ácidos o cloruro de nitrilo; pero sólo parcialmente la nitración por ONOO⁻, ya que una sola molécula de éste puede ceder los dos electrones necesarios para la oxidación de la tirosina. Por esa razón, la detección de nitrotirosina se utiliza como marcador de la producción de ONOO⁻.^{46,52}

La nitrotirosina se ha encontrado en proteínas, en una gran variedad de padecimientos, incluyendo lesiones ateroscleróticas de las arterias coronarias humanas, corazón postisquémico y placenta durante la preeclampsia.⁵⁶⁻⁵⁸ Los efectos del ONOO⁻ incluyen oxidación, nitración e hidroxilación.⁵⁰

Debido a sus propiedades como radical libre, el ONOO⁻ puede producir oxidación y mutación del ADN a través de 8-nitroguanina, 8-oxoguanina, y por mutaciones como transversiones guanina: citosina por timina: adenina (G:C → T:A), llevándolo a la fragmentación y estimulando la ribosilación de ADP, originalmente para reparar ADN y después, si los estímulos continúan, se desarrolla necrosis, apoptosis o carcinogénesis.^{50,51}

El ONOO⁻ causa oxidación de las moléculas por tres mecanismos: reacción directa con grupos sulfhidrilo y tioéteres, descomposición en radicales OH⁻ y NO₂⁻, y reacción con iones de metales para generar nitración e hidroxilación de aminoácidos aromáticos, como tirosina (*Figura 1*) y triptófano.⁵¹

El peroxinitrito (ONOO⁻) reacciona con la tirosina en una reacción de primer orden vía la transferencia de un electrón, para formar el radical tirosil y dióxido de nitrógeno (NO₂) como productos (Reacción 1).

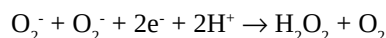
La subsecuente combinación de radicales forma 3-nitrotirosina y 3,3'-ditirosina como productos (Reacciones 2 y 3). En la reacción de NO₂ con tirosina, también resulta formación de radicales tirosil, que favorece la formación de ditirosina, preferentemente sobre nitrotirosina, cuando la tirosina está presente en exceso.¹³

El ONOO⁻ también modula algunas de las funciones del organismo. Las concentraciones nanomolares (100-1,000 nM) de ONOO⁻ en ratas, inhiben la interacción leucocito-endotelio, ejercen efectos citoprotectores en el daño por reperusión en la isquemia del miocardio, y disminuyen la acumulación de polimorfonucleares en el corazón postisquémico.

A concentración de 5 µM produce $6.5 \pm 3.8\%$ de relajación de aorta de rata, a 50 µM produce $37.7 \pm 9.3\%$, pero entre 50-500 nM de ONOO⁻ no se observa respuesta detectable.^{59,60}

Sistema antioxidante. En condiciones normales, las células cuentan con mecanismos de protección, enzimáticos y no enzimáticos, contra la producción de radicales libres.⁶¹

Entre los mecanismos celulares de protección enzimáticos se encuentra la enzima superóxido dismutasa (SOD), que se encarga de la reacción de dismutación del radical anión superóxido intracelular; ésta pertenece a la familia de metaloenzimas y cataliza la conversión de O₂⁻ a H₂O₂ a través de la siguiente reacción:



Esta enzima se encuentra presente en todos los organismos animales y vegetales que viven bajo condiciones aeróbicas. La catalasa y glutatión peroxidasa (GP) conforman el

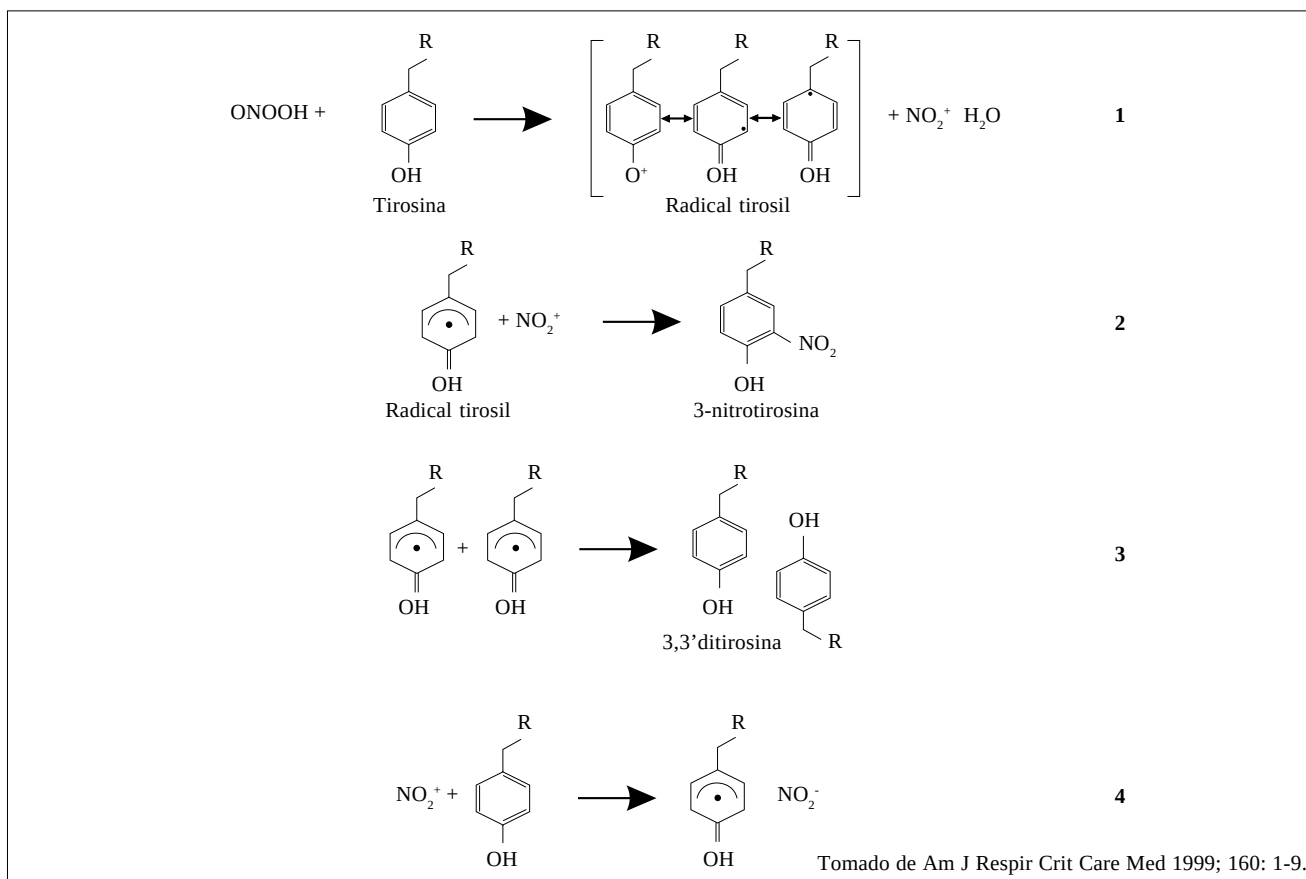
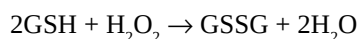


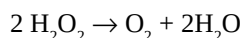
Figura 1. Mecanismo de reacción del ONOO- con tirosina.

principal sistema enzimático intracelular de remoción de moléculas de peróxido de hidrógeno. La catalasa se localiza a nivel de peroxisomas, y la glutatión peroxidasa a nivel citosólico y mitocondrial.

El mayor riesgo de la presencia del H_2O_2 es la producción del radical $\text{OH}^\cdot$, que es muy reactivo e inestable. A bajas concentraciones, el H_2O_2 es removido por la glutatión peroxidasa en presencia de glutatión reducido (GSH), el cual es oxidado hasta glutatión oxidado (GSSG):



A altas concentraciones de H_2O_2 , la catalasa se vuelve primordial para su remoción:



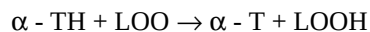
La enzima glutatión reductasa es una flavoproteína (contiene flavin adenin dinucleótido), regenera GSH a partir de GSSG, con el NADPH como la fuente reductora:



Entre los mecanismos no enzimáticos se encuentra el α -tocoferol o vitamina E, que se ha descrito como antioxidante

de fase lipídica, ya que por ser liposoluble difunde con mucha facilidad hacia la membrana y transforma especies muy reactivas, como el $\text{OH}^\cdot$, en formas menos reactivas.

Actúa donando Hidrógeno ($\text{H}^\cdot$) al radical, por lo que se produce una forma de radical estable de vitamina E:



El ácido ascórbico o vitamina C, es antioxidante de fase acuosa que protege contra daños oxidativos de grasas por sus propiedades redox. Actúa donando hidrogeniones al radical libre, transformándose de ácido ascórbico (AH_2) en ácido dehidroascórbico (A), con la formación del radical ascórbilo ($\text{A}^\cdot$) como intermediario, molécula que a su vez actúa como radical libre, pero que normalmente es mantenido a bajas concentraciones en plasma.

