



Óxido Nítrico: estudios sobre su papel como mediador en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas

Anna Beatriz Alfieri Grippo¹.

¹Doctorado en Farmacología Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. alfieria@camelot.rect.ucv.ve

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es una molécula única, con las características de neurotransmisor y con múltiples funciones en el organismo. Se sintetiza a partir de la L-arginina, originándose adicionalmente una molécula de L-citrulina, mediante una reacción catalizada por la sintasa del NO (NOS), de la cual se conocen 3 isoformas: dos constitutivas (cNOS) y una inducible (iNOS). La producción de iNOS es regulada transcripcionalmente: mientras que la forma cNOS es regulada en relación con su actividad. Por su naturaleza gaseosa, el NO difunde rápidamente (no se almacena); su vida media es extremadamente corta, por lo cual su cuantificación directa es difícil. El NO media efectos fisiológicos cuando es producido en bajas cantidades. Sin embargo, también está involucrado en actividades de citotoxicidad, cuando se genera en grandes cantidades. Estos aspectos son revisados y discutidos en el presente artículo, junto con el aporte original de nuestro grupo. Se incluyen estudios del NO y su papel fisiológico en la regulación de

la presión arterial, en la diabetes mellitus tipo 1 y en el ejercicio físico en pacientes. También se discute su rol en la fisiopatología de la inflamación neurogénica inducida por citotóxicos, en animales de experimentación.

PALABRAS CLAVE: Oxido nítrico, función endotelial, diabetes, inflamación neurogénica.

NITRIC OXIDE: STUDIES ABOUT ITS ROLE IN PHYSIOLOGICAL AND PHYSIOPATHOLOGICAL FUNCTIONS

SUMMARY

Nitric oxide (NO) is a unique molecule, with neurotransmitter properties and with many and important functions in the organism. It is synthesized from L-arginine, producing also a molecule of L-citrulline, in a reaction catalyzed by nitric oxide synthase (NOS), of which there are 3 known isoenzymes: two constitutives (cNOS) and one inducible (iNOS). The production of the iNOS is regulated by their expression in the cells, whereas the cNOS is regulated by its activity. As a consequence of its gaseous nature, NO diffuses rapidly (it is not stored); it has very short half-life and for this reason its direct quantification is very difficult. NO is involved in many physiological effects when it is produced in low quantities; also, when is generated in high concentration, it plays an important role in cytotoxicity and inflammation. These aspects are reviewed and discussed in this article, along with original contribution of our group, including studies about the role of NO in blood pressure control, diabetes mellitus and neurogenic inflammation.

KEY WORDS: Nitric oxide, endothelium, diabetes, neurogenic inflammation.

INTRODUCCIÓN

El Óxido Nítrico

Hace apenas 20 años hubiera sido difícil aceptar la hipótesis de que un gas tóxico ejerciera importantes funciones como mediador del metabolismo celular. Sin embargo, en la actualidad dicho concepto es una realidad, y el óxido nítrico (NO) se ha convertido en el protagonista de un área de creciente interés para fisiólogos, farmacólogos y neuroquímicos, entre otros, generándose sólo en el año 2002, unas 9000 publicaciones científicas. El NO es una molécula única, con las características propias de un neurotransmisor; tiene actividad vasodilatadora, estimulante de la síntesis de músculo liso vascular, antiagregante plaquetario, y está involucrado en la génesis de enfermedades como hipertensión, shock séptico, inflamación y demencia, entre otras (Vallance y Collier, 1994; Court y col., 2002).

Aunque el impacto sobre el conocimiento de la naturaleza y las propiedades del NO ha avanzado aceleradamente en las últimas década, el inicio real de la historia se remonta al siglo anterior, cuando compuestos como la nitroglicerina eran utilizados para el tratamiento de la angina de pecho. Aunque los científicos del siglo XIX sabían que la nitroglicerina era un explosivo potente, desconocían por completo lo que la convertía en un tratamiento eficaz para la angina; se aceptaba que de alguna forma, relajaba al músculo liso vascular, permitiendo que los vasos se dilataran y pudiera llegar un mayor flujo de sangre al corazón.

Pasaron más de 100 años y una apasionante serie de experimentos se inicia simultáneamente en varios laboratorios. En 1980, Furchgott y Zawadzki descubrieron que el endotelio desempeña un papel crucial en la respuesta vasodilatadora producida por acetilcolina (ACh), demostrando que

la misma no actúa directamente, sino que promueve la liberación de otra sustancia, denominada por ellos como "factor relajador derivado de endotelio" o FRDE. Aunque Furchgott sabía que el FRDE existía, no pudo aislarlo ni identificarlo. El descubrimiento del FRDE hizo que las investigaciones aumentaran súbitamente, con la contribución de numerosos grupos en todo el mundo trabajando en la búsqueda de la identidad de este factor.

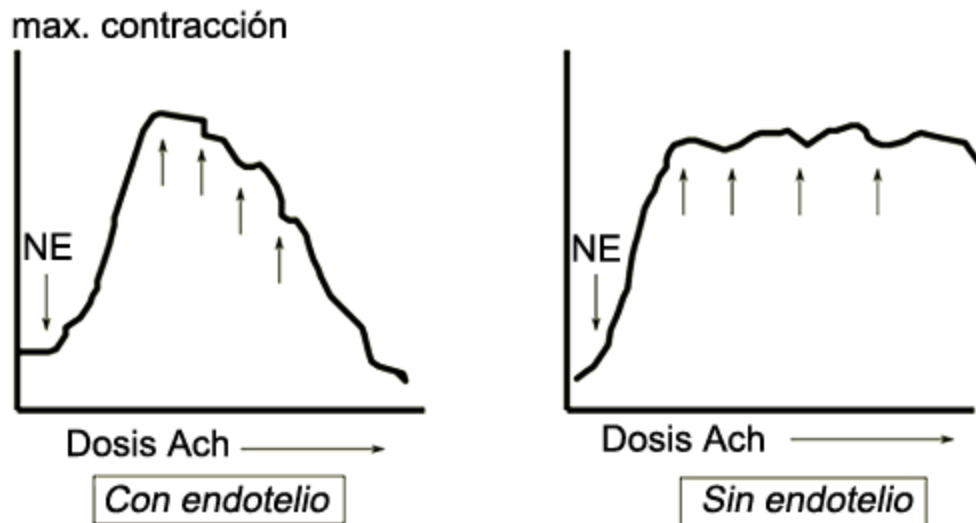


Figura 1
Furchgott y su grupo demostró que tiras de vasos sanguíneos necesitan tener el endotelio intacto para que puedan relajarse por acción de la acetilcolina (ACh) luego de contraerlas previamente con norepinefrina (NE) (Izquierda). Esto no ocurre si el vaso sanguíneo ha perdido su endotelio (Derecha) (Furchgott y Zawadzki, 1980).

Los experimentos decisivos que permitieron identificar al FRDE como NO fueron llevados a cabo de forma independiente por Ignarro, en la Universidad de Los Ángeles, por Furchgott en la Universidad del Estado de Nueva York y por Salvador Moncada en los Laboratorios Wellcome Research, en Inglaterra. Los tres investigadores descubrieron que tanto el NO como el FRDE compartían características comunes que apuntaban a una única identidad. En una conferencia científica, en julio de 1986, Ignarro y Furchgott presentaron de forma independiente sus resultados ante una audiencia escéptica, publicándolos posteriormente también por separado (Ignarro y col., 1987; Furchgott y col., 1987). Pocos meses después, Moncada zanjó la discusión con un importante artículo al que se ha hecho referencia frecuentemente, pues en el mismo se demostró claramente que el NO era producido por células endoteliales y que era sin dudas el FRDE (Palmer y col., 1987). En un comentario adjunto al artículo de Moncada se describían estos hallazgos como "la culminación de una de las sagas más interesantes en la fisiología y farmacología vascular".

Esta serie de resultados fue recibida con sorpresa en el campo biomédico, ya que era difícil de aceptar que un gas tóxico tuviera funciones regulatorias tan importantes; adicionalmente, en células de mamíferos no se conocía ninguna vía bioquímica que resultara en la producción de NO. Sin embargo, las evidencias experimentales fueron aclarando la situación; para entender completamente cómo funcionaba el sistema, los científicos aún tenían que demostrar la ruta de síntesis. La respuesta llegó al poco tiempo, con experimentos realizados por Moncada y su grupo, en células endoteliales vasculares, donde se demostró que el aminoácido L-arginina es el precursor de la síntesis del NO (Moncada y col., 1989).

Síntesis del Óxido Nítrico

Como ya se dijo, y debido a su naturaleza gaseosa, el NO tiene propiedades diferentes a las de cualquier otro neurotransmisor; esta entidad química no puede ser almacenada en el interior de vesículas para ser posteriormente exocitada. En consecuencia, cuando una célula produce NO, éste escapa a través de la membrana celular difundiendo a las proximidades. Esa misma propiedad de atravesar las membranas permite al NO afectar a otras células sin necesidad de receptores en la superficie. Se trata por tanto de una molécula-señal que puede ser liberada desde cualquier parte de la neurona (donde se encuentre la enzima de síntesis) y actuar sobre la misma célula que la produce o cualquier célula en las proximidades, que pueda responder a ella.

En la **Figura 2** se muestra un esquema de la síntesis de NO. En dicha reacción una molécula de L-arginina es transportada al interior de la célula endotelial por un transportador específico, generándose una molécula de L-citrulina y una molécula de NO; todo esto es catalizado por la enzima sintasa del NO (NOS) (Schmidt y col, 1988). Para la síntesis del NO, además del sustrato L-arginina, se requiere de la presencia de calmodulina y de 4 cofactores: mononucleótido de flavina (FMN), dinucleótido de flavin adenina (FAD), tetrahidrobiopterina (THB) y dinucleotido fosfato de nicotinamida adenina (NADPH). Esta reacción puede ser inhibida por derivados estructurales de la L-arginina, como la N-mono-metil-L-arginina (L-NMMA) y el metilester de N-nitro-L-arginina (L-NAME), entre otros.

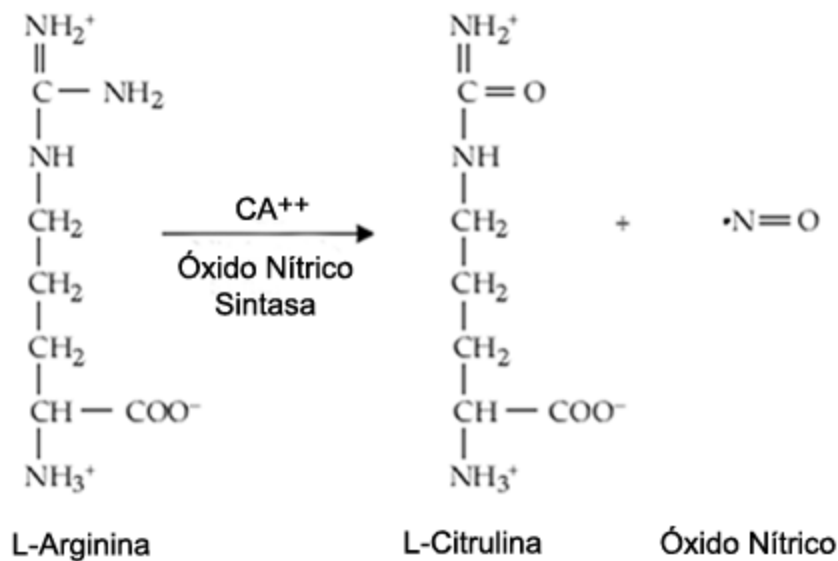
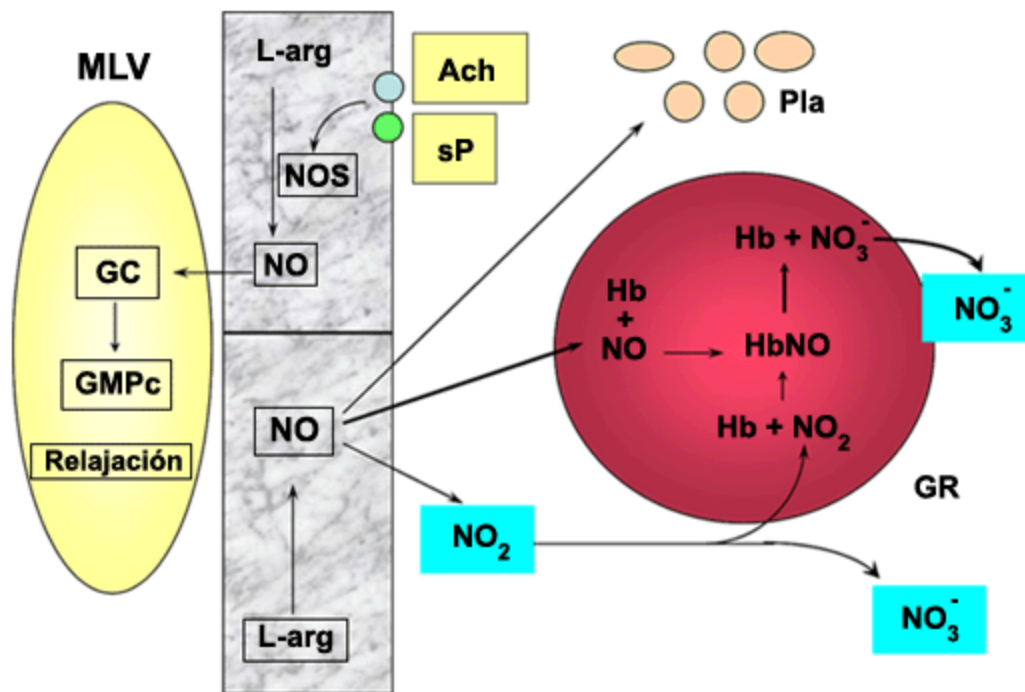


Figura 2
Síntesis del óxido nítrico, a partir de la L-arginina

El NO, a temperatura y presión atmosférica ambiente es un gas; y actúa como un soluto no cargado en la mayoría de los procesos biológicos (Yun y col., 1996). Al tener un electrón desapareado, se comporta como un radical libre y en consecuencia es muy reactivo; debido a esto tiene una vida media de segundos, y es capaz de combinarse con rapidez a otros radicales libres. Una vez liberado y ejercer sus efectos, se descompone para producir dos metabolitos estables, los radicales nitrito y nitrato, en una reacción que puede ser catalizada por metales de transición, incluyendo al hierro.