La ceruloplasmina, proteína circulante portadora de cobre, actúa como antioxidante extracelular.

Existen otros compuestos no enzimáticos que han sido denominados “removedores de radicales libres”, que tienen en común ser fácilmente oxidables. Entre ellos figuran cisteína, manitol, tiourea, alopurinol, oxipurinol, hidroxitolueno butilado, desferoxamina, dimetilsulfóxido, dimetiltiourea, etcétera.⁶²

Los 10 principales antioxidantes no enzimáticos son vitaminas A, C y E, carotenoides naturales, ácido α -lipoico,

proantocianidinas oligoméricas, ginkgo biloba, curcuminoides, minerales y coenzimas.⁶³

Arterias. Las arterias tienen tres capas concéntricas: una capa interna, que es la túnica íntima, que consiste en un tubo endotelial cuyas células escamosas tienen su eje mayor orientado longitudinalmente; una capa intermedia, la túnica media compuesta principalmente por células musculares lisas dispuestas circularmente, y una capa externa, la túnica adventicia, constituida por fibroblastos y fibras colágenas orientadas longitudinalmente, que se funden con el tejido conectivo laxo alrededor de los vasos. El límite entre las túnicas íntima y media es la lámina elástica interna, y entre las túnicas media y adventicia se encuentra la lámina elástica externa.

Las arterias se clasifican por su tamaño, componente predominante de la túnica media y función principal, en elásticas o conductoras, musculares de distribución, y arteriolas.⁶⁴

Aorta. La aorta es una arteria elástica conductora, que posee muchas capas fenestradas de elastina en su túnica media; por esta razón, durante la sístole se distiende, con la subsiguiente recuperación elástica en la diástole, así actúa como bomba subsidiaria que mantiene un flujo continuo a pesar del carácter intermitente del latido cardíaco.

El endotelio es un epitelio fino escamoso, separado de la elástica interna por tejido conectivo laxo, que contiene escasos fibroblastos, células musculares lisas y finas fibras de colágeno.

Las células endoteliales son de perfil poligonal, de 10 a 15 µm de ancho y 25-50 µm de largo, con su eje mayor orientado longitudinalmente. Las células endoteliales vecinas están unidas por simples uniones ocluyentes y por escasas uniones tipo nexo.

Los organelos se localizan en la zona más gruesa del citoplasma, alrededor de un núcleo aplanado de localización central. El endotelio es una población celular de renovación muy lenta, por lo que raras veces se observan divisiones celulares. Sus membranas adluminal y abluminal tienen numerosas vesículas, involucradas en el transporte transendotelial. En ocasiones, se extienden prolongaciones cortas y rechonchas de la base de las células endoteliales a través de fenestraciones de la elástica interna, estableciendo uniones con las células musculares lisas de la media.

La función secretora de las células endoteliales es muy amplia: segregan componentes de la matriz extracelular subyacente, incluyendo fibronectina, laminina, colágenos II, IV y V; producen sustancias reguladoras del tono vascular, tanto vasoconstrictoras (endotelina-1) como vasodilatadoras (NO sintetizado por la eNOS), entre otras. La mayoría de sus productos son segregados de manera constitutiva, excepto el NO sintetizado por la iNOS, el cual se produce en situaciones de estrés, inflamación y por citocinas de tipo TH-1,⁶⁵⁻⁷³ y factor de Von Willebrand, cuya secreción sigue las vías secretorias reguladas. Este factor se almacena en los gránulos secretorios de Weibel-Palade, que miden 0.1 x 3 µm.

En la aorta de rata, el músculo liso constituye sólo 35% del volumen de la pared. Los miocitos se encuentran orientados de forma circunferencial, dispuestos en paquetes paralelos; miden 130 µm de longitud en la aorta, 40 µm en arteriolas, y 400-500 µm en el intestino. Está demostrado que estas células musculares producen iNOS, inducida por citocinas proinflamatorias,^{20,65-73} y por daño mecánico.⁷⁴ Este NO es el principal mecanismo de vasorrelajación e hipotensión en el choque séptico.^{20,75} La iNOS aumenta su expresión en la pared vascular de manera progresiva con la edad, debido a la activación de NF-κB,⁶⁵⁻⁷³ después de isquemia cerebral,⁶⁶ por denudación endotelial,⁶⁸ en respuesta a endotoxinas y arterioesclerosis.⁷¹

Las fibrillas colágenas de la media y de la íntima miden 30 nm de diámetro, siendo el condroitín sulfato, el glucosaminoglicano predominante de la matriz extracelular circundante. Las fibras colágenas de la adventicia son más grandes (60-100 nm) y la matriz extracelular asociada es rica en dermatán sulfato y heparán sulfato.⁶⁴

Disfunción endotelial. Se define como pérdida de la función reguladora del endotelio.⁷⁶⁻⁷⁸ Los radicales libres y el peroxinitrito⁷⁹⁻⁸¹ son algunos de los mediadores que se han usado para evaluar la función endotelial. En general, se dice que el cambio en la producción de NO es un marcador de disfunción endotelial.⁷⁶⁻⁸⁰

En 1998, el premio Nobel de medicina fue para tres investigadores: Furchgott, Ignarro, y Murad, quienes de manera separada trabajaron sobre el factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Furchgott describió en 1980, la existencia de una sustancia liberada por el endotelio en respuesta a la acetilcolina, a la que denominó EDRF (endothelium-derived relaxing factor). Siete años más tarde, Moncada e Ignarro demostraron, de manera independiente, que EDRF y NO eran la misma molécula.^{22,28,29}

En la última década, se ha reconocido la importancia de las células endoteliales vasculares para el mantenimiento y regulación vascular. El NO derivado de las células endoteliales es un modulador crítico del tono vascular local y de la formación de trombos. Existe deficiencia endotelial en la producción de NO en una serie amplia de enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, aterosclerosis, angina inestable e insuficiencia cardíaca congestiva. La química de NO en las matrices biológicas es muy compleja, y otras vías de producción de NO pueden influir en su acción dentro del sistema cardiovascular. Por ejemplo, el anión superóxido interactúa con NO y reduce su eficacia como agente de transducción de señales, promoviendo la formación de peroxinitrito.^{60,81,82}

Planteamiento del problema

El O₃, dependiendo de la dosis y tiempo de exposición, produce en las células de la mucosa respiratoria estrés oxidativo y respuesta inflamatoria sistémica.⁸³⁻⁸⁶

Existen antecedentes donde se evalúan los efectos del O₃ en la reactividad vascular y función endotelial, pero aún fal-

ta mucho por investigar para explicar cómo esta exposición afecta al sistema cardiovascular.⁶

La morbilidad cardiovascular aguda relacionada con el O₃ puede resultar de alteraciones primarias en la función cardiovascular, o de la liberación de citocinas y expresión de enzimas, que sólo son detectadas en presencia de estímulos inflamatorios, como es el caso de la iNOS.⁸³

La pregunta central de esta investigación es: ¿inducirá la exposición a O₃ síntesis de iNOS, nitración de proteínas y alteraciones morfológicas en la aorta de rata?

La presencia de nitrotirosina como indicador indirecto de la producción de peroxinitrito, podría explicar algunos de los mecanismos de daño por O₃ en el sistema cardiovascular y en disfunción endotelial.

Hipótesis

La exposición a ozono induce la síntesis de óxido nítrico, nitración de proteínas y alteraciones morfológicas en la aorta de rata.

Metas

Objetivo general. Determinar la presencia de iNOS, nitrotirosina y alteraciones morfológicas en aorta torácica de ratas expuestas a ozono.

Objetivos particulares.

1. Detectar por inmunohistoquímica la presencia de iNOS en la aorta torácica aislada de rata.
2. Detectar la presencia de nitrotirosina en aorta torácica de ratas por medio de inmunohistoquímica.
3. Localizar la producción de nitrotirosina mediante inmunoelectromicroscopía.
4. Valorar cambios morfológicos en aorta después de la exposición crónica a O₃, mediante técnicas histológicas de hematoxilina y eosina y tricrómica de Masson.

Material y métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar machos, de 200-250 g (10 semanas), alimentadas con "Purina Chow" y agua *ad libitum*, las cuales se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Fisiología, de la Facultad de Medicina, en la Universidad Nacional Autónoma de México (ciclos luz oscuridad 12 x 12 horas).

Exposición a O₃

Se utilizó una cámara cerrada conectada al emisor de O₃ de flujo variable (5L/seg), el cual consistió en un tubo con chips de aluminio y dos electrodos de alto voltaje en su interior. El oxígeno que circuló por este dispositivo se transformó en O₃, el cual a su vez fue alimentado con aire ambiente.

Las mediciones de la exposición fueron determinadas mediante un monitor de sistema de control de O₃, aprobado por la EPA.