MLV: músculo liso vascular; **Pla:** Plaquetas; **GR:** Glóbulo Rojo

● Receptor de Ach

● Receptor de sustancia P

Figura 3

El NO liberado desde su sitio de síntesis, en este caso, el endotelio, difunde rápidamente hacia el músculo liso adyacente. Una vez ejercido su efecto o antes de esto, puede difundir hacia la sangre y unirse a otras moléculas, como el grupo Heme de la hemoglobina, o ser metabolizado a nitratos y nitritos.

Sintasas del Óxido Nítrico (NOS)

Debido a las características del NO, esta molécula no puede ser almacenada; debido a esto, la regulación de la enzima que cataliza su síntesis es muy importante; de hecho, la sintasa del NO (NOS) está regulada más estrechamente que cualquier otra enzima en la vía de síntesis de neurotransmisores.

Hasta el momento, han sido identificadas tres isozimas de la NOS, constituidas por subunidades homodiméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 Kda (Knowles y Moncada, 1994). Las tres isoformas están codificadas en tres genes, localizados en tres cromosomas diferentes. La nomenclatura de las NOS se ha prestado a confusión; actualmente se utiliza la aceptada por la Unión Internacional de Farmacólogos (IUPHAR, en inglés) (Moncada y col, 1997), la cual se resume en la Tabla 1.

Nomenclatura Numérica	Nomenclatura Descriptiva	Características
NOS1	c-NOS (constitutiva o regulada por Calcio) b-NOS (de cerebro) bc-NOS(constitutiva cerebral) n-NOS (neuronal)	- Se expresa constitutivamente - Su actividad está regulada por calcio. - Prototipo presente en neuronas - Produce cantidades bajas (pmol) de NO, que

	cn-NOS (constitutiva neuronal)	cumple funciones de señalización celular.
NOS2	i-NOS (inducible) mac-NOS (de macrófagos) hep-NOS (de hepatocitos)	- Es inducida por citocinas - Su actividad es independiente de calcio. - Prototipo presente en macrófagos de murinos. - Produce cantidades altas (μmol) de NO que cumple funciones citotóxicas, citostáticas o citoprotectoras.
NOS3	c-NOS (constitutiva o dependiente de calcio). Esta nomenclatura se superpone con la de NOS1). e-NOS (endotelial) ec-NOS (endotelial constitutiva)	- Se expresa constitutivamente - Su actividad está regulada por calcio. - Prototipo presente en neuronas - Produce cantidades bajas (pmol) de NO, que cumple funciones de señalización celular.

Tabla 1: Nomenclatura y características generales de las NOS.
(Moncada y col., 1997).

Las 3 isoformas reconocidas son:

1. Dos isoformas constitutivas (cNOS) ambas dependientes de calcio: la isoforma endotelial (eNOS), también conocida como tipo III (NOS3) y la isoforma neuronal (nNOS), también denominada tipo I (NOS1). Dichas isoformas median la producción de NO en cantidades bajas y fisiológicas, para actuar como señalizador molecular (Moncada y col., 1997).
2. Una forma inducible (iNOS), independiente de calcio, también denominada de tipo II (NOS2), cuya expresión puede ser inducida en diferentes tipos de células, tales como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso y endotelio; dicha inducción se produce como respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como: el interferón gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Esta isoforma cataliza la producción de gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares (Moncada y col., 1997).

Las tres isoformas de la NOS contienen un dominio carboxi-terminal homólogo al citocromo P450, con una flavina como grupo prostético, y un dominio amino terminal con un grupo heme como grupo prostético. Estos dominios terminales están conectados por un tercer dominio, que es afín a calmodulina. La unión de la calmodulina a la NOS parece ser el "interruptor molecular" que permite el flujo de electrones desde el dominio reductasa hacia el grupo heme, permitiendo la transformación del O₂ y L-arginina en NO y L-citrulina (Kelly y col., 1996). Las isoformas constitutivas NOS1 (nNOS) y en la NOS3 (eNOS) se encuentran inactivas hasta que aumenta el

calcio intracelular. Por ejemplo, en las células endoteliales, la ACh, la bradiquinina, el ADP o el estrés de roce son capaces de iniciar la señal que incrementa el calcio celular, el cual regula la unión de calmodulina a su dominio, iniciando la síntesis de NO. Cuando la calmodulina se une a la enzima, los electrones donados por el NADPH fluyen desde el dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa y son aceptados por el citocromo C y otros aceptores de electrones.

En contraste, en la isoforma inducible (NOS2, o independiente de calcio), la calmodulina permanece fuertemente unida, aún a bajas concentraciones de calcio, actuando esencialmente como una subunidad mas (Kelly y col., 1996). En este caso, los electrones donados por el NADPH son transportados por el FAD y por FMN hacia el grupo heme. En estas condiciones, la iNOS cataliza la producción de una mezcla de aniones superóxido (O_2^-) y de NO en altas cantidades, produciendo peroxinitritos ($ONOO^-$), con capacidad para producir citotoxicidad. En ausencia de THB, la NOS genera H_2O_2 , O_2^- y NO (Ferrer y col., 1998; Moncada y col., 1997)

Se ha demostrado que la NOS de macrófagos es inducible. Los macrófagos no estimulados no tienen la enzima, pero la activación de la célula se acompaña de la aparición irreversible de la enzima iNOS. Es decir, la producción de la iNOS es regulada transcripcionalmente (presencia o ausencia); mientras que la forma cNOS (presente, por ejemplo en endotelio vascular) es regulada en relación con su actividad (siempre está presente, pero puede estar mas o menos activa). Este programa de activación es el más importante, pero no es el único. Se sabe que las células musculares lisas también contienen pequeñas cantidades de iNOS. La activación crónica de las células endoteliales puede incrementar la síntesis de dicha isoforma e incrementar la síntesis total de NO (Gosgnach y col, 1999). Por ejemplo, este evento puede ocurrir durante el entrenamiento físico crónico, donde el flujo sanguíneo elevado es un estímulo frecuente que favorece la expresión de la cNOS endotelial.

La enzima constitutiva endotelial (eNOS) tiene un sitio de miristilación, capaz de unirse a un ácido graso. Esto le permite asociarse a la membrana lipídica de las células, a diferencia de las otras isoformas, que no tienen este brazo lipídico, y en consecuencia, son hidrosolubles y se encuentran libres en el citoplasma. Se cree que la asociación de la eNOS a la membrana facilita que el NO formado esté más cercano al exterior celular y en consecuencia difunda más rápidamente hacia la sangre y hacia el músculo liso adyacente (Gosgnach y col., 1999).

El NO sintetizado por la vía constitutiva ejerce sus diferentes efectos mediante su interacción con el centro heme de la guanilato ciclasa soluble; esta activación induce un incremento del $GMPC$. La isoforma inducible de la NOS esta ausente de macrófagos y hepatocitos, pero cuando estas células son activadas por citocinas, la iNOS se expresa, produciendo grandes cantidades de NO que forma entidades muy reactivas y capaces de inactivar enzimas que contienen metales de transición, como ciertas enzimas mitocondriales (Vallance y Collier, 1994). Actualmente la iNOS es considerada como parte del sistema inmune (Hibbs, 1991).

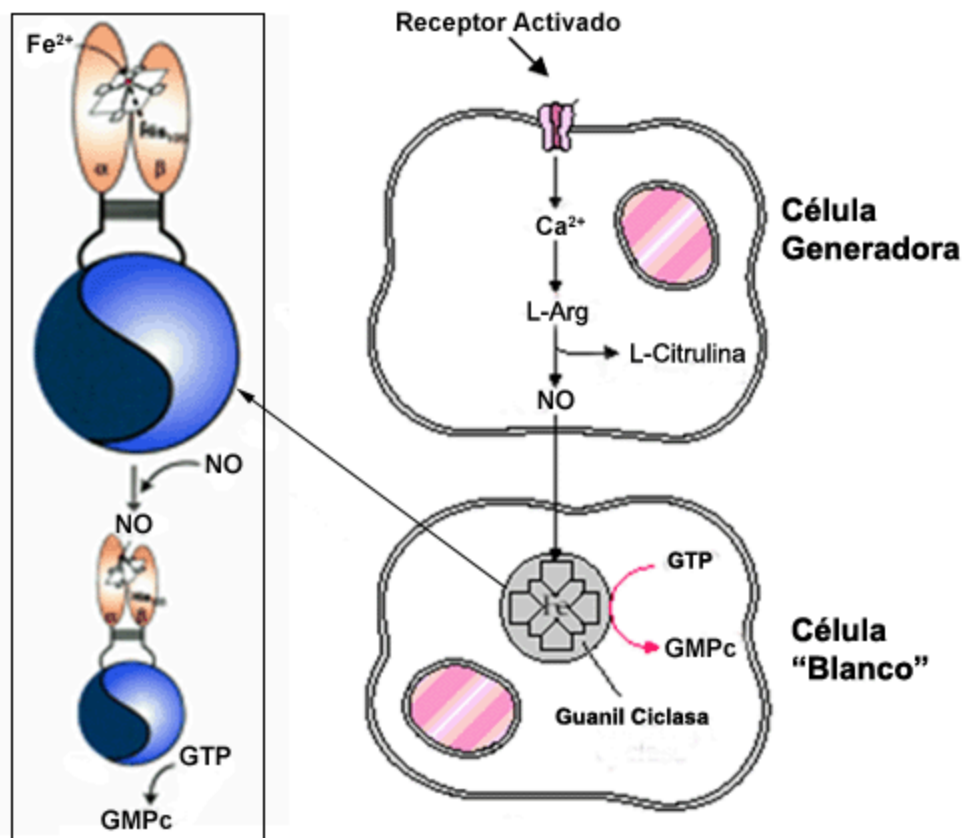


Figura 4

La guanil ciclasa soluble es un heterodímero que posee un grupo Heme con hierro ferroso (Fe^{2+}) pentasociado. El NO activa la GC soluble. La finalización se produce por la disociación del NO de su posición en el grupo heme. Como resultado, se produce liberación de GMPc, el cual actuará como segundo mensajero.

Blancos moleculares del Óxido Nítrico

Como ya fue mencionado, el NO tiene muchos "blancos moleculares" o sitios de unión. Es capaz de ligarse covalentemente al grupo heme de diversas proteínas; interactúa con radicales libres para formar peroxinitritos; interactúa con átomos de hierro o de cobre, presentes en enzimas; se une a grupos tioles libres de varias proteínas y así puede ser transportado. De todos esos sitios potenciales de unión del NO, el más importante en el sistema cardiovascular es el grupo heme de la guanilato ciclasa soluble. Dicha unión causa un desplazamiento alostérico de grupos histidina y un cambio conformacional en la enzima, activándola para producir GMPc (Michel, 1999).

Las células musculares lisas contienen una fosfodiesterasa V, específica para el GMPc. Esto activa a una protein quinasa dependiente de GMPc, llevando a la extrusión de calcio desde el citoplasma, por medio de una bomba calcio/magnesio ATPasa y la consecuente relajación del músculo liso (Dusting, 1995). Los medicamentos nitrovasodilatadores actúan de modo similar, ya que son metabolizados a moléculas donadoras de NO, produciendo la serie de eventos que producen vasodilatación (Dusting, 1995).

Inhibidores de las Sintetasas del Óxido Nítrico

Un punto clave para el descubrimiento de las funciones fisiológicas del NO fue el hallazgo de que análogos de L-arginina actúan como inhibidores específicos y competitivos de la NOS. El primer compuesto con estas características a ser identificado fue un derivado metilado simple de dicho aminoácido, la NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), el cual fue inicialmente utilizado

en estudios de acciones citotóxicas de macrófagos activados, mucho antes de que se descubriera que el NO participa en dicho proceso (Hibbs y col., 1990). Ha sido descubierto un gran número de análogos de la L-arginina que inhiben la actividad de la NOS, algunos con actividad irreversible o con capacidad de inhibir tanto a la isoforma inducible como a la constitutiva; en la Tabla 2 se muestran los mas representativos y comúnmente utilizados (Moncada y col, 1991; Moncada y col., 1999).

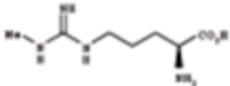
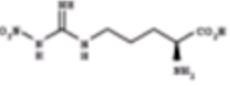
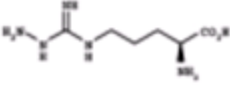
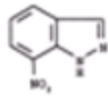
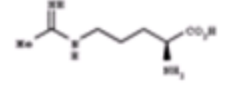
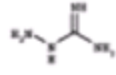
Nombre	Abreviación	Estructura	Selectividad
N -monomethyl-L-arginine	L-NMMA		nNOS = eNOS > iNOS
N -nitro-L-arginine	L-NA		nNOS = eNOS >> iNOS
N -amino-L-arginine	L-NAA		nNOS = iNOS > eNOS
7-nitroindazole	7-NI		nNOS = eNOS = iNOS
N- iminoethyl-L-omithine	L-NIO		iNOS > eNOS = nNOS
Aminoguanidine			iNOS > eNOS = nNOS

Tabla 2: Diferentes Inhibidores de las isoformas de la NOS.

Cuantificación del NO en fluidos biológicos

Al ser el NO una molécula tan elusiva y que reacciona rápidamente con otros elementos, su cuantificación directa en fluidos biológicos no ha sido sencilla; se prefiere su cuantificación indirecta, lo cual puede lograrse al medir sus metabolitos en orina o en plasma. Hoy en día se acepta que prácticamente todos los nitratos y nitritos plasmáticos y/o urinarios en el humano se derivan de la ruta L-arginina/NO (Rhodes y col., 1995); sin embargo, para que esto sea cierto, deben tomarse las siguientes precauciones:

1. restricción dietética de fuentes exógenas de nitritos, como enlatados, derivados cárnicos, embutidos, lechugas. Esto debe ser seguido por un mínimo 72 horas antes de la toma de la muestra.
2. Ausencia de infección bacteriana urinaria, ya que muchas bacterias pueden producir nitritos como productos de su metabolismo. Esto debe constatare mediante un examen de orina
3. Ausencia de inflamación activa. Debe evitarse la cuantificación de nitratos + nitritos en sujetos con infecciones sistémicas, cuadros virales o asmáticos.

Adicionalmente y debido a que el GMPc es el mediador final de la producción del NO, se ha determinado que su cuantificación podría considerarse, bajo algunas circunstancias específicas, como otra forma de medición indirecta de la producción del NO (Gosgnach y col., 1999).

ÓXIDO NÍTRICO, ENDOTELIO Y FUNCIÓN CARDIOVASCULAR

El endotelio es un órgano ampliamente distribuido en el organismo, con un peso aproximado de 1.5 kg. y que está profundamente involucrado en múltiples funciones, sintetizando, metabolizando y liberando un número de sustancias que ejercen efectos de modo autocrino, paracrino, o epicrino (Bassenge, 1996). Entre dichas sustancias se destaca el NO, por su papel central y fundamental en varias funciones endoteliales, tales como la regulación del tono vasomotor, la inhibición de la actividad plaquetaria, el mantenimiento del balance entre los procesos de trombosis y fibrinólisis y la regulación del reclutamiento de células inflamatorias dentro de la pared vascular (Vallance y Collier, 1994; Court y col., 2002).

Como ya se explicó, el NO y otros factores endoteliales son continuamente sintetizados y liberados a un nivel denominado "basal"; adicionalmente pueden liberarse en mayor cantidad como consecuencia de la acción de desencadenantes locales o circulantes (bradikinina, serotonina, norepinefrina), mediante un proceso de comunicación bioquímica y endocrina; adicionalmente el endotelio responde a señales hemodinámicas, como el incremento del estrés de roce producido por el aumento de la velocidad del flujo sanguíneo; este efecto se observa, por ejemplo, durante la realización de ejercicio, induciendo cambios agudos y crónicos en la producción y liberación de NO (Lamontagne y col., 1992; Nishida y col., 1992), aspecto que será discutido mas adelante.

La alteración del funcionamiento normal del endotelio se ha denominado "disfunción endotelial" y está claramente presente en la hipertensión arterial y en la aterosclerosis, y ha sido implicada en otras patologías como la isquemia miocárdica en pacientes con enfermedad coronaria estable, en el síndrome coronario inestable (López-Jaramillo y col., 1995), y en la diabetes mellitus (Wu y Meininger, 1995). También se ha demostrado que, en ausencia de una función endotelial intacta, o inclusive durante el proceso normal de envejecimiento, la capacidad de sintetizar y liberar NO y otros autacoides endoteliales se ve disminuida, y en consecuencia la capacidad de vasodilatar las arterias se reduce (Vanhoutte, 1991; Rajj, 1991).

Se sabe que los incrementos de la presión arterial, bien sean agudos o crónicos producen, entre otras cosas, deterioro del endotelio y cambios morfológicos de la íntima arterial (Luscher y Noll, 1995); durante la hipertensión crónica se produce crecimiento del endotelio hacia el lumen y el engrosamiento del espacio subendotelial; esto podría reducir el acceso del NO derivado del endotelio hacia el músculo liso vascular, lo cual produciría mas hipertrofia e hipertensión (Berrazueta, 1995). Bien sea que el deterioro endotelial sea un fenómeno primario o secundario, está claro que exacerba las anomalías vasculares y contribuye de modo inequívoco a la patogénesis de la hipertensión.

Son clásicos los experimentos en los cuales al interferir con la síntesis o la acción del NO se logra un incremento de la PA en animales (Breslow y col., 1993; Brady y col., 2002) o en humanos (Gardiner y col., 1990; Vallance, 1998; Huynh y Tayek, 2002) (FIGURA). La inhibición crónica de la producción de NO rápidamente conduce a todas las consecuencias orgánicas de una hipertensión arterial severa, con arteriosclerosis y pérdida de vascularidad en SNC y en riñón (Moncada y col., 1991; Calver y col., 1993; Moncada y Higgs, 1993).

En la clínica, se ha demostrado que existen menores niveles de NO en sujetos normotensos que son hijos de individuos hipertensos (Taddei y col., 1996). Esto sugiere que algún paso del proceso

de síntesis o de liberación del NO estaría en parte regulado genéticamente, explicando la causa del mayor riesgo cardiovascular en sujetos con hipertensión familiar. Por otra parte la hipertensión arterial se asocia con otros factores de riesgo, tales como la dislipidemia (MacMahon y col., 1985), la resistencia insulínica (hiperinsulinemia) (Hanson y col., 2002) y la sensibilidad a la sal (Weinberger, 1991).

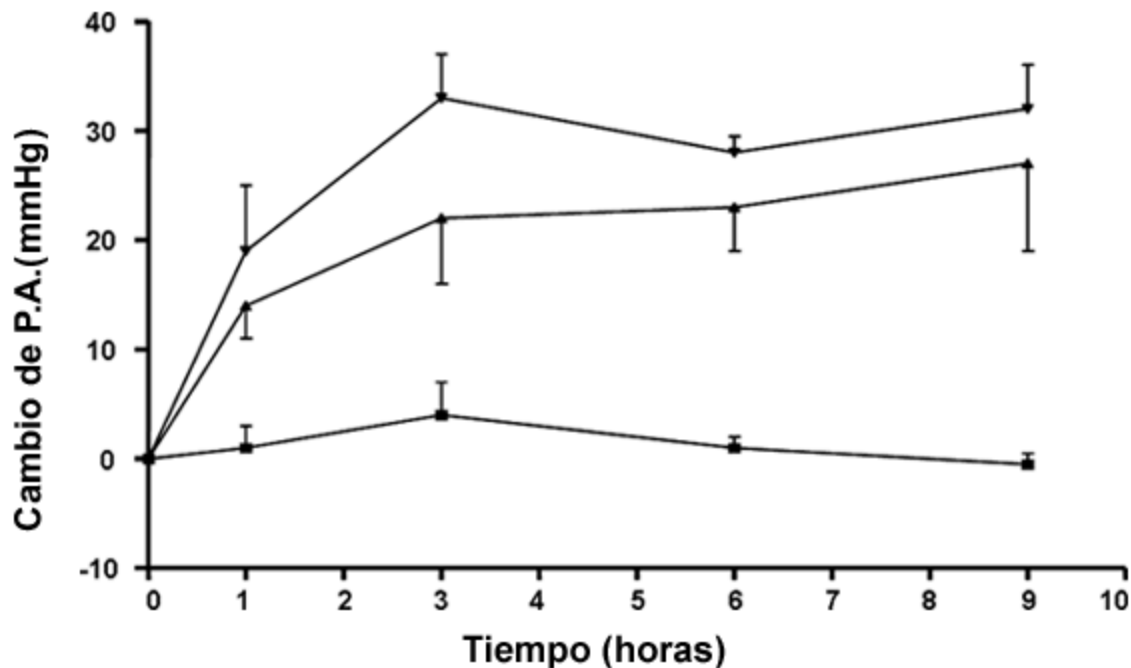


Figura 5
La presión arterial de animales aumenta de manera dosis dependiente al recibir un inhibidor de la síntesis de NO.

Es importante destacar que la mayoría de los factores de riesgo, como los mencionados anteriormente, no producen síntomas llamativos en los sujetos que los padecen, lo cual dificulta su detección precoz. Por este motivo es necesario informar y educar a la población acerca de la importancia de la prevención, detección temprana y tratamiento adecuado de los factores modificables que incrementan el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular o metabólica. Con esta finalidad, entre otras, se funda el "Centro para la Detección y Tratamiento de Factores Silentes de Riesgo Cardiovascular y Metabólico" (SIL-DETECT), en la Unidad de Farmacología Clínica, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central Venezuela. Entre los objetivos del estudio, actualmente en desarrollo, se encuentra el de determinar la proporción de sujetos cuya presión arterial sufre cambios según su ingesta de sal (sensibilidad a sal) en una población venezolana adulta aparentemente sana y estudiar, en dichos sujetos, la posible relación entre la sensibilidad a la sal y la producción de NO; los resultados de este estudio se discuten en breve (Cubeddu y col., 2000).

Cambios de la presión arterial en relación con la ingesta de sal: papel del NO

Desde hace medio siglo se conoce la relación directa entre el consumo de sal, el incremento de la presión arterial y el riesgo de enfermedad cardiovascular (Dahl, 1957; Dahl, 1960). Diferentes estudios epidemiológicos han comparado los niveles de presión arterial sistólica en poblaciones con ingestas bajas y altas en sal. Los resultados han demostrado que existe una mayor incidencia de hipertensión arterial, así como de morbilidad y mortalidad cardiovascular, en poblaciones que consumen alta cantidad de sal (Page y col., 1974; Stamler y col., 1978; MacMahon y col., 1990).

Varios estudios de migración apoyan dichos resultados. Por ejemplo, los sujetos provenientes de poblaciones con dietas tradicionalmente bajas en sal experimentaron incrementos significativos de sus cifras tensionales al migrar a zonas urbanas donde su ingesta de sal fue mayor y comparable a la de los países occidentales (Forte y col., 1989; Carvalho y col., 1989).