Los animales se sometieron a concentraciones prolongadas (cuatro horas diarias), equivalentes a un día de contingencia ambiental (0.25 ppm), durante siete, 14 y 28 días, n = 8 para cada grupo, de los cuales cuatro fueron sometidos a inmunohistoquímica y cuatro a inmunoelectromicroscopía, en el Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Nutrición.

Grupo testigo

El grupo testigo se formó por animales que se mantuvieron en cámaras cerradas alimentadas por aire ambiente libre de O₃, en las cuales se midieron los niveles de O₃, constatando que durante todo el experimento fueran menores de 0.05 ppm.

Se sacrificaron al mismo tiempo que los grupos expuestos, n = 8 por periodo.

Estudio histológico e inmunohistoquímico

El sistema avidina-biotina. La avidina es una glucoproteína derivada del huevo, con afinidad extremadamente alta (afinidad constante > 1015 M⁻¹) para la biotina.

Muchas moléculas de biotina pueden acoplarse a una proteína, permitiendo a la proteína biotinilada unirse a más de una molécula de avidina. Si la biotinilación se realiza bajo condiciones óptimas, la actividad biológica de la proteína puede conservarse.

Por los enlaces covalentes con que se une la avidina con diferentes ligandos, como fluorocromos, enzimas o marcadores, el sistema avidina-biotina puede utilizarse para estudiar una amplia variedad de estructuras biológicas y procesos. Este sistema ha demostrado ser particularmente útil en el descubrimiento y localización de antígenos, glucos conjugados y ácidos nucleicos, empleando anticuerpos biotinilados, lectinas o sondas de ácidos nucleicos.

La técnica que se utilizó en este trabajo fue el procedimiento "ABC" o método del complejo preformado. Después de la aplicación de un anticuerpo primario o secundario biotinilado, se agrega un complejo preformado entre avidina y una enzima biotinilada.

El sistema de avidina-biotina proporciona la sensibilidad más alta en la fluorescencia y en la detección basada en enzimas, versatilidad que permite intercambio fácil o introducción de marcadores múltiples, y la habilidad de localizar o descubrir antígenos que son difíciles o imposibles de ver o medir con otros sistemas.⁸⁷

Inmunohistoquímica y estudio histológico. Las ratas fueron sacrificadas dos horas después de ser expuestas a O₃, se anestesiaron con pentobarbital sódico 0.5 mL intraperitoneal, y se perfundieron por vía intracardiaca con etanol absoluto. Por disección, se extrajo la aorta torácica y se tomaron muestras representativas, las cuales se colocaron en el mismo fijador por 48 horas y después se incluyeron en parafina.

Se realizaron cortes de 5 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina, y tricrómica de Masson para

estudio histológico. De estos bloques se obtuvieron cortes montados en portaobjetos silanizados para realizar inmunohistoquímica, los cuales fueron desparafinados y rehidratados.

La peroxidasa endógena se inhibió por incubación con una solución de metanol y peróxido de hidrógeno a 30% (34 mL de metanol y 6 mL de H_2O_2) durante tres horas, en un vaso de Koplin. Luego de lavar con alcohol de 96°, agua y buffer salino de fosfatos (PBS), se bloquearon los sitios libres antigénicos para evitar pegado inespecífico con albúmina de suero bovina (ASB) a 3% en PBS por 30 minutos para la iNOS y con suero de cabra (Santa Cruz Biotechnology) para la nitrotirosina.

Posteriormente, se decantó el exceso de ASB-PBS y de suero de cabra, y se colocó el anticuerpo primario antisuero policlonal de conejo anti-iNOS (Cayman Chemical Company, USA) y anticuerpo primario IgG (Inmunoglobulina G), purificado de conejo anti-nitrotirosina (Upstate biotechnology, Lake Placid, NY), a una dilución 1:500 en cámara húmeda, y se dejó incubando por tres horas.

Terminado este tiempo, las laminillas se lavaron tres veces con PBS y se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado y se dejó incubar por 50 minutos; luego se lavaron nuevamente tres veces con PBS.

Después, se colocaron nuevamente 30 minutos en la cámara húmeda en contacto con el complejo avidina-biotina (VECTASTAIN ABC) a 0.05% del reactivo A, y 0.05% del reactivo B (VECTOR Laboratories) en PBS.

La reacción antígeno anticuerpo fue detectada empleando una solución que contiene 40 μ L de H_2O_2 (H_2O_2 a 30%, Merck, Darmstadt, Germany), ya que es el sustrato de la enzima peroxidasa, 1 mg del cromógeno (SIGMA, St. Louis, MO, USA); diaminobencidina (DAB), que funciona como aceptor de electrones, disueltos en 1 mL de PBS. Después de 7-10 minutos de exposición en esta solución, las laminillas se lavaron con agua corriente, se contrastaron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron y montaron con resina sintética (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA).⁵⁴

Posteriormente, se delimitaron áreas de 12,000 μ m² de las capas íntima y media de la aorta, de dónde se detectaron áreas marcadas para iNOS, nitrotirosina y colágeno; el porcentaje de positividad se estableció en cada una de las áreas analizadas multiplicando la zona positiva por 100 y dividiendo entre el área total. Para la cuantificación se analizaron aleatoriamente tres campos por laminilla y se obtuvo la media. La cuantificación se realizó en el analizador de imagen Image-Pro Plus 4.5 del microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX41.

Inmunoelectromicroscopía

Las ratas fueron sacrificadas dos horas después de ser expuestas a O_3 , se anestesiaron con pentobarbital sódico 0.5 mL intraperitoneal, y se perfundieron por vía intracardiaca con paraformaldehído a 4% en buffer de Sörensen al 0.19 M con pH de 7.2 a 4 °C. Por disección, se extrajo la aorta torácica y se tomaron muestras de 1 mm en forma de

rodajas, las cuales se colocaron en el mismo fijador durante cuatro horas a 4 °C.

Las muestras contenidas en tubos Pyrex se lavaron en buffer de Sörensen 0.19M a un pH de 7.2 a 4 °C, haciendo tres cambios de 10 minutos cada uno, y después en cloruro de amonio 0.5 M en buffer de Sörensen 0.19M a pH de 7.2 durante 45 minutos, a temperatura ambiente, seguido de un último lavado en PBS 0.19M a pH de 7.2 con tres cambios de 10 minutos cada uno a 4 °C.

La deshidratación se llevó a cabo en alcoholes a 20, 50, 70, 90 y 100% durante una hora en cada uno de ellos. La preinclusión se realizó en alcohol absoluto/resina LR White de grado medio (London Resin Company LTD, UK) 2:1 por 12 horas, y después LR White absoluta por tres horas.

La inclusión se completó en la estufa de polimerización a 60 °C, en cápsulas de grenetina durante una hora. Se realizaron cortes semifinos de 0.45 μ m de espesor y se tiñeron con azul de toluidina-borato de sodio 1:1 para seleccionar el área de interés. Después, se obtuvieron los cortes finos de 60 a 90 nm de espesor y se montaron en rejillas de níquel recubiertas de oro. Se lavaron en agua bidestilada por goteo; se flotaron en pozos de agua bidestilada por cinco minutos y en solución PBS 0.19M/ovalbúmina/Tween 20 (39.6 mL/0.5 mL/20 μ L, respectivamente) durante 45 minutos.

Se bloquearon los sitios libres antigénicos para evitar pegado inespecífico con suero de cabra (Santa Cruz Biotechnology) durante una hora. Luego se incubaron con el anticuerpo primario IgG purificado de conejo anti-nitrotirosina (Upstate biotechnology, Lake Placid, NY) a una dilución 1: 150 en PBS-ovalbúmina. Se continuó con lavado por flotación con PBS-ovalbúmina-Tween. Se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a oro (IgG conjugado con oro de 5 nm. Sigma, USA) 1:20 en PBS-ovalbúmina por una hora. Después se lavaron por flotación con PBS-Tween por 15 minutos; se realizó un último lavado con agua bidestilada. Las rejillas se dejaron secar por media hora, y después se contrastaron con acetato de uranilo por 30 segundos, se decantó, se realizó un último lavado con agua bidestilada para quitar el exceso de uranilo, se secaron y observaron en el microscopio electrónico (EM-10 ZEISS). Se tomaron fotografías de áreas marcadas para nitrotirosina.

Análisis estadístico

La iNOS y nitrotirosina se reportaron en porcentajes de positividad respecto al área total observada en el microscopio, la cual fue de 300 μ m luminales x 400 μ m de profundidad, igual a 12,000 μ m², que corresponde con las capas íntima y media de la aorta (ver figuras).

Para la medición de colágeno, únicamente se midió la capa media, excluyendo la íntima y la adventicia; la primera por ausencia de colágeno, y la segunda por su alto contenido del mismo.