Cerca de un 50% de los pacientes con hipertensión arterial y de un 30% de los sujetos normotensos, parecen ser sensibles a los cambios en la ingesta de sal (o "sal sensibles", SS). Esta sensibilidad se manifiesta como aumentos de su presión arterial media (PAM) de al menos 10 mm Hg. durante una dieta de sal de 200 mEq/d (alta sal) en comparación con su PAM durante una dieta de solo 10-20 mEq/d de sal (baja sal). Por otra parte, se considera que un sujeto es "sal resistente" (SR) cuando su PAM experimenta cambios menores de 3 mm Hg al ser sometido a una dieta alta en sal, como la antes descrita (Campese, 1994; Morimoto y col., 1997). Es un hecho que, en comparación con los sujetos hipertensos-SR, los individuos hipertensos-SS tienen mayores incrementos de presión arterial con la edad (Weinberger y col., 1991), tienen una mayor incidencia de hipertrofia ventricular izquierda y de microalbuminuria (Bigazzi y col., 1994; Morimoto y col., 1997; Musiari y col., 1999), así como mayores niveles de marcadores de lesión endotelial (Ferri y col., 1988) y de eventos cardiovasculares fatales y no fatales (Morimoto y col., 1997).

A pesar del interés en el área y de su importancia clínica, aún no conocen con certeza los factores determinantes de la sensibilidad a la sal en humanos, y las implicaciones del NO en la aparición de la misma. Han sido publicados algunos estudios realizados en animales de experimentación, en los cuales se había demostrado que el NO juega un papel importante en el control de la excreción de sodio y en la hemodinamia renal (Ikenaka y col., 1993; Patel y col., 1994; Bech y col., 1998). Por ejemplo, en ratas obesas Zucker, se había demostrado un aumento en los niveles de NO en la médula renal al incrementar la presión de perfusión renal. Ellos concluyeron que dichos incrementos del NO permiten la eliminación del sodio sin cambios importantes de la presión arterial. Este sería uno de los motivos por los cuales dichos animales producen menor cantidad de NO medular, lo cual podría ser responsable de su sensibilidad a la sal. Paralelamente, dichas ratas mejoraron su resistencia a la insulina después de ser tratadas con troglitazona. Esta mejoría estuvo acompañada por una reducción de la presión arterial y de la sensibilidad a la sal, y por un aumento en la producción de NO en la médula renal (Fujiwara y col., 1998). En concordancia, ya otros grupos habían demostrado previamente que la administración de L-arginina a ratas SS previene el desarrollo de hipertensión arterial y reduce la respuesta hipertensora a la sal (Chen y Sanders, 1991; Patel y col., 1994).

Esta evidencia experimental indica que una producción alterada de NO puede estar asociada a sensibilidad a la sal, por lo cual en SIL-DETECT evaluamos el efecto de dietas altas y bajas en sodio sobre la producción endógena de NO en sujetos SS y en sujetos SR (Cubeddu y col, 2000). En dicho estudio se incluyeron 89 sujetos aparentemente sanos que asistieron al SIL-DETECT, a los cuales se les evaluó su sensibilidad a la sal y la excreción de metabolitos del NO. Una vez realizada la prueba de sensibilidad a la sal, se seleccionaron del total a los sujetos Sal-Sensibles (N=23) y a los Sal-Resistentes (N=25).

Determinación de sensibilidad a la sal:

- Los sujetos fueron sometidos durante 7 días a una ingesta elevada de sodio (200 mEq/día). Durante los siguientes siete días, los sujetos siguieron una dieta con restricción severa de

sodio (20-40 mEq/día).

- Antes de iniciar la dieta y en 7° día de ambas dietas, los pacientes volvieron al Centro para los procedimientos siguientes: medición de la presión arterial sistólica (PAS), de la presión arterial diastólica (PAD), de la frecuencia cardiaca (FC), obtención de orina de 24 horas para la cuantificación posterior de nitratos + nitritos y de creatinina urinaria. El cumplimiento de la ingesta alta o baja en sodio fue corroborada al cuantificar el sodio urinario al final de cada periodo de siete días.
- Según los cambios en las cifras de PA registradas después de la ingesta elevada o restrictiva de sal, los pacientes eran clasificados como SS o SR, siguiendo los criterios anteriormente explicados. De la población estudiada, 23 resultaron ser SS y 25 resultaron ser SR. El resto de los sujetos era clasificado como “sal intermedio” (SI), con cambios en su PAM que oscilaron entre 4 y 9 mm de Hg, al pasar de una dieta alta a una baja en sal.

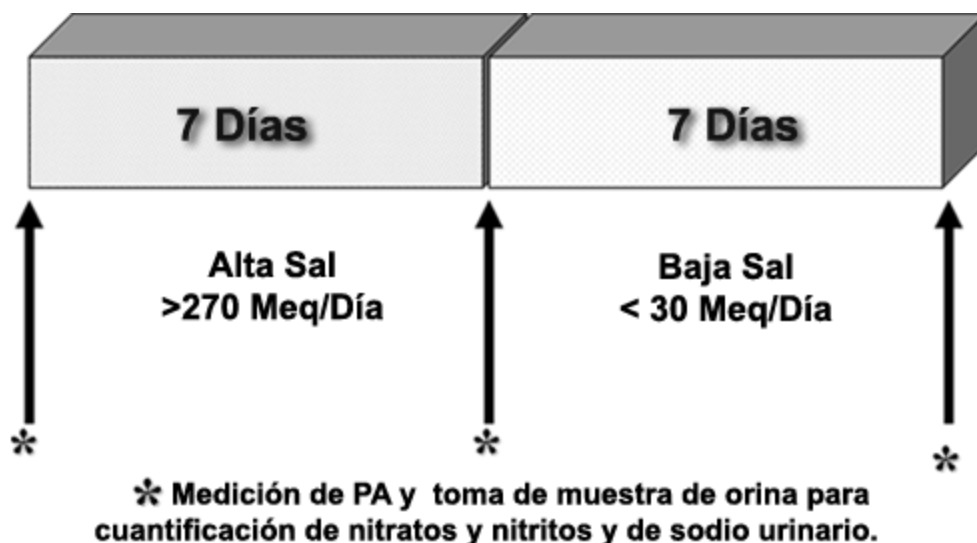


Figura 6
Representación esquemática de la prueba de Sensibilidad a la sal.
 Los sujetos siguen durante 7 días a una dieta con alto contenido de sodio (200 mEq/día). A continuación, y durante los siguientes 7 días, siguen una dieta con restricción severa de sodio (20-40 mEq/día). Los cambios de PAM entre las dietas alta y baja en sodio permite clasificar a sujeto en Sal-Sensible (>10 mm Hg) o Sal-Resistente (<3 mm Hg).

Cuantificación de nitritos y nitratos:

Se utilizó el método de Phizackerly y Al Dabbagh (1983), modificado en nuestro laboratorio. Brevemente, el día el ensayo las proteínas presentes en las muestras de orina son precipitadas con ZnSO₄. Posteriormente, los nitratos urinarios son transformados a nitritos mediante reducción química con perlas de cadmio. Una vez que todos los nitratos se transforman a nitritos, los mismos son cuantificados por espectrofotometría a 540 nm, utilizando el reactivo de Griess (ácido sulfanílico 1%, en ácido fosfórico al 15% y N-(1-naftil)-etilendiamino 0,1%).

En la población de sujetos sanos estudiada, el 26% resultó ser SS; el 28% resultó ser SR; el resto (46%), tuvo una sensibilidad intermedio a la sal. Es importante destacar que los sujetos SS eran más viejos, más pesados y tenían una tendencia a una mayor relación cintura-cadera. También tenían una PA basal más elevada (Tabla 3).

	Sal sensibles	Sal resistentes

Edad (Años)	46.7± 2.1**	38.2 ± 1.9
Peso (Kg)	79.1± 3.0 **	71.7± 2.6
IMC (Kg/m²)	31 ± 1.0 *	26.6 ± 0.8
RCC	0.94 ± 0.02 *	0.88 ± 0.02
PAS (mmHg)	131 ± 3.9 **	111 ± 2.2
PAD (mmHg)	84.3 ± 2.6 **	75 ± 1.4
PAM (mmHg)	100 ± 2.7 **	87.1 ± 1.6
Ins ayunas (uUI-ml)	21.1 ± 2.6	22.6 ± 3.0
Ins 2hrs (uUI-ml)	126.8 ± 17.4	116.2 ± 15.5
Glu ayunas (mg/dl)	94.2 ± 4.3	88 ± 2.7
Glu 2 hrs (mg/dl)	125 ± 10.1	104.3 ± 6.1

Tabla 3: Datos demográficos y valores de presión arterial, insulina y glucosa en los grupos de sujetos sal-sensibles y sal-resistentes.
(Cubeddu y col., 2000).

En los sujetos SS, la PAM disminuyó significativamente y la excreción de metabolitos del NO aumentó significativamente ($p < 0.001$), cuando fueron sometidos a la dieta baja en sal. En dichos sujetos, la excreción urinaria de metabolitos del NO durante la ingesta alta en sal, fue 45% menor que la excreción durante la dieta baja en sal ($p < 0.001$) (Fig. 7). En los individuos SR, los cambios en la ingesta de sal no se asoció con cambios en PA o en la excreción urinaria de metabolitos del NO (Cubeddu y col, 2000).

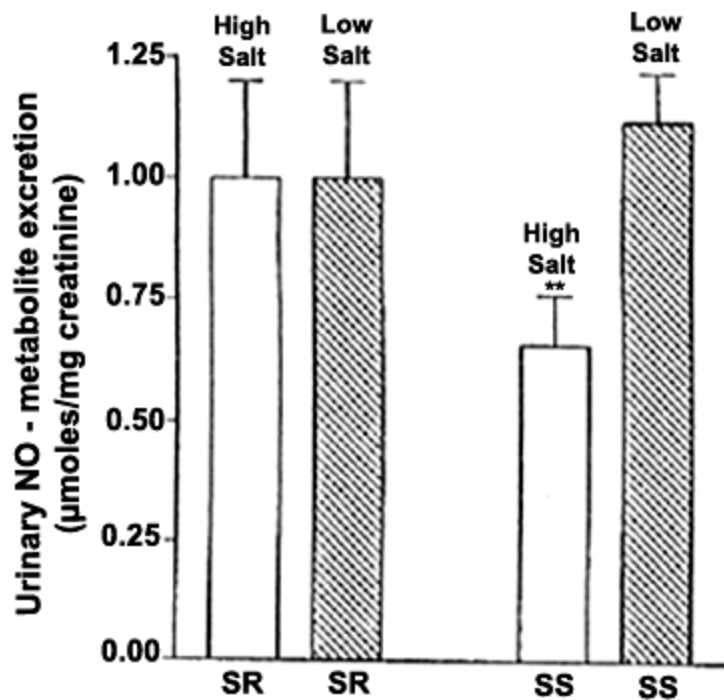


Figura 7
Cambios en la excreción urinaria de metabolitos del NO, en sujetos Sal-Sensibles (SS) y Sal-Resistentes (SR), después de una semana de ingesta alta o baja en sal. (Cubeddu y col., 2000)

Los resultados de este estudio nos permitieron concluir que la carga de sal no modifica la excreción urinaria de los metabolitos del NO en los sujetos SR, pero si lo hace en modo significativo en los sujetos SS, quienes excretan menores niveles de metabolitos urinarios del NO durante la dieta alta en sal. Al pasar de una ingesta alta a una ingesta baja en cloruro de sodio, los sujetos SS incrementan la producción de NO, sugiriendo que en dichos sujetos la alta sal (o el incremento en la presión arterial producido por la alta sal) frena reversiblemente la producción del NO, lo cual se corrige (al igual que la presión arterial) al reducir la ingesta de sal. Adicionalmente, estos resultados, junto con otra evidencia relacionada (Fujiwara y col., 1998) nos permitieron sugerir que existe una importante interacción entre la hiperinsulinemia, la hiperglicemia, la disfunción endotelial y la sensibilidad a la sal, y aunque se han propuesto diversas teorías para explicar esta relación, actualmente se desconoce el mecanismo fisiopatológico preciso por el cual se producen estas asociaciones, ni cual es la secuencia de las mismas. Algunos estudios señalan que la hiperinsulinemia aguda ejerce un poderoso efecto antinatriurético (De Fronzo y col., 1975) que persiste aun durante la hiperinsulinemia crónica asociada con obesidad, a pesar de la resistencia periférica de los tejidos a la acción de la insulina (Rocchini, 1994). En este caso, el papel del NO en la modulación renal del manejo de sodio es determinante; el mecanismo de incremento de la producción de NO al aumentar la cantidad de sodio en el organismo sería el modo directo para facilitar la natriuresis; esta habilidad parece estar alterada en los sujetos sal-sensibles. Con la finalidad de contribuir al esclarecimiento de algunas incógnitas en esta área, en SIL-DETECT prosiguen diversos estudios sobre factores de riesgo cardiovascular y metabólicos, con especial énfasis en hiperinsulinismo, sensibilidad a sal y disfunción endotelial.