La prueba estadística utilizada para los tiempos de exposición a O_3 fue el análisis unilateral de variancia por rangos de Kruskal-Wallis. Las comparaciones entre grupos, se rea-

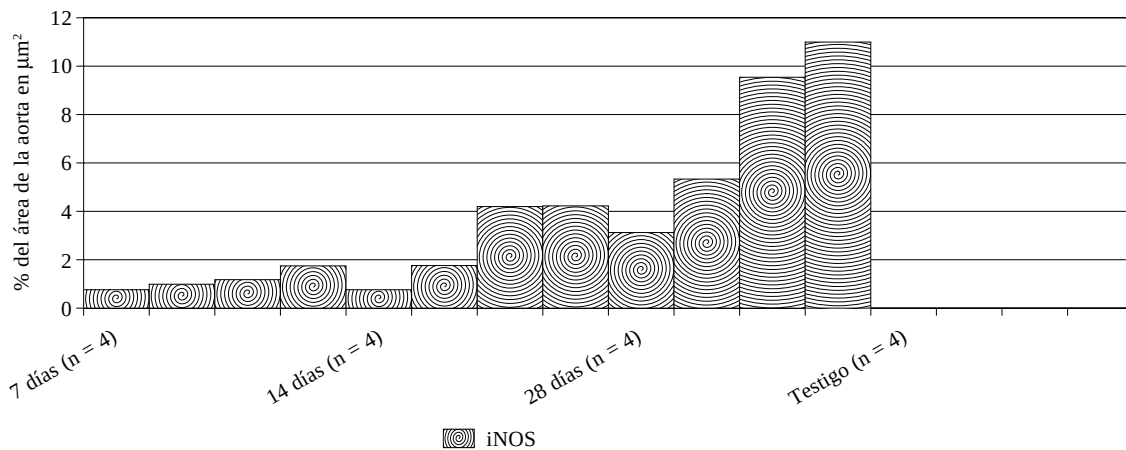


Figura 2. Detección de la iNOS en los diferentes tiempos de exposición a ozono.

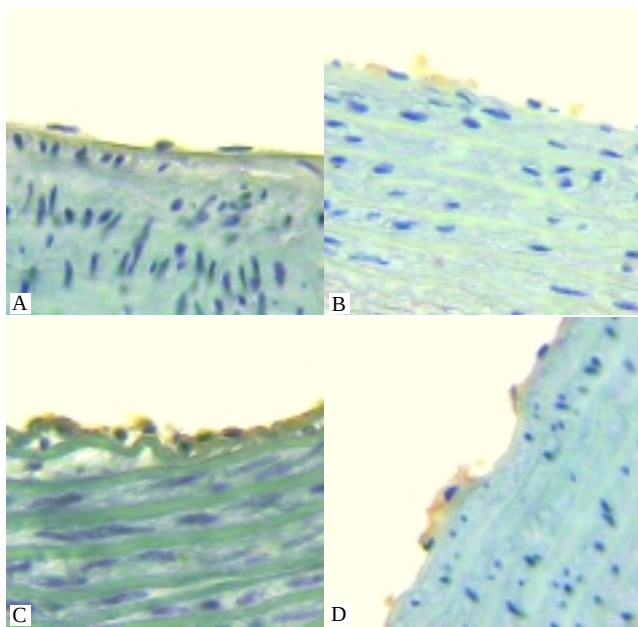


Figura 3 A-D. Detección de la iNOS en los diferentes tiempos de exposición a O_3 .

lizaron por el método de Student-Newman-Keuls. El nivel de significancia estadística considerado fue de $p < 0.05$.

Resultados

Detección de iNOS

Se detectó iNOS en la aorta torácica de ratas expuestas a O_3 (0.25 ppm, cuatro horas diarias). La *figura 2* muestra la relación con la cantidad de la enzima detectada por inmunohistoquímica, y el tiempo de exposición a O_3 . El porcentaje de marca positiva fue 0 (cero) en el grupo control y aumentó progresivamente a lo largo de la exposición a O_3 .

Se muestra el porcentaje del área de las aortas donde se detectó iNOS en cada uno de los periodos de exposición a O_3 y del grupo testigo. Cada barra representa una rata. En la

figura se muestra el patrón de iNOS detectada en todos los animales.

La iNOS detectada en la aorta se localiza principalmente en células endoteliales. En las células musculares de la capa media también se detectó, pero sólo hasta los 28 días de exposición (*Figuras 3 B-C*).

Las *figuras 3 A-D* corresponden a inmunohistoquímica para iNOS 400x de las aortas torácicas de las ratas expuestas a O_3 y del grupo testigo sin exposición. Se observa la capa íntima formada por una capa de tejido conectivo avascular y revestida por células endoteliales, cuyos núcleos sobresalen en la luz del vaso, y la capa media formada por superposición de láminas elásticas fenestradas de elastina. Entre ellas se sitúa el componente celular formado principalmente por fibras musculares lisas y fibroblastos.

La *figura 3 A* corresponde al grupo testigo, la cual es negativa para la enzima y solamente se observa el color morado de la hematoxilina de Harris. Se observan perfectamente tres células endoteliales en la superficie luminal y parte de la capa media de la aorta con núcleos de las células musculares.

Las *figuras 3 B, C y D* corresponden a siete, 14 y 28 días de exposición, respectivamente. Obsérvese el color café tabaco revelado por la diaminobencidina, característico de esta técnica en las zonas donde se localiza la enzima; en el citoplasma de las células endoteliales en todos los tiempos de exposición, y en células musculares de la capa media se detecta hasta los 28 días de exposición.

Detección de nitrotirosina

Las ratas expuestas a O_3 (0.25 ppm, cuatro horas diarias) presentaron nitración de tirosina en la aorta torácica (*Figura 4*). La gráfica muestra relación con la cantidad de nitrotirosina detectada por inmunohistoquímica, y el tiempo de exposición a O_3 . Se muestra el porcentaje de área en las aortas donde se detectó nitrotirosina en cada uno de los periodos de exposición a O_3 . En el grupo control no se detectó el aminoácido. Cada barra representa un animal. Como puede observarse, el grupo control fue negativo y los animales expuestos a O_3 presentaron aumento progresivo de la cantidad

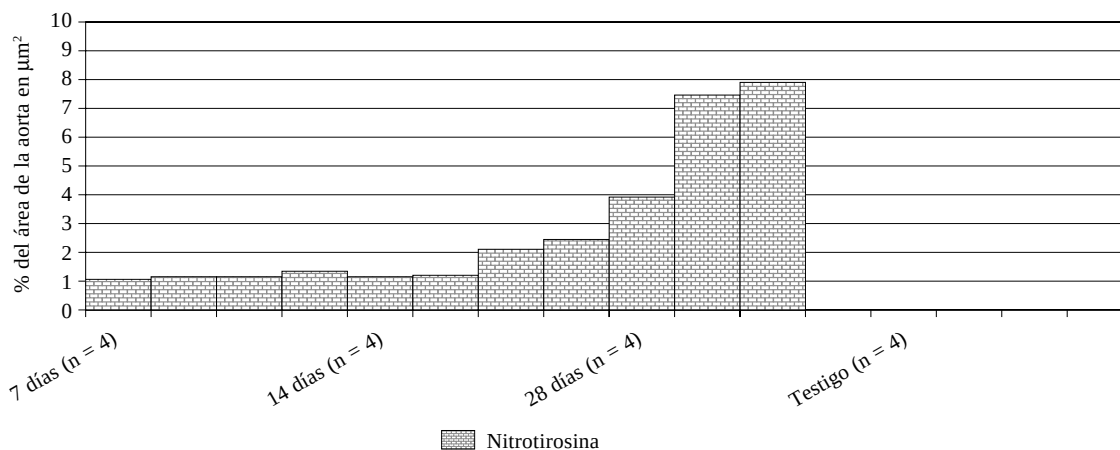


Figura 4. Detección de nitrotirosina en los diferentes tiempos de exposición a ozono.

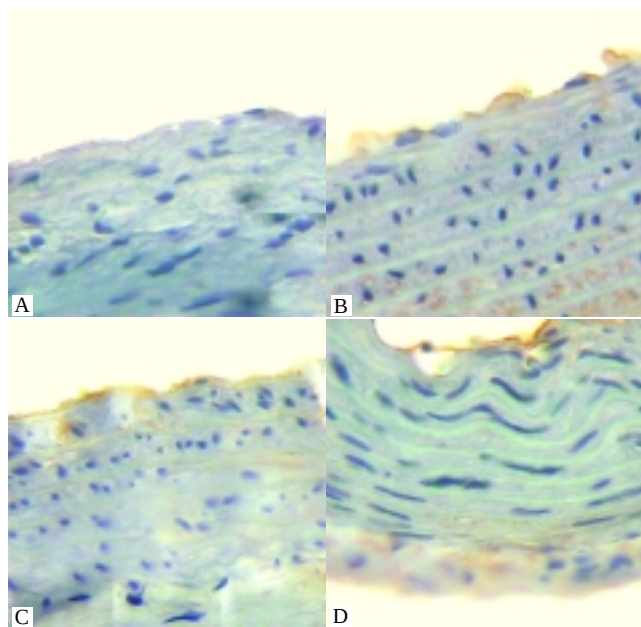


Figura 5 A-D. Detección de nitrotirosina en los diferentes tiempos de exposición a O_3 .

de marca, iniciándose desde el primer periodo de exposición (siete días). La nitrotirosina en la aorta se localiza en células endoteliales y en células musculares lisas de la capa media de manera más difusa que la iNOS.

En las figuras 5 B-C, nótese que la aorta correspondiente al grupo testigo es negativa para la nitrotirosina (Figura 5 A). Las figuras corresponden a inmunohistoquímica para nitrotirosina 400x de las aortas torácicas de las ratas expuestas a O_3 y del grupo testigo sin exposición. Se observan la capa íntima formada por una capa de tejido conectivo avascular y revestida por células endoteliales, cuyos núcleos sobresalen en la luz del vaso, y la capa media formada por superposición de láminas elásticas fenestradas de elastina. Entre ellas se sitúa el componente celular, formado principalmente por fibras musculares lisas y fibroblastos.

La figura 5 A corresponde al grupo testigo, la cual es negativa para la enzima y solamente se observa el color morado de la hematoxilina de Harris.

Las figuras 5 B, C y D corresponden a siete, 14 y 28 días de exposición, respectivamente. Obsérvese el color café tabaco revelado por la diaminobencidina, característico de esta técnica en las zonas donde se localiza la nitrotirosina; en el citoplasma de las células endoteliales, en todos los tiempos de exposición y desde los siete días de exposición, se observa marca de manera difusa en la capa media.

iNOS y nitrotirosina en la exposición a O_3

La detección de la iNOS y de nitrotirosina mostró un patrón similar de positividad en el tejido, en relación con el tiempo de exposición a O_3 (Figura 6).

La detección de la iNOS y de nitrotirosina en aorta torácica de las ratas, mostró un patrón similar progresivo de positividad en el tejido en relación con el tiempo de exposición a O_3 .

Colágeno en la aorta

Las ratas expuestas a O_3 (0.25 ppm, cuatro horas diarias) mostraron diferencias en la cantidad total de colágeno de las capas medias de sus aortas.

La figura 7 muestra la cantidad de colágeno de las capas medias de las aortas de todos los animales. Se observa que a los 28 días de exposición al O_3 , ocupa entre 50 y 60% de la capa media, y existe diferencia notable con los otros grupos. En el grupo testigo la concentración de colágeno es menor a 30%.

El colágeno de la capa media de las aortas de las ratas mostró una relación directamente proporcional al tiempo de exposición a O_3 (Figuras 8 B-C). Nótese la escasa cantidad de colágeno en el grupo testigo (Figura 8 A).

Las figuras 8 A-D corresponden a las aortas torácicas de las ratas expuestas a O_3 y del grupo testigo sin exposición, teñidas con la técnica de Masson a 400x. El colágeno se muestra de color azul intenso por el azul de anilina. Se observan las capas íntima, media y externa o túnica adventicia,

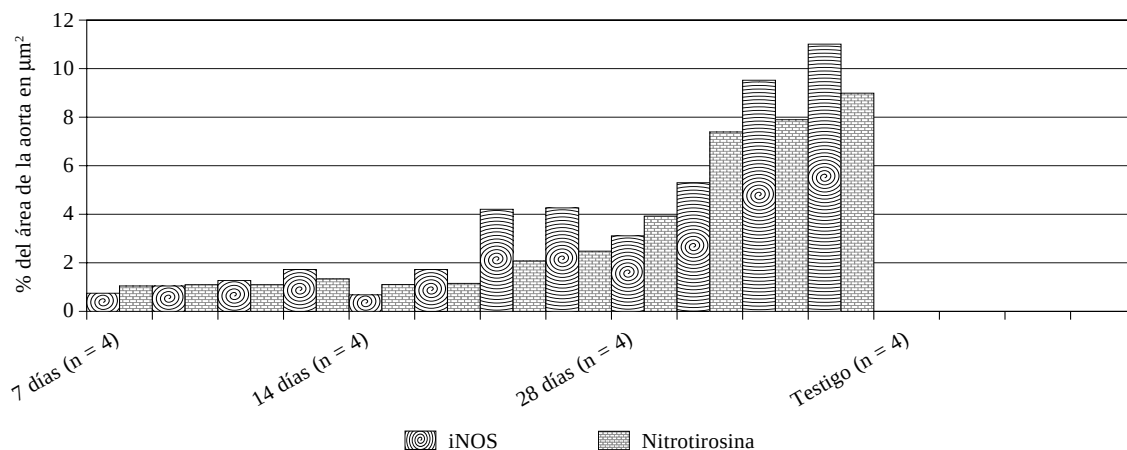


Figura 6. iNOS y nitrotyrosina en la exposición a ozono.

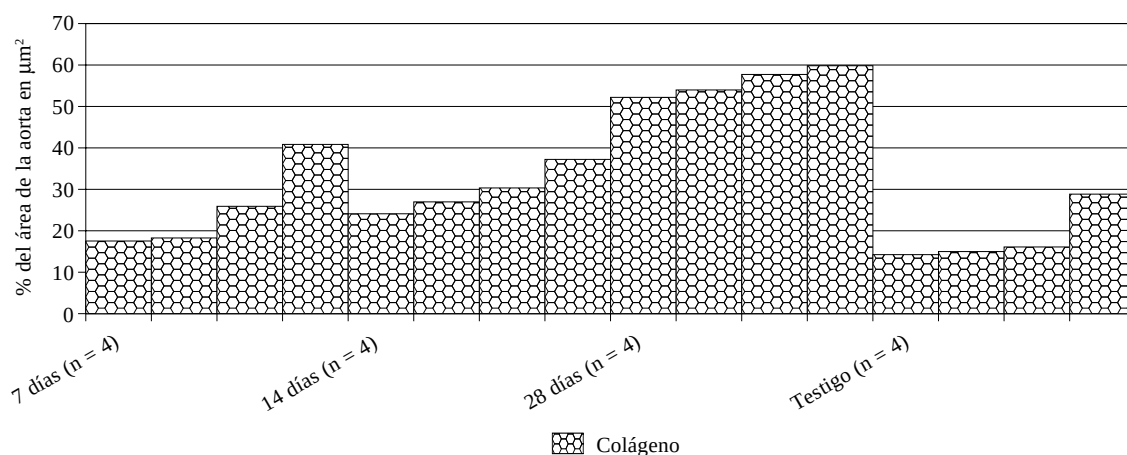


Figura 7. Colágeno de la aorta en los diferentes tiempos de exposición a ozono.

constituida por fibroblastos y fibras colágenas orientadas longitudinalmente, que se funden con el tejido conectivo laxo alrededor de los vasos.

La figura 8 A corresponde al grupo testigo. Se define claramente el límite de las capas media y adventicia por el colágeno intensamente teñido de azul.

Las figuras 8 B, C y D corresponden a siete, 14 y 28 días de exposición, respectivamente. Nótese el color azul “infiltrante” en las capas medias de manera progresiva a medida que aumenta el tiempo de exposición a O_3 , llegando a ocupar más de 50% a los 28 días de exposición. En todas las figuras se definen claramente las bandas de elastina teñidas de color rosa.

Resultados totales

La iNOS, nitrotyrosina y colágeno muestran un patrón similar de distribución en el tejido a medida que aumenta el tiempo de exposición a O_3 entre los grupos experimentales.

En el grupo testigo negativo a iNOS y nitrotyrosina, sólo se observa colágeno, ya que es parte fundamental del componente extracelular de la capa media de la aorta (Figura 9).

Por otra parte, el análisis estadístico muestra significancia mayor a la esperada en todas las variables estudiadas. Para el caso de la iNOS, la prueba de Kruskal-Wallis dio significancia de $p = 0.006$ (Cuadro 6).

Las comparaciones de la detección de iNOS entre grupos de exposición a O_3 dieron significancia estadística de $p < 0.05$ para todos los casos, excepto entre el grupo de siete y 14 días (Cuadro 7).

Se utilizó la gráfica de cajas con valores extremos (Box and Whisker) para representar estos datos en todas las variables estudiadas, ya que muestra los cuartiles 1-3 (Q1-3) y la dispersión de los resultados obtenidos. La gráfica que representa estos resultados para iNOS se muestra en la figura 10.

El análisis unilateral de variancia por rangos para nitrotyrosina dio significancia de $p = 0.004$ (Cuadro 8). Las comparaciones de la detección de nitrotyrosina entre grupos de exposición a O_3 dieron significancia estadística de $p < 0.05$ para todos los casos, excepto entre el grupo de siete y 14 días (Cuadro 9). La gráfica que representa estos resultados para nitrotyrosina se muestra en la figura 11. Nótese que tan-

to para iNOS como para nitrotirosina, la comparación entre grupos es idéntica.