OXIDO NÍTRICO Y DIABETES MELLITUS

Otra patología en la que el compromiso vascular es responsable de complicaciones graves es la Diabetes mellitus (DM); dicha enfermedad produce deterioro de la función endotelial, lo cual es determinante en la patogénesis de la enfermedad vascular asociada (Durante y col., 1988; Yaqoob y col., 1993; Galajda y col., 1997). El control estricto de la glicemia a largo plazo parece ser el factor fundamental, aunque no el único, para evitar las complicaciones microvasculares en la DM tipo 1 (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). Se ha postulado que la alteración del sistema de producción del NO es una de las vías a través de la cual podría iniciarse la enfermedad vascular en los pacientes que sufren DM (Durante col., 1988; Huszka y col., 1997).

Diversos estudios realizados en tejidos de animales de experimentación apoyan esta información. Se ha reportado que, tanto la ACh como la histamina producen una menor respuesta relajadora en aortas torácicas provista de endotelio, proveniente de ratas Wistar BB, espontáneamente diabéticas y con colesterol total normal, sugiriendo una probable alteración en la síntesis o liberación del NO, aún en etapas iniciales de la enfermedad (Meraji, 1987; Durante 1988). También se ha demostrado alteración del metabolismo de la L-arginina y de la síntesis del NO en medios de cultivo de células endoteliales de coronarias de ratas Wistar BB espontáneamente diabéticas; los autores cuantificaron indirectamente la producción de NO, mediante la medición de nitratos y nitritos en el sobrenadante (Wu y Meininger, 1995).

Estudios clínicos también han aportado resultados en esta dirección. Por ejemplo, se ha observado una menor respuesta a la ACh en pacientes diabéticos tipo 1, lo cual indicaría una alteración en la síntesis, liberación o actividad del NO (Calver y col., 1993; McNally y col., 1994). En 1996, se reporta la primera evidencia in vivo de lesión endotelial por hiperglicemia crónica en pacientes diabéticos, demostrándose una asociación entre la hiperglicemia crónica y la alteración de la vasodilatación dependiente de endotelio (Makimattila y col., 1996). También se ha demostrado que la infusión de dextrosa al 50% a sujetos sanos, produce disminución de la vasodilatación dependiente de endotelio, indicando que la hiperglicemia, por si misma, produce disfunción endotelial en forma aguda (Williams y col., 1998).

Como producto de una intensa investigación en el área, otras sustancias diferentes al NO también han sido implicadas como posibles marcadores de función endotelial en DM. Es el caso del factor de von Willebrand (FvW) (Boneu y col., 1975; Borkenstein y Muntean, 1982). El FvW es una glicoproteína sintetizada por el endotelio y ha emergido como un posible marcador de actividad de la célula endotelial, particularmente en DM tipo 1, ya que su síntesis sólo ocurre en el endotelio vascular, en los megacariocitos y en las plaquetas (Jaffe y col., 1974), permaneciendo unido a la superficie de estas últimas, después de liberarse desde los gránulos (Lip y Blann, 1997; Blann y Lip 1998). En la clínica se ha demostrado que los niveles de antígeno de FvW están aumentados en niños diabéticos sin enfermedad vascular clínicamente manifiesta; dicha elevación es proporcional a la duración de la enfermedad (Borkenstein y Muntean, 1982). También se han descrito niveles aumentados del FvW, tanto en DM tipo 2 como en DM tipo 1 (Galajda y col., 1997).

La evidencia disponible indica que el daño del endotelio podría ser el inicio de toda la perturbación vascular observada en la DM tipo 1 (Durante y col., 1988; Stehouwer y col., 1991; Yaqoob y col., 1993), y que los cambios iniciales en esta estructura vascular preceden y, subsecuentemente, se relacionan con el desarrollo de la enfermedad microvascular, manifestada como micro o macroalbuminuria y como nefropatía clínica. Sin embargo, son pocos estudios en los que se haya evaluado la función endotelial en etapas iniciales de la DM tipo 1, es decir, antes

de la aparición de las alteraciones microvasculares (Stehouwer y col., 1992; Stehouwer y col., 1995; Galajda y col., 1997). Por este motivo, en un estudio recientemente publicado nos propusimos evaluar la función endotelial de pacientes con DM tipo 1 recientemente establecida (> 1 año de evolución), utilizando como marcadores de la misma al FvW y al NO (medidos como nitratos y nitritos en orina y en plasma), con el objetivo de de establecer si en dichos pacientes se produce un daño endotelial precoz durante el curso de la enfermedad, inclusive antes de que aparezcan las complicaciones vasculares observadas clínicamente (Correa y Alfieri, 2003).

Para dicho estudio se reclutaron un total de 42 sujetos, entre individuos sanos y pacientes con DM tipo 1 que acudieron a consulta en el Hospital Universitario de Caracas. Los sujetos fueron incluidos en uno de los siguientes grupos:

- Grupo 1: sujetos sanos.
- Grupo 2: pacientes con DM tipo 1, recientemente diagnosticada (menos de 12 meses), y sin evidencia clínica de daño microvascular.
- Grupo 3: pacientes con DM tipo 1, con un tiempo de diagnóstico mayor a 9 años, y que tuvieran evidencia clínica de daño micro o macrovascular.

La presencia de daño micro o macrovascular fue descartada mediante una evaluación oftalmológica realizada a todos los sujetos del estudio.

Una vez que un paciente del grupo 2 era reclutado, se le citaba para una sesión con el médico y con el nutricionista, para recibir información educativa sobre la DM y el modo de controlarla, con el objetivo de mantener su glicemia pre-prandial en < 120 mg/dl, evitando hipoglicemias severas. Una vez obtenido un promedio de glicemia de <120 mg/dl durante 2 semanas, se tomaban las muestras de orina y plasma para la cuantificación de NO, de excreción urinaria de albúmina y de factor de von Willebrand plasmático.

Los pacientes diabéticos tipo 1 de reciente diagnóstico con niveles óptimos de glicemia presentaron niveles de nitratos + nitritos urinarios comparables con los de sujetos sanos; sin embargo, los niveles plasmáticos fueron menores que en los sujetos sanos (Fig. 8). Por otra parte, los niveles de nitratos + nitritos urinarios y plasmáticos fueron inferiores en los diabéticos de larga data con complicaciones microvasculares establecidas (Grupo 3). Hubo una correlación negativa entre los niveles de NO plasmático y urinario con la glicemia en ayunas. La correlación de nitratos+nitritos y HbA_{1c} también fue negativa.

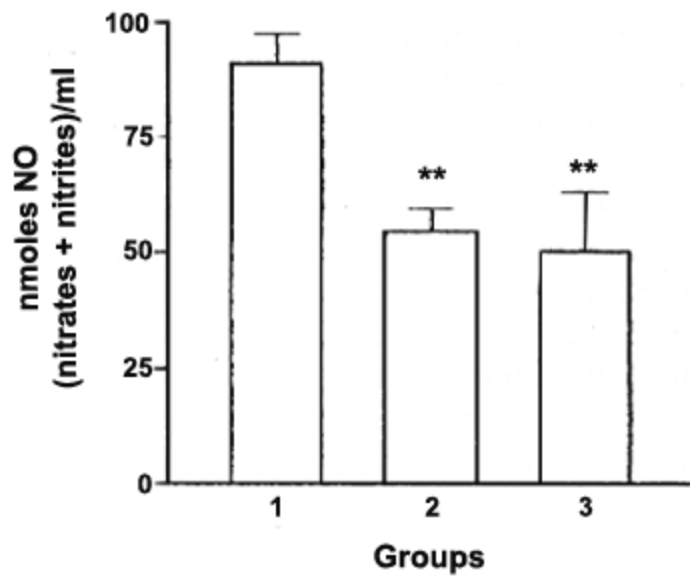


Figura 8

Los pacientes diabéticos tipo 1 de reciente diagnóstico con niveles óptimos de glicemia presentaron niveles de nitratos + nitritos plasmáticos menores que los sujetos sanos, indicando que la disfunción endotelial se inicia mucho antes de que aparezcan evidencias clínicas de la misma. (Correa y Alfieri, 2003)

No hubo diferencia en los niveles de FvW plasmático entre los sujetos controles y los pacientes diabéticos tipo 1 de reciente diagnóstico. En los pacientes del grupo 3 (DM tipo 1 de larga data) los niveles de FvW fueron significativamente mayores (Fig. 9).

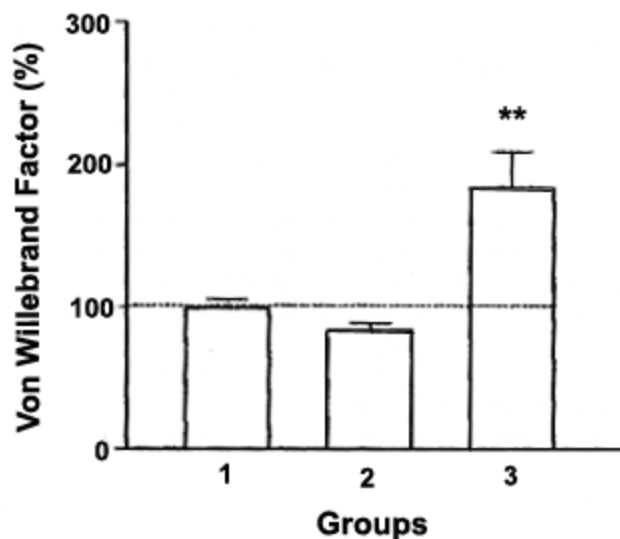


Figura 9

Los niveles de Factor von Willebrand en los pacientes del grupo 3 (DM tipo 1 de larga data) fueron significativamente mayores ($p < 0.0001$). No hubo diferencia en los niveles de FvW plasmático entre los sujetos controles y los pacientes diabéticos tipo 1 de reciente diagnóstico. (Correa y Alfieri, 2003)

Los hallazgos de este estudio apoyan la hipótesis de que en etapas tempranas la DM tipo 1 (etapa en la cual se encontraban los pacientes del grupo 2) ya aparece la disfunción endotelial, evidenciada por una disminución de la producción de NO, evidenciado como una reducción de nitratos + nitritos plasmáticos. En cambio, en dicho grupo de sujetos no se detectaron cambios en los niveles de FvW. Esto permite considerar al FvW como un factor hemostático que se altera

en una etapa más tardía del daño vascular, o en pacientes diabéticos mal controlados y con hiperglicemia persistente (grupo 3).

Los resultados de la cuantificación del NO indican que en pacientes con daño microvascular evidente, la determinación de NO en orina parece ser una forma sensible para detectar alteraciones en la producción de NO, ya que son suficientemente grandes como para hacerse detectables; esto no ocurre en los pacientes recientemente diagnosticados. En dichos pacientes sin lesión microvascular (grupo 2), la determinación plasmática es un mejor método, ya que detecta cambios más tempranos y pequeños. Se sabe que los productos finales de glicosilación avanzada inactivan la liberación de NO (Hori y col., 1997) y mientras más metabólicamente descontrolado se encuentre un sujeto, menor producción de NO obtendríamos, como consecuencia de ese mecanismo.

En conclusión, nuestro estudio demuestra que en pacientes con DM tipo 1 de reciente diagnóstico con control glicémico agudo óptimo (glicemia en ayunas < de 120 mg/dl) y control glicémico crónico aceptable (HbA_{1c} > de 8%-8.5%), sin dislipidemia, sin hipertensión arterial sistémica, no fumadores, hay evidencia de disfunción endotelial, manifestada como una disminución del NO plasmático, todo esto sin cambios en la cantidad de FvW plasmático. En los pacientes con DM tipo 1 de larga se evidenció un deterioro endotelial importante, demostrado por una elevación del FvW y una disminución del NO plasmático y urinario, al compararlo con sujetos sanos; esto corrobora que tales marcadores solubles se encuentran alterados en pacientes con daño vascular establecido. La cuantificación de los metabolitos plasmáticos del NO (pero no de los urinarios) parece ser un método adecuado para detectar el daño endotelial precoz en el paciente con DM tipo 1 que aún no presenta con lesiones microvasculares clínicamente manifiestas.

OXIDO NÍTRICO Y EJERCICIO

Gran cantidad de evidencia clínica y patológica ha demostrado que el ejercicio físico regular es capaz de producir una reducción de las enfermedades cardiovasculares, tales como aterosclerosis, enfermedad coronaria, hipertensión arterial e hiperlipidemia (Peters y col., 1983; Blair y col., 1995; Blair y col., 1996). Se ha demostrado un incremento del diámetro coronario después del entrenamiento físico regular (Heath y col., 1983), sugiriendo que un programa de ejercicio periódico puede reducir la resistencia vascular. De hecho, el ejercicio regular ha mostrado tener ese efecto tanto en pacientes hipertensos (Mannarino y col., 1989) como en individuos sanos (Ekelund y col., 1988; Jungersten y col., 1996). Sin embargo, el mecanismo por el cual se obtiene estos efectos no está totalmente dilucidado.