El análisis unilateral de variancia por rangos para colágeno dio significancia de $p = 0.013$ (Cuadro 10).

Las comparaciones de la cantidad de colágeno en las capas medias de las aortas dieron $p < 0.05$ entre los animales expuestos de 28 días contra los otros grupos (Cuadro 11). La gráfica que representa estos resultados para colágeno se muestra en la figura 12.

Discusión

En este modelo se expusieron las ratas a 0.25ppm, que corresponde a índices 201-300 IMECA y EPA, clasificado como muy dañino a la salud. A estas dosis, se reco-

mienda que los niños y adultos activos y las personas con enfermedades respiratorias, tales como el asma, deben evitar cualquier esfuerzo al aire libre; también se observa aumento de molestias e intolerancia relativa al ejercicio en personas con padecimientos respiratorios.^{2-4,6}

La hipótesis planteada en el trabajo sugería tres consecuencias secundarias a la exposición a O_3 : inducción de la síntesis de óxido nítrico, nitración de proteínas y alteraciones morfológicas en la aorta de rata. Las tres se demostraron plenamente, además de que estos resultados concuerdan en parte con los reportados en otros trabajos, donde se logró detectar la presencia de iNOS por exposición a O_3 .¹¹⁻¹³

Los cambios en la concentración de colágeno de la capa media de la aorta en ratas expuestas y la detección de nitrotirosina en células endoteliales y musculares lisas, son hallazgos inhomovadores y no existen en la literatura internacional reportes parecidos en la aorta.

Se proponen dos mecanismos de activación de la iNOS en este modelo de ratas expuestas a O_3 : el primero, es por mecanismos de estrés oxidativo, y el segundo, por acción de citocinas como IFN- γ , ILs-1, 6, 10 y 11, EGF, PDGF, GM-CSF, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, oncostatina M, hormona del crecimiento, prolactina y por el factor estimulante de colonias 1. IL-4 por si sola no induce la expresión de iNOS, pero potencializa la acción del IFN- γ .³⁵

El NO producido junto con el O_2^- origina ONOO $^-$ a pH fisiológico. De esta manera se incrementa el efecto oxidativo y la inflamación generada por O_3 .^{21,25}

El endotelio produce IL-1 y GM-CSF, que por sí mismas pueden inducir la expresión de iNOS.³⁵ Los radicales libres, el NO y el peroxinitrito, son algunos de los mediadores que se han usado para evaluar la función endotelial.^{79-81,88,89} Este trabajo sugiere disfunción endotelial, porque se detectó nitrotirosina y cambios en la producción de la iNOS entre los grupos de exposición y el testigo.⁷⁶⁻⁸⁰

Adicionalmente, se observaron cambios morfológicos en la concentración y disposición de colágeno entre las fibras

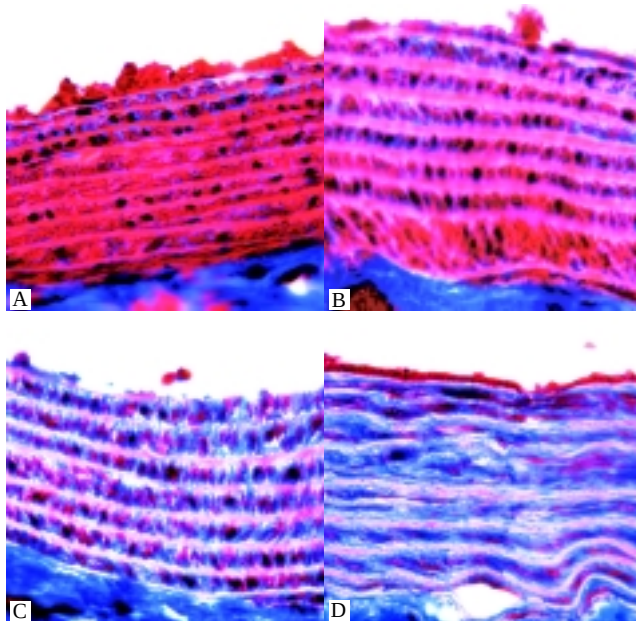


Figura 8 A-D. Concentración de colágeno en los diferentes tiempos de exposición a O_3 .

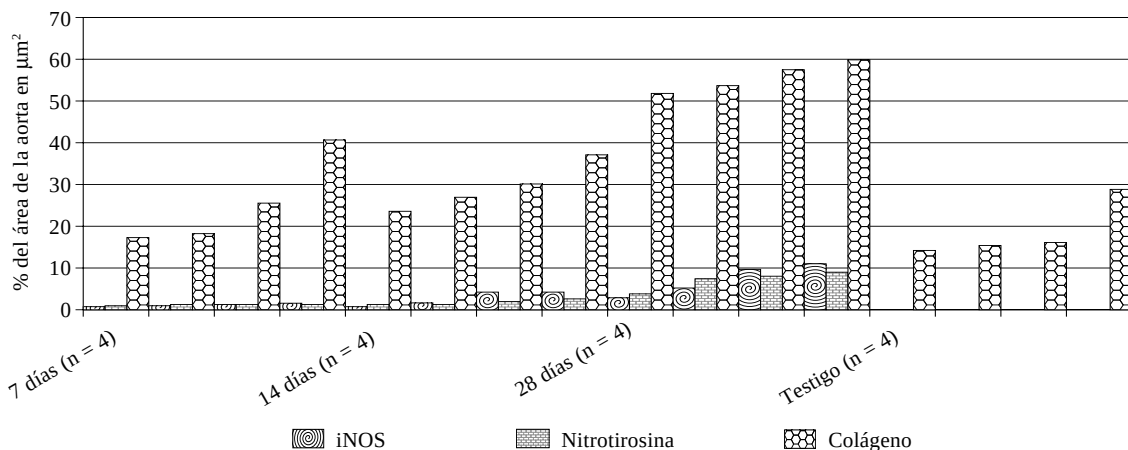


Figura 9. Representación gráfica de las variables estudiadas y su comportamiento en los diferentes tiempos de exposición a O_3 , resultados totales.

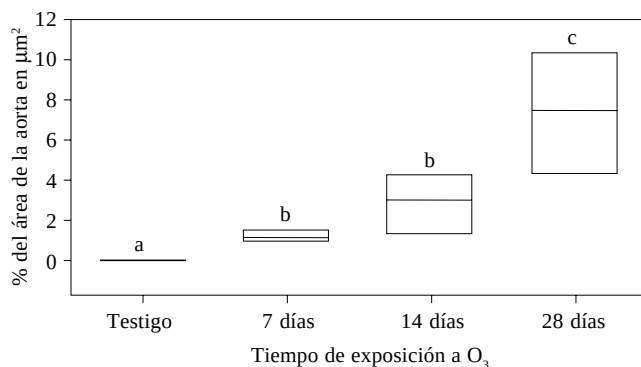
Cuadro 6. Análisis unilateral de variancia por rangos (iNOS). Prueba de Kruskal-Wallis.

Grupos	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75
Testigo	4	0.000	0.000	0.000
7 días	4	1.140	0.895	1.495
14 días	4	2.980	1.245	4.235
28 días	4	7.425	4.210	10.285

$\chi^2 = 12.360$ con tres grados de libertad ($p = 0.006$).

Cuadro 7. Comparaciones de la iNOS detectada entre grupos de exposición a O_3 y testigo. Método de Student-Newman-Keuls.

Comparación	Diferencia de rangos	$p < 0.05$
28 días vs. Testigo	46.000	Sí
28 días vs. 7 días	25.500	Sí
28 días vs. 14 días	16.500	Sí
14 días vs. Testigo	29.500	Sí
14 días vs. 7 días	9.000	No
7 días vs. Testigo	20.500	Sí

**Figura 10.** Detección de iNOS. Gráfica de cajas con valores extremos que muestra la dispersión de los porcentajes de área de las aortas, donde se detectó iNOS en cada uno de los periodos de exposición a O_3 y del grupo testigo. Cada caja muestra la mediana y los percentiles 25 y 75 del análisis unilateral de variancia por rangos realizado la prueba de Kruskal-Wallis. Índices diferentes implican $p < 0.05$.**Cuadro 8.** Análisis unilateral de variancia por rangos (Nitrotirosina). Prueba de Kruskal-Wallis.

Grupos	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75
Testigo	4	0.000	0.000	0.0150
7 días	4	1.140	1.090	1.235
14 días	4	1.650	1.160	2.280
28 días	4	7.665	5.420	8.420

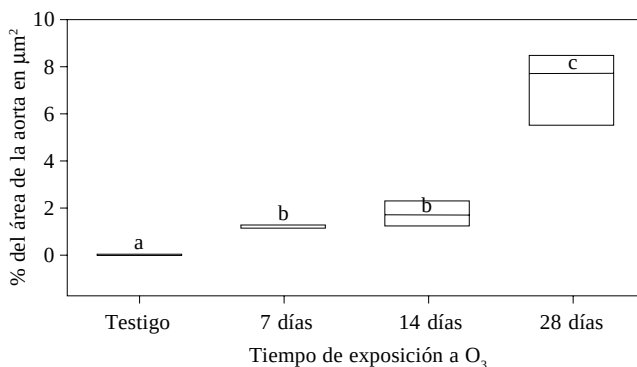
$\chi^2 = 13.156$ con tres grados de libertad ($p = 0.004$).

de elastina de la capa media de la aorta, dependiente del tiempo de exposición.

En esta investigación, se observó una estrecha relación entre los tiempos de exposición a O_3 y la detección de la

Cuadro 9. Comparaciones de la nitrotirosina detectada entre grupos de exposición a O_3 y testigo. Método de Student-Newman-Keuls.

Comparación	Diferencia de rangos	$p < 0.05$
28 días vs. Testigo	48.000	Sí
28 días vs. 7 días	28.000	Sí
28 días vs. 14 días	20.000	Sí
14 días vs. Testigo	28.000	Sí
14 días vs. 7 días	8.000	No
7 días vs. Testigo	20.000	Sí

**Figura 11.** Gráfica de cajas con valores extremos que muestra la dispersión de los porcentajes de área de las aortas donde se detectó nitrotirosina en cada uno de los periodos de exposición a O_3 y del grupo testigo. Cada caja muestra la mediana y los percentiles 25 y 75 del análisis unilateral de variancia por rangos realizado la prueba de Kruskal-Wallis. Índices diferentes implican $p < 0.05$.**Cuadro 10.** Análisis unilateral de variancia por rangos para colágeno con la prueba de Kruskal-Wallis.

Grupos	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75
Testigo	4	15.625	14.625	22.475
7 días	4	22.050	17.775	33.365
14 días	4	28.605	25.375	33.710
28 días	4	55.630	52.945	58.620

$\chi^2 = 10.743$ con tres grados de libertad ($p = 0.013$).

Cuadro 11. Comparaciones del contenido de colágeno entre los grupos de exposición a O_3 y testigo por el método de Student-Newman-Keuls.

Comparación	Diferencia de rangos	$p < 0.05$
28 días vs. Testigo	43.000	Sí
28 días vs. 7 días	30.000	Sí
28 días vs. 14 días	23.000	Sí
14 días vs. Testigo	20.000	No
14 días vs. 7 días	7.000	No
7 días vs. Testigo	13.000	No

iNOS, nitrotirosina y cambios morfológicos. Es importante destacar que estos datos indican que la generación de peroxinitrito puede ser uno de los mecanismos tóxicos del O_3 a nivel cardiovascular.

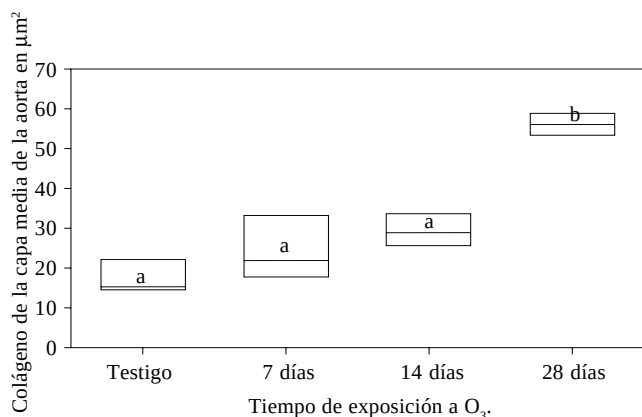


Figura 12. Gráfica de cajas con valores extremos que muestra la dispersión de los porcentajes de área del colágeno en las capas medias de las aortas de cada uno de los periodos de exposición a O₃ y del grupo testigo. Cada caja muestra la mediana y los percentiles 25 y 75 del análisis unilaterial de variancia por rangos realizado la prueba de Kruskal-Wallis. Índices diferentes implican $p < 0.05$.

Es claro que queda abierta la posibilidad de continuar con esta investigación para dilucidar los mecanismos exactos de cómo se genera esta respuesta inflamatoria en la pared vascular y, lo más importante, qué tan reversibles pueden ser estas alteraciones observadas.

La exposición a O₃ en zonas demográficas de riesgo incrementa las enfermedades cardiovasculares y respiratorias, con asociación directa a tasas de mortalidad elevadas. ¿Valdrá la pena controlar la contaminación ambiental?

Conclusiones

- En el modelo estudiado, se detectó iNOS en la aorta torácica de las ratas expuestas a O₃, lo que sugiere una relación directa entre el gas y la inducción de la enzima.
- En el modelo estudiado, se detectó nitrotirosina (indicador de la producción de O₃) en los animales expuestos a ozono.
- Se observaron cambios en la concentración total de colágeno de la capa media de la aorta torácica de la rata, en relación a la exposición a O₃, como se demuestra en los resultados.
- Se observó una estrecha relación entre los tiempos de exposición a O₃ y la detección de la iNOS, nitrotirosina y cambios morfológicos.
- Las áreas positivas para iNOS y nitrotirosina fueron las células endoteliales y musculares lisas de la aorta torácica de las ratas expuestas a O₃. Estas variables se comportaron de manera similar en todo el experimento, mostrando un patrón progresivo a medida que aumentaba el tiempo de exposición.
- La aorta torácica del grupo testigo no mostró cambios morfológicos, ni en la detección de iNOS o nitrotirosina.

Agradecimientos.

Este trabajo fue apoyado por el Departamento de Patología Experimental del INCMNSZ, Escuela Superior de Medicina del IPN, Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la EMGS y EMM, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, y Fundación Gonzalo Río Arronte IAP. Los animales de experimentación fueron donados por la Dra. Selva Rivas Arancibia, de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Referencias

1. Hartmann DL, Wallace JM, Limpasuvan MV, Thompson DW, Holton JR. Can ozone depletion and global warming interact to produce rapid climate change? *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1412-7.
2. <http://www.epa.gov>
3. Anderson HR, Ponce de Leon A, Bland JM, Bower JS, Emberlin J, Strachan DP. Air pollution, pollens, and daily admissions for asthma in London 1987-92. *Thorax* 1998; 53: 842-8.
4. <http://www.imeca.com.mx>
5. Martin J, Tobin. Chronic obstructive pulmonary disease, pollution, pulmonary vascular disease, transplantation, pleural disease, and lung cancer in AJRCCM 2000. Year in Review. *Am J Resp Crit Care Med* 2001; 164: 1789-804.
6. Gong H, Wong R, Sarma RJ, Linn WS, Sullivan ED, Shamoo DA, Anderson KR, Prasad SB. Cardiovascular effects of ozone exposure in human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 538-46.
7. Scheel LD, Dobrogorski OJ, Mountain JT, Svirbely JL, Stokinger HE. Physiologic, biochemical, immunologic and pathologic changes following ozone exposure. *J Appl Physiol* 1959; 14: 67-80.
8. Nightingale JA, Rogers DF, Chung KF, Barnes PJ. No effect of inhaled budesonide on the response to inhaled ozone in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 479-86.
9. Laskin DL, Sunil V, Guo Y, Heck DE, Laskin JD. Increased nitric oxide synthase in the lung after ozone inhalation is associated with activation of NF-kappa B. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 1175-8.
10. Kleeberger SR, Reddy SP, Zhang LY, Cho HY, and Jedlicka AE. Toll-like receptor 4 mediates ozone-induced murine lung hyperpermeability via inducible nitric oxide synthase. *L Cel Mol Physiol* 2001; 280: L326-333.
11. Cho HY, Zhang LY, Kleeberger SR. Ozone-induced lung inflammation and hyperactivity are mediated via tumor necrosis factor α receptors. *L Cel and Mol Physiol* 2001; 208: L537-46.
12. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1999; 54: 1061-9.
13. Van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1-9.
14. Christian DL, Chen LL, Scanell CH, Ferrando RE, Welch BS, Balmes JR. Ozone-induced inflammation is attenuated with multiday exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 532-7.
15. Jörres RA, et al. The effect of repeated ozone exposures on inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid and mucosal biopsies. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1855-61.
16. Pendino KJ, Gardner CR, Quinones S, Laskin DL. Stimulation of nitric oxide production in rat lung lavage cells by anti-Mac-1beta antibody: effects of ozone inhalation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14: 327-33.
17. Laskin DL, Sunil V, Guo Y, Heck DE, Laskin JD. Increased nitric oxide synthase in the lung after ozone inhalation is associated with activation of NF-kappa B. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 1175-8.
18. Chen Ch, Wang JK, Shwu-Bin Lin. Antisense oligonucleotides targeting protein kinase C- α , - β I, or - δ but not - η inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages: involvement of a nuclear factor κ B-dependent mechanism. *J Immunol* 1998; 161: 6206-14.