En el sistema cardiovascular del mamífero, el endotelio presenta respuestas singulares a las fuerzas del flujo sanguíneo; el flujo pulsátil y el estrés de roce son estímulos fisiológicos responsables en parte de la liberación basal de NO (Schul, 1995). Ambos eventos se producen durante el ejercicio físico y son proporcionales a la intensidad del mismo (Fig. 10.A). El endotelio está localizado entre el flujo sanguíneo y la pared vascular. Las células que recubren la circulación arterial están expuestas a fuerzas hemodinámicas de mayor magnitud que cualquier otro tejido de mamífero. En consecuencia, las respuestas mecánicas reguladas por el endotelio han evolucionado mucho más notablemente en relación con el control del tono vascular; como resultado los mecanismos responsables para la transmisión y la transducción de la información

hemodinámica, desde la sangre hasta la musculatura lisa de la pared vascular residen en el endotelio. Las fuerzas hemodinámicas también juegan un papel importante en algunas patologías vasculares, particularmente en la localización de lesiones de arteriosclerosis y en la hipertensión arterial (Suarez-Munguia, 2000).

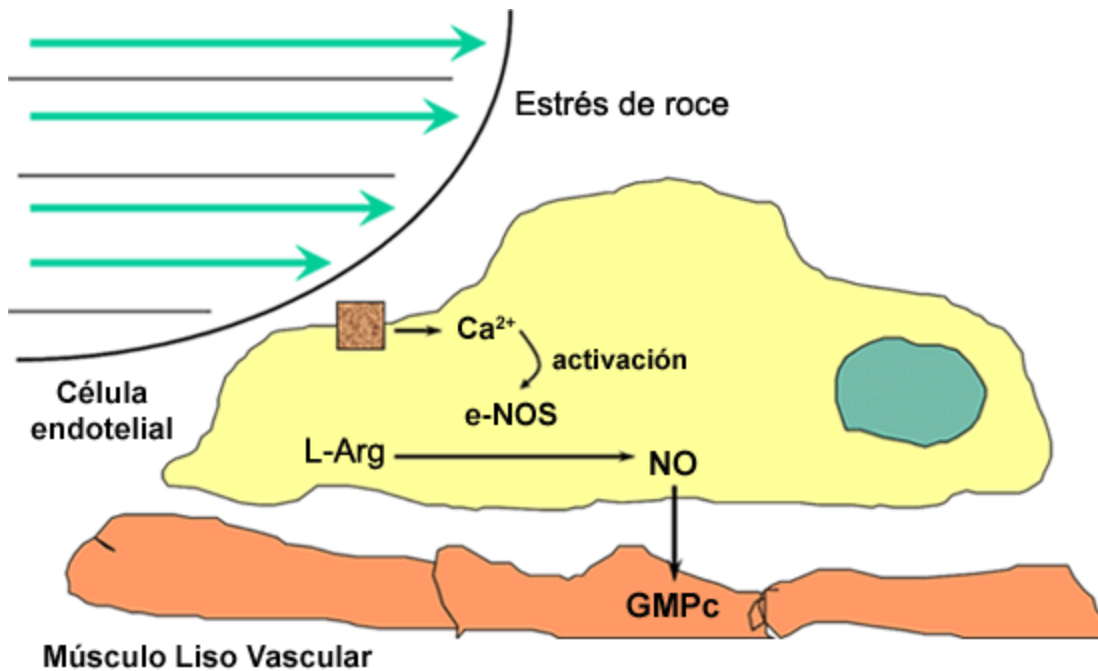


Figura 10.A
Ejercicio, estrés de roce y producción de NO
Efecto del incremento agudo del estrés de roce sobre la activación de la eNOS vascular.

Los factores hemodinámicos (definidos como fuerzas mecánicas del flujo sanguíneo) afectan la biología endotelial, tanto por la acción directa del estrés por roce y la deformación por presión, así como por la modificación indirecta de la concentración de químicos y agonistas en la superficie endotelial, alterando la interacción de estas moléculas con sus receptores endoteliales. En realidad estos dos mecanismos no son excluyentes uno del otro, ya que las fuerzas hemodinámicas al actuar en forma directa sobre las enzimas de superficie o los receptores, podrían modificar la interacción enzima-sustrato y agonista-receptor, así como también cambiar la concentración de superficie de los agonistas (Suárez-Munguia, 2000). El estrés sobre la célula endotelial, puede, entre otras cosas activar o estimular la síntesis de NOS; debemos recordar que la enzima endotelial (eNOS) tiene una característica única, que consiste en un sitio de miristilación. Este sitio permite el anclaje de la enzima a la membrana plasmática, facilitando la activación de la eNOS por el estrés de roce que se produce, por ejemplo, durante el ejercicio físico (Shul, 1995). En relación a esto, se ha demostrado que la exposición a estrés de roce aumentado por períodos de 3 h, es capaz de incrementar la cantidad de mRNA para eNOS, así como la expresión de la proteína en células endoteliales de aorta de bovino y en células endoteliales de aorta humana (Uematsu y col., 1995), indicando que aunque dicha enzima eNOS está expresada en forma constitutiva, puede estimularse por acción de estímulos exógenos, tales como un aumento en las fuerzas mecánicas de roce (Fig. 10.B) (Schul, 1995). Aún si las variaciones en la síntesis de la enzima pueden ser modestas, pueden desempeñar un papel fisiológico importante, pues hasta pequeños cambios en la producción de NO pueden producir importantes cambios en las dimensiones de los vasos. Bode-Boger y su grupo (1994) demostró que el ejercicio físico produce un incremento en la cantidad de nitratos + nitritos y de GMPc

urinarios excretados por sujetos sanos, sugiriendo que dicho incremento pudiera contribuir a la vasodilatación asociada al ejercicio. Estudios realizados tanto en animales como en humanos han demostrado que un programa de ejercicios crónico incrementa la vasodilatación mediada por endotelio o la cantidad de eNOS constitutiva (Delp y col., 1993; Shen y col., 1995; Horning y col., 1996) (Fig. 11).

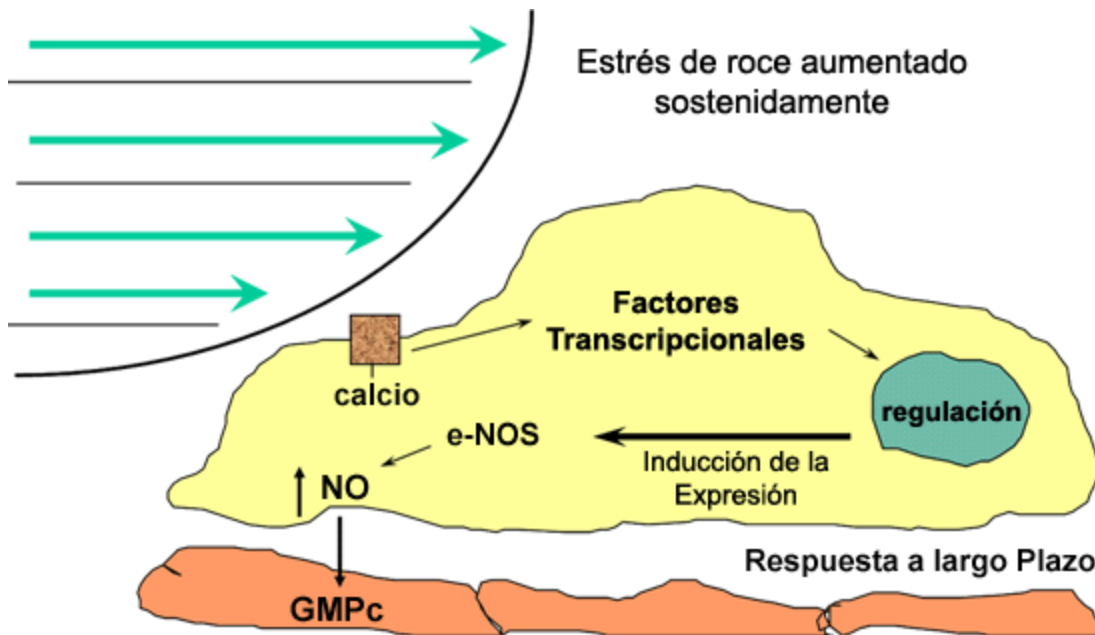


Figura 10.B
Ejercicio, estrés de roce y producción de NO
Efecto del incremento sostenido del estrés de roce sobre la inducción de la expresión de la eNOS vascular. Esto ocurre en los sujetos físicamente entrenados.

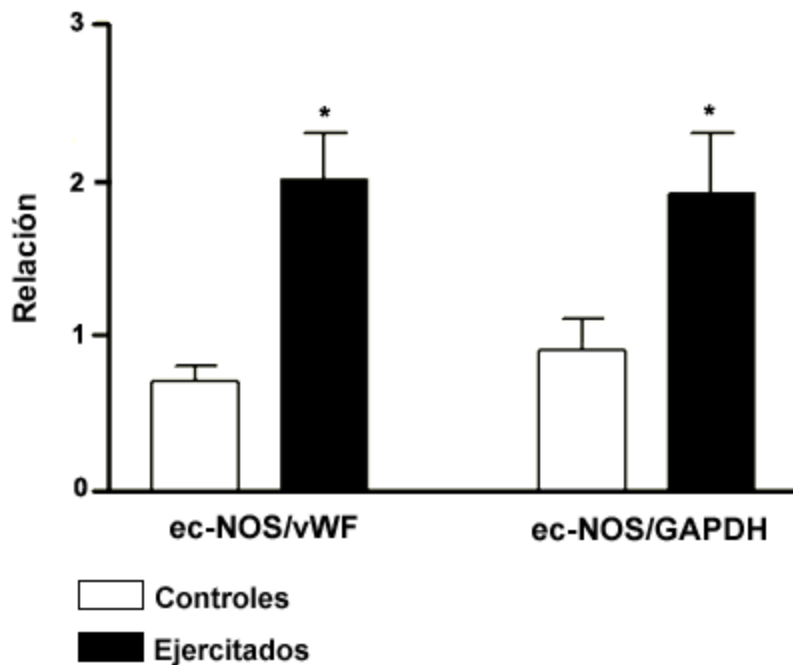


Figura 11
Los niveles de NOS constitutiva se incrementaron significativamente en perros, luego que estos fueron sometidos a caminatas de 1 hora (9.5 Km/h) 2 veces al día, por 10 días. (Horning y col., 1996)

Como consecuencia de la evidencia disponible, se esperaría que los niveles de metabolitos del NO y de GMPc (segundo mensajero del NO) (Holzmann, 1982) estuvieran incrementados en

sujetos físicamente activos, en comparación con sujetos sedentarios, reflejando así la mayor producción de NO endotelial a medida que el nivel de entrenamiento cardiovascular fuese superior. Con la finalidad de investigar la existencia de una relación entre la actividad física sostenida y la formación sistémica de NO, nosotros cuantificamos la excreción urinaria basal de nitratos + nitritos y del su segundo mensajero, el GMPc en corredores, en sujetos sedentarios sanos y en pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) (Rodríguez-Plaza y col, 1997; Alfieri y col., 2000); así mismo, evaluamos el efecto del ejercicio agudo en esas mismas poblaciones.

En dicho estudios se incluyeron un total de 44 sujetos masculinos. Todos los individuos fueron entrevistados y completaron una encuesta que permitió incluirlos en uno de los siguientes grupos: Grupo 1: Corredores altamente entrenados (90 Km/semana de trote). En la orina de estos sujetos se cuantificó a los metabolitos del NO y al GMPc, antes y después de una carrera de 42.2 km. Grupo 2: Corredores entrenados (65 Km/semana de trote). En la orina de estos sujetos se cuantificó a los metabolitos del NO y al GMPc, antes y después de una carrera de 15 km. Grupo 3: Sujetos sedentarios sanos que no practicaban ninguna actividad física regular durante su tiempo libre, ni como parte de su trabajo. En la orina de estos sujetos se cuantificó a los metabolitos del NO y al GMPc, en condiciones basales (una sola muestra). Grupo 4: Pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) comprobada (infarto de miocardio, angiografía coronaria con obstrucción >50% en por lo menos una arteria coronaria mayor). En estos pacientes se cuantificó metabolitos del NO y GMPc urinarios, antes y después de una caminata supervisada de 3-6 Km. Esta cuantificación se repitió después de que dichos pacientes siguieron un programa de rehabilitación cardiaca de 12 semanas de duración.