19. Brady TC, Chang LY, Day BJ, James DC. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF- κ B activation. *Am J Physiol* 1997; 273: L1002-6.
20. Spink J, Cohen J, Evans TJ. The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by Nuclear Factor - κ B. *J Biol Chem* 1995; 270: 29541-29547.
21. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329: 2002-12.
22. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 137-42.
23. Guo FH, Comhair SA, Zheng S, Dweik RA, Eissa NT, Thomassen MJ, Calhoun W, Erzurum SC. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J Immunol* 2000; 164: 5970-80.
24. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 10043-7.
25. Gunneth CA, Chu Y, Heistad DD, Loihl A, Frank MF. Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1998; 275: H416-21.
26. Bairoch A. The enzyme database in 2000. *Nuc Ac Res* 2000; 28: 45-8.
27. Enzyme nomenclature recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes, NC-IUBMB. New York: Academy Press; 1992.
28. Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Salvador Moncada. Constitutive and inducible nitric oxide synthase incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* 1991; 266: 23790-5.
29. Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Salvador Moncada. Cloning, characterization and expression of cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11419-23.
30. Chu SC, Wu HP, Banks TC, Eissa NT, Joel Moss. Structural diversity in the 5'-untranslated region of cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase mRNA. *J Biol Chem* 1995; 270: 10625-30.
31. Nathan Carl. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-33.
32. Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM, Choo EK, Chu SC, Joel M. Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA Tissue-specific regulation and induction by cytokines. *J Biol Chem* 1996; 271: 27184-7.
33. Ganster RW, Taylor BS, Shao L, David AG. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF- κ B complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8638-43.
34. Haque SJ, Flati V, Deb A, Williams BR. Roles of protein-tyrosine phosphatases in stat 1a mediated cell signaling. *J Biol Chem* 1995; 43: 25709-14.
35. Guo FH, et al. Interferon α and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. *J Clin Invest* 1997; 100: 829-38.
36. Zha H, et al. The rat athymic nude (rnu) locus is closely linked to the inducible nitric oxide synthase gene (Nos2). *Mam Gen* 1995; 6: 137-8.
37. Deng AY, Rapp JP. Locus for the inducible, but not a constitutive, nitric oxide synthase cosegregates with blood pressure in Dahl Salt sensitive rat. *J Clin Invest* 1995; 95: 2170-7.
38. Kreutz R, et al. Dissection of quantitative trait locus for genetic hypertension on rat chromosome 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8778-82.
39. Rivas AS, Colín BL, Dorado MC, Fortoul T. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Temas selectos de neurociencias II*, 2001; UAM-PUIS, Ed. Javier Velázquez Moctezuma, p. 351-74.
40. Pérez PL. Estrés oxidativo: la paradoja del oxígeno. *Rev Cub Endocrinol* 2000; 11: 139-42.
41. Shunichi K. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J Biol Chem* 2000; 275, 31: 23413-6.
42. Krunsh C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999; 85: 753-66.
43. Kristal B, Shurtz-Swirski R, Chezar J, Manaster J, Levy R, Shapiro G, Weissman I, Shasha SM, Sela S. Participation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 921-8.
44. Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10: 247-55.
45. Schultz D, Harrison DG. Quest for fire: seeking the source of pathogenic oxygen radicals in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1412-3.
46. Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol Chem* 2000; 275: 32460-6.
47. Crow JP, Beckman JS. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 17-43.
48. Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Rad Biol Med* 1998; 25: 392-403.
49. Zhang H, Squadrito GL, William AP. The mechanism of the peroxynitrite-carbon dioxide reaction probed using tyrosine. *Nitr Oxide* 1997; 1: 301-7.
50. Khan AU, Kovacic D, Kolbanovsky A, Desai M, Frenkel K, Geacintov NE. The decomposition of peroxynitrite to nitroxyl anion (NO-) and singlet oxygen in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2984-9.
51. Szabo C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *REVIEW. Nitr Oxide* 1997; 1: 373-85.
52. Pfeiffer S, Mayer B. Lack of tyrosine nitration by peroxynitrite generated at physiological pH. *J Biol Chem* 1998; 273: 27280-5.
53. Shigenaga MK, Lee HH, Blount BC, Christen S, Shigeno ET, Yip H, Ames BN. Inflammation and NO $_x$ -induced nitration: Assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3211-26.
54. Saleh D, Ernst P, Lim S, Barnes PJ, Giaid A. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEBJ* 1998; 12: 929-37.
55. Myatt L, Rosenfield RB, Eis AL, Brockman DE, Greer I, Lyall F. Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertens* 1996; 28: 488-93.
56. Wang P, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postschemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 1996; 271: 29223-30.
57. Kelm M, Dahmann R, Wink D, Feelisch M. The nitric oxide/superoxide assay. Insights into the biological chemistry of the NO/O $_2^-$ interaction. *J Biol Chem* 1997; 272: 9922-32.
58. Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green CJ, Motterlini R. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J* 1999; 339: 729-36.
59. David JL, Scalia R, Campbell B, Nossuli T, Hayward R, Salamon M, Grayson J, Lefer AM. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest* 1997; 99: 684-91.
60. Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, Radomsky, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 91: 12383-7.
61. Matés JM, Jiménez FS. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic process. *Front Biosc* 1999; 4: d339-45.
62. Tiskow DG. Free radicals in biology and medicine: a brief review. *Gac Cienc Vet* 1996; 2: 44-57.
63. Langer S. 10 antioxidants you can trust better. *Nut Mag* May 1998.
64. Fawcett DW. A textbook of histology. 12nd Ed. NY: McGraw-Hill Interamericana; 1995.

65. Cernudas MR, et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res* 1998; 83: 279-86.
66. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Clark HB, Ross E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 1996; 27: 1373-80.
67. Teng X, Zhang H, Snead C, Catravas JD. Molecular mechanisms of iNOS induction by IL-1 β and IFN- γ in rat aortic smooth muscle cells. *J Histochem Cytochem* 2002; 282: C144-52.
68. González FF, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase after endothelial denudation of the rat carotid artery. *Circ Res* 1998; 83: 1080-7.
69. De Meyer GR, Kockx MM, Cromheeke KM, Seye CH, Herman AG, Bult H. Periadventitial inducible nitric oxide synthase expression and intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1896.
70. Muniyappa R, Xu R, Ram JL, Sowers JR. Inhibition of Rho protein stimulates iNOS expression in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 2000; 278: H1762-8.
71. Sobey CG, Brooks RM, Heistad DD. Evidence that expression of inducible nitric oxide synthase in response to endotoxin is augmented in atherosclerotic rabbits. *Circ Res* 1995; 77: 536-43.
72. Yan Z, Sirsjo A, Piallat ML, Gabbiani G, Hansson GK. Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF- κ B activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2854.
73. Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV. I κ B Kinase- β : NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase- α and NIK. *Sci* 1997; 278: 886-69.
74. Yan ZQ, Hansson GK. Overexpression of inducible nitric oxide synthase by neointimal smooth muscle cells. *Circ Res* 1998; 82: 21-9.
75. Vincent JL, Zhang H, Szabo C, Preiser Ch. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1781-5.
76. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Antioxidants and Life Style. Journal* 2000.
77. Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Bauer JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEBJ* 2000; 14: 271-8.
78. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 61-74.
79. Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Bauer JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEBJ* 2000; 14: 271-8.
80. Carey RM, Jin XH, Wang ZQ, Siragy HM. Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT₂) angiotensin receptor. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 65-71.
81. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1629-4.
82. Yue TL, Wang X, Loudon CS, Gupta S, Pillarsetti K, Gu JL, Hart TK, Lysko PG, Feuerstein GZ. 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces apoptosis in endothelial cells and inhibits angiogenesis: possible role for stress-activated protein kinase signaling pathway and fas expression. *Mol Pharmacol* 1997; 51: 951-62.
83. Devlin RB, Raub JA, Folinsbee LJ. Health effects of ozone. *Sci Med* 1997; 8-17.
84. Laskin DL, Pendino KJ, Punjabi CJ, Rodríguez VM, Laskin JD. Pulmonary and hepatic effects of inhaled ozone in rats. *Env Health Persp* 1994; 102: 61-4.
85. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Rad Biol Med* 1995; 19: 935-41.
86. Laskin DL, Sunil V, Guo Y, Heck DE, Laskin JD. Increased nitric oxide synthase in the lung after ozone inhalation is associated with activation of NF- κ B. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 1175-8.
87. Shane B. Histology kits: avidin and biotin team up to tackle the tissue. *Scientist* 1998; 12: 25.
88. Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Baues JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEBJ* 2000; 14: 271-8.
89. Gupta MP, Steinberg HO, Hart M. H₂O₂ causes endothelial barrier dysfunction without disrupting the arginine-nitric oxide pathway. *Lung Cell Mol Physiol* 1998; 18: L508-16.
90. Schön T, Hernández PR, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Br J Dermatol* 2001; 145: 809-15.