Programa de la rehabilitación cardiaca

Los pacientes con EAC (Grupo 4) fueron sometidos a un programa ambulatorio de Rehabilitación Cardiaca de 12 semanas de duración (3 sesiones semanales de ejercicio, de 1 hora de duración, a un 75-80% de su capacidad máxima, para un total de 36 sesiones). Adicionalmente y con asesoramiento cardiológico y nutricional permanente, todos los pacientes fueron animados a ejercitarse fuera del programa formal y a seguir ajustes dietéticos para lograr el peso ideal.

Los resultados de estos estudios permitieron demostrar que los niveles de nitratos + nitritos urinarios son mayores en los sujetos mas entrenados (Fig.12A) (Fig.12B) (Rodríguez-Plaza y col., 1997). Sin embargo, al cuantificar los niveles de GMPc, se observaron niveles urinarios basales similares en los tres grupos de sujetos, independientemente de su nivel de entrenamiento (Fig. 13) (Alfieri y col., 2000). Estos resultados concuerdan con estudios previos de Poveda quien no encontró ninguna diferencia en el GMPc plasmático basal entre atletas e individuos sedentarios, a pesar de que el NO plasmático basal de los atletas duplicaba al de los sujetos sanos que no practicaba ningún deporte (Poveda y col., 1997). Desde un punto de vista práctico, estos resultados sugieren que los niveles del GMPc basales no reflejan el nivel de salud cardiovascular asociada al ejercicio crónico, a pesar que la excreción urinaria de metabolitos del NO se relacionó directamente con la capacidad aeróbica máxima. Las diferencias de comportamiento obtenidas entre los niveles basales de nitratos + nitritos y del GMPc urinarios, puede relacionarse con las diferencias en la vida media de ambas sustancias.

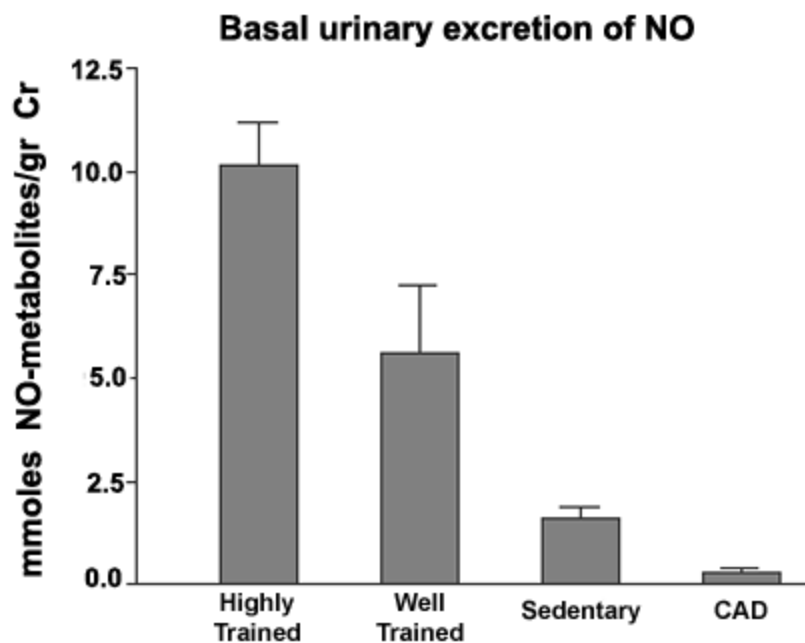


Figura 12.A

Niveles basales de metabolitos urinarios del NO en sujetos con diferentes niveles de actividad física. (Rodríguez-Plaza y col., 1997; Alfieri y col., 2000)

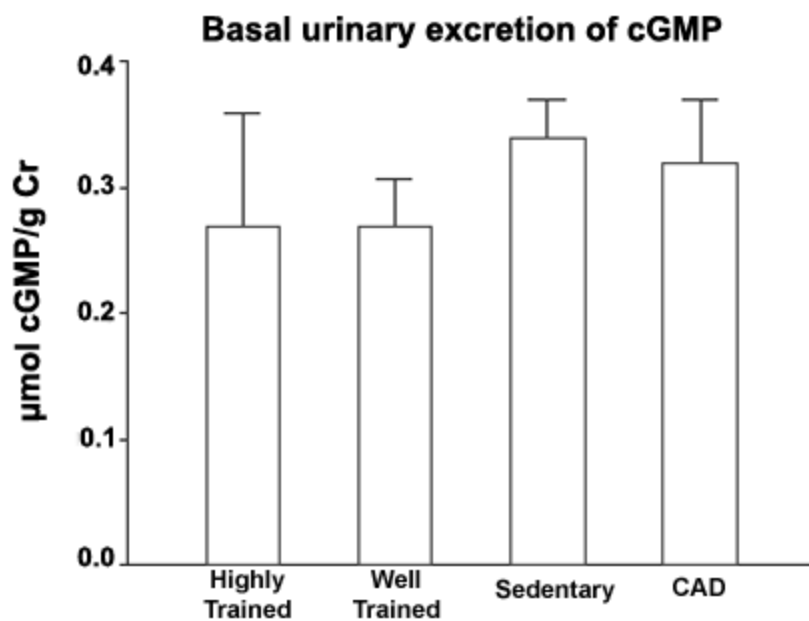
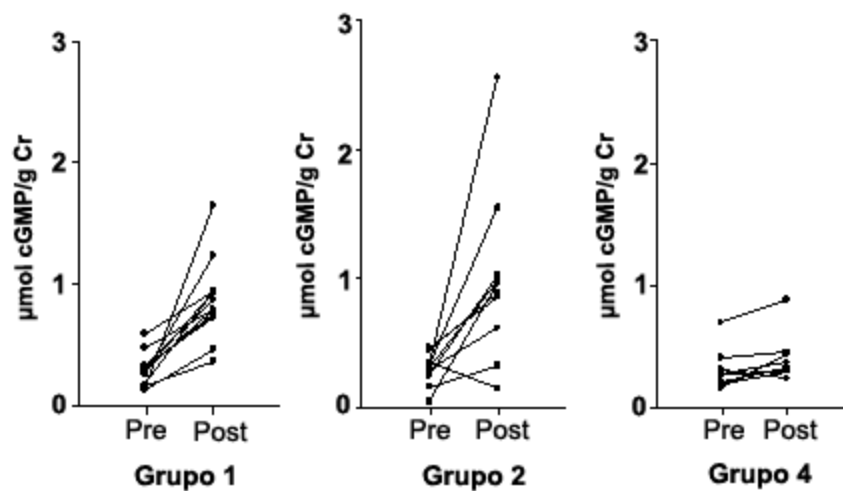


Figura 12.B

Niveles basales de metabolitos urinarios de cGMP en sujetos con diferentes niveles de actividad física. (Rodríguez-Plaza y col., 1997; Alfieri y col., 2000)



Para cada grupo, los ejercicios fueron los siguientes:

Grupo 1 (Corredores altamente entrenados): Maratón de 42 km

Grupo 2 (Corredores entrenados): Carrera de 15 Km

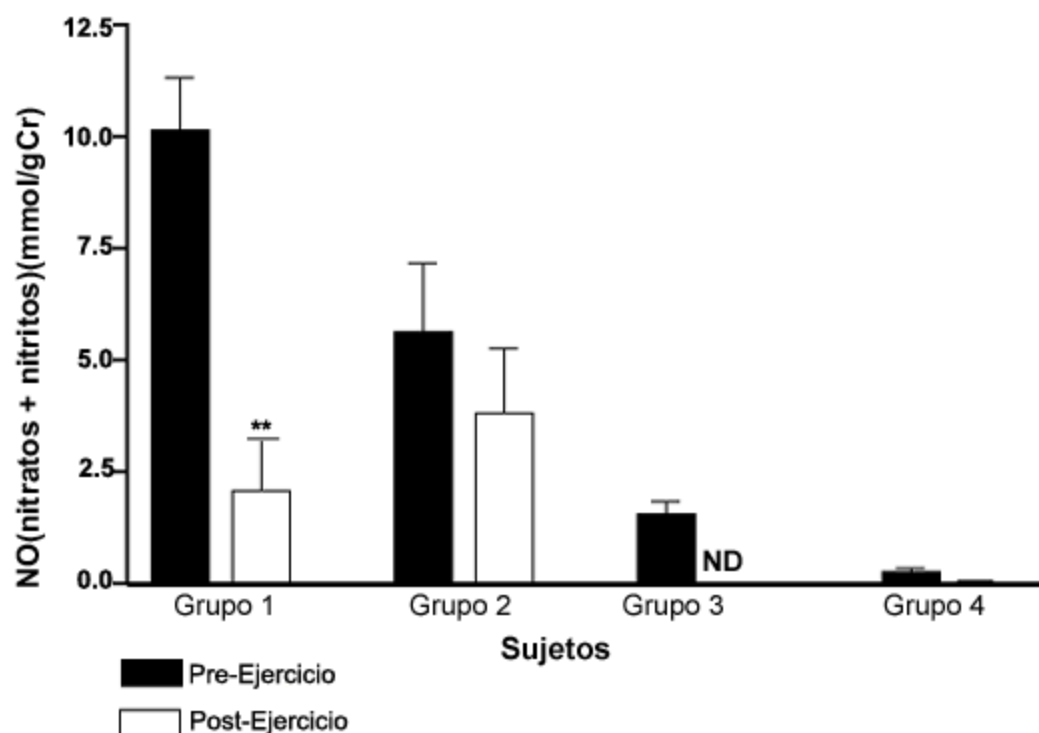
Grupo 4 (Pacientes con enfermedad arterial coronaria): caminata supervisada de 3-6 km.

Figura 13

Excreción urinaria de GMPc antes y después del ejercicio agudo.

(Alfieri y col., 2000)

También pudimos demostrar que el ejercicio agudo aumenta las concentraciones del GMPc en sujetos sanos y en los pacientes con EAC. Estos aumentos en el GMPc urinario fueron máximos a los 30-60 min. después de la realización del ejercicio, seguida por un retorno rápido a los niveles pre-ejercicio (Fig. 14) (Alfieri y col., 2000). Adicionalmente, demostramos que la magnitud del aumento de los metabolitos del NO y del GMPc urinario inducido en los pacientes EAC por la caminata supervisada, se incrementó después de la realización del programa de rehabilitación cardíaca de 12 semanas, indicando que el ejercicio crónico juega un papel fundamental en la cantidad de NO y de GMPc producido durante el ejercicio agudo (Fig. 15) (Rodríguez-Plaza y col, 1997; Alfieri y col., 2000). Estos resultados pueden contribuir a dar una explicación parcial de la acción beneficiosa del ejercicio sobre la salud cardiovascular, reportada repetidamente por diversos grupos de investigadores (Blair y col., 1995; Peters y col., 1983).



Para cada grupo, los ejercicios fueron los siguientes:

Grupo 1 (Corredores altamente entrenados): Maratón de 42 km

Grupo 2 (Corredores entrenados): Carrera de 15 Km

Grupo 3 (Sujetos sanos sedentarios): solo fueron cuantificados niveles basales

Grupo 4 (Pacientes con enfermedad arterial coronaria): caminata supervisada de 3-6 km.

** P< 0.001 con relación a niveles pre-ejercicio.

Figura 14
Excreción urinaria de metabolitos del NO antes y después del ejercicio agudo. (Rodríguez-Plaza y col., 1997)

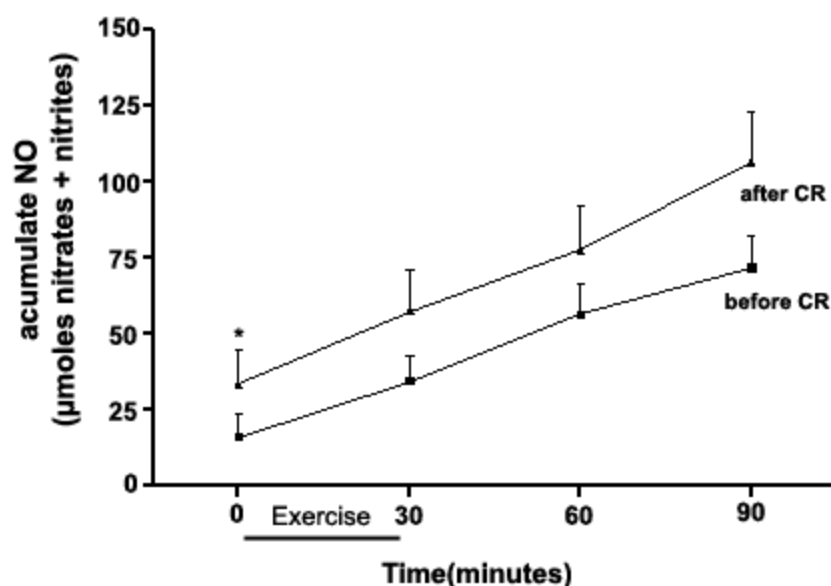


Figura 15.A

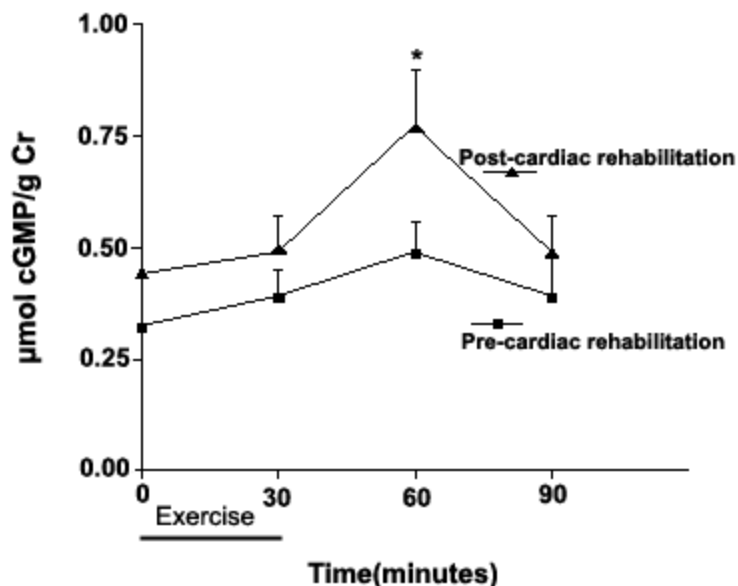


Figura 15.B
Cambios en los niveles de metabolitos urinarios de GMPc en pacientes con Enfermedad Arterial Coronaria, antes y después de la realización ejercicio agudo (caminata de 3-6 km, en 30 minutos), antes y después de un programa rehabilitación cardíaca de 12 semanas de duración. (Rodríguez-Plaza y col., 1997; Alfieri y col., 2000)

OXIDO NITRICO E INFLAMACIÓN

La participación de NO en la respuesta inflamatoria ha sido demostrada en modelos animales y en enfermedades inflamatorias humanas (Salvemini y col., 1996; Kawachi y col., 1999). Como ya fue discutido, se sabe que el NO producido en bajas cantidades por la acción de la eNOS tiene un papel fisiológico, con el GMPc como segundo mensajero; por otra parte, muchas respuestas patológicas agudas y crónicas se asocian a un exceso en la producción de NO catalizada por la iNOS e iniciada por citocinas y endotoxinas en diversos tipos de la células, especialmente en macrófagos. También las isoformas constitutivas de la NOS pueden activarse en respuesta a estímulos inflamatorios y de este modo participar en la reacción inflamatoria, tal y como ha sido descrito para la nNOS en ciertos modelos de inflamación neurogénica (Towler y col., 1998). Aunque el NO participa en las fases vasculares y celulares de la respuesta inflamatoria, la modulación ejercida por este mediador puede depender del tipo de lecho vascular implicado en la reacción y de la interacción con otros múltiples mediadores (Li y Billiar, 1999).

El posible papel del NO en funciones inflamatorias podría ejercerse a varios niveles:

1. inicialmente, por su capacidad de producir vasodilatación, alteración de la permeabilidad vascular y extravasación de proteínas plasmáticas (Whittle, 1995; Szabó y Dawson, 1998).
2. en una fase mas tardía o crónica de la inflamación, la señal inflamatoria puede magnificarse mediante la producción de moléculas como el factor transcripcional NF-kB, el factor de necrosis tumoral γ (FNT- γ) y el interferón γ (γ -IFN); estos, promoverían la transcripción de la iNOS, generándose grandes cantidades de NO, mayor vasodilatación y edema; este NO puede sufrir procesos de transformación a productos altamente reactivos capaces de inducir daño por diversos mecanismos, siendo uno de los más importantes, el

daño de la doble hélice del DNA, con la consecuente la muerte celular (Ridger y col., 1997; Szabó y Dawson, 1998).

Inflamación experimental

Los modelos experimentales de inflamación son herramientas valiosas e indispensables para entender, entre otras cosas, la complejidad de la participación de diferentes mediadores en la respuesta inflamatoria in vivo. Como ya se ha descrito, el NO puede actuar como mediador del componente vasodilatador de la inflamación, así como tener un papel relevante en la extravasación de macromoléculas iniciada por diversos estímulos inflamatorios (Noel y col., 1995)

La importancia del NO en la modulación de este proceso puede variar según las condiciones experimentales, por lo cual algunos resultados publicados hasta el presente han arrojado resultados contradictorios (Giraldelo y col., 1994; Paul-Clark y col., 2001). Por ejemplo, estudios con ratones deficientes de iNOS permitió concluir que la iNOS ejerce un efecto modesto sobre la expresión vascular de la molécula de adhesión celular vascular-1 (Vcam-1) en la inflamación digestiva aguda, mientras que no se observó ningún efecto en un modelo inmune de colitis crónica (Kawachi y col., 1999). El papel del NO también ha sido evaluado en modelos clásicos de inflamación, como el del edema de la pata por inyección de carragenina, donde se obtuvieron niveles elevados de nitritos y de iNOS, 6 horas después de la administración de la carragenina. Los autores concluyeron que el NO formado por acción de la cNOS desempeñaría un papel importante para iniciar esta respuesta, mientras que la iNOS mantendría la inflamación más tardía y sostenida. La administración sistémica del L-NAME o del L-NMMA (inhibidores no selectivos de la NOS) reduce las fases tempranas y tardías del edema (Salvemini y col., 1996). En contraste, la administración de inhibidores más selectivos de los iNOS, como la L-NIL y la aminoguanidina, inhibe solamente la fase tardía del edema, así como la migración de neutrófilos y la elevación de los niveles de nitritos y de PGE2 en la pata inflamada (Salvemini y col., 1996). Otros estudios también han concluido que la inhibición farmacológica de iNOS no produce la eficacia antiinflamatoria prevista, probablemente debido al gran número de otros factores involucrados en la respuesta inflamatoria (Giraldelo y col., 1994; Paul-Clark y col., 2001).

Hoy en día se sabe que los fármacos esteroideos con actividad antiinflamatoria inhiben la síntesis de la iNOS (Di Rosa y col., 1990; McCartney-Francis y col., 2001). Otras drogas antiinflamatorias también inhibirían la inducción de los iNOS, incluyendo las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINEs) (Cirino y col., 1996) o los productos nuevos que demuestran efectos antiinflamatorios en modelos experimentales, tales como los derivados de chalcona, capaces de inhibir la síntesis de novo de la iNOS (Herencia y col., 1999) o un derivado nuevo del ditriazine, también capaz de inhibir la inducción de la COX (Rioja y col., 2000; 2002).

Estos resultados no concluyentes y a veces contradictorios destacan la necesidad de mayor investigación en esta área; de allí la importancia de disponer de modelos animales válidos que permitan estudiar los mecanismos desencadenantes, los neurotransmisores y los mediadores involucrados en el proceso inflamatorio, así como la secuencia de eventos que lo acompañan.

Modelos experimentales para el estudio de la inflamación: Inflamación neurogénica inducida por agentes antineoplásicos

Desde principios del siglo XX y como consecuencia de los estudios sobre "vasodilatación antidrómica", se sugirió que los cambios vasculares locales podrían producirse como resultado de una activación retrógrada de los nervios sensoriales de la piel (Bruce, 1910; Jancso y col., 1967).

Se demostró que esta respuesta no es abolida por antagonistas a la acetilcolina, la histamina, la serotonina, la adrenalina o la noradrenalina, pero si desaparecía con la denervación o con el pretratamiento con capsaicina (Holtzer, 1988; 1991).

Esta vasodilatación y la extravasación de proteínas plasmáticas desarrollada por la activación neuronal retrógrada, como los antes mencionados se denomina inflamación neurogénica (Barnes y col., 1990), y es causada por agentes de diferente naturaleza, capaces de estimular a las fibras aferentes primarias sensibles a capsaicina (FAPSC) y provocar la liberación antidrómica de diversos neurotransmisores, principalmente sP, la neurokinina A y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (PRGC), todos ellos capaces de producir vasodilatación, edema, contracción de la musculatura lisa y reclutamiento de células inflamatorias (Barnes y col., 1990; Regoli y col., 1994). Este fenómeno ha sido demostrado en muchos tejidos y órganos, incluyendo la piel, el tracto respiratorio, el ojo, el tracto gastrointestinal, las articulaciones y la vejiga urinaria (Holtzer, 1988), pudiendo contribuir al componente inflamatorio en un número de enfermedades o situaciones, tales como asma, rinitis, artritis, conjuntivitis, úlceras gastrointestinales, inflamaciones de la piel (Barnes y col., 1990; Holtzer, 1988) y lesiones producidas por algunos agentes antineoplásicos (Ahluwalia y col., 1994; Alfieri y Gardner, 1997).

Entre los agentes que pueden iniciar eventos inflamatorios neurogénicos se encuentran varios agentes antineoplásicos (Ahluwalia y col., 1994; Alfieri y Gardner, 1997; Alfieri y Gardner, 1998). Los fármacos antineoplásicos producen inflamación y daño de diferente magnitud en diversos tejidos, debido a su citotoxicidad inespecífica. Entre dichas moléculas, capaces de producir inflamación neurogénica, encontramos a la ciclofosfamida (CFM); la CFM es un fármaco para el tratamiento de una serie de enfermedades malignas y autoinmunes. Sin embargo, su uso produce toxicidad inespecífica de diferente tipo, incluyendo cistitis neurogénica en los sujetos que la reciben, con una incidencia de hasta un 78% (Grimberg-Funes y col., 1990). Se sabe que dicho efecto es debido a la acción de su principal metabolito, la acroleína, sobre el urotelio (Phillips y col., 1961; Fraiser y col., 1991).

Relación entre el NO y la sustancia P: Modelo experimental de inflamación neurogénica inducida por agentes citotóxicos

Se ha demostrado que la vasodilatación inicial producida por la sP se origina por la activación de receptores NK1 en el endotelio arterial, promoviendo, entre otras cosas, la liberación de óxido nítrico (NO) (Regoli y col., 1994; Maggi, 1997). Este último efecto es en parte responsable de la extravasación plasmática temprana (Regoli y col., 1994; Maggi, 1997). El hecho de que la activación del receptor NK1 promueva la síntesis de NO y que dicha molécula sea reconocida como agente proinflamatorio, permite inferir el posible papel del bloqueo del receptor NK1 y del bloqueo de la síntesis de NO sobre la inflamación inducida por CFM en vejiga urinaria y por el CPT en tejido renal. Adicionalmente, el daño causado por el atineplásico puede inducir la síntesis de citocinas y estas podrían estimular la expresión de la iNOS. Desde mediados de los años 90 aparecieron algunos trabajos indicando una relación entre la sP, el NO, la inflamación y el daño celular. Por ejemplo, experimentos realizados por Ralevic y colaboradores (1995) habían demostrado que el NO es el mensajero responsable de la respuesta dilatadora microvascular que se produce en el modelo de inflamación inducida por sP, en la piel de la rata. También en ratas, había sido demostrado un incremento de la producción glomerular de NO al inducir insuficiencia renal con gentamicina (Rivas-Cabañero y col., 1994). En 1998, Szabó y Dawson,

proponen un mecanismo molecular que podría explicar el papel del NO en la inflamación; ellos propusieron que el NO producido como consecuencia de señales inflamatorias se combinaría con radicales superóxido para producir peroxinitritos, capaces de producir daño de la doble hélice del DNA, con la consecuente activación de la sintasa del poli-ADP-ribosa (SPAR). El incremento en la síntesis de poliribosa produce una falla energética, que lleva a la muerte celular. Esta vía podría activarse simultáneamente con otros con mecanismos citotóxicos independientes de la generación de SPAR, generándose un mayor daño celular (Szabó y Dawson, 1998).

En humanos, Lyons (1996), demostró que la administración de interleukina-2 para el tratamiento de enfermedades malignas, puede causar un síndrome de extravasación plasmática por vasodilatación, que se acompaña de niveles elevados de nitratos tanto en sangre como en orina; los autores señalaron al NO como promotor del mencionado incremento de la permeabilidad vascular. La elevación los niveles de nitratos y nitritos en orina también fue reportada en pacientes con cistitis inducida químicamente, y que tenían cultivos urinarios negativos (Lundberg, 1996). Por otra parte, se ha demostrado que compuestos antagonistas de los receptores NK1 poseen el potencial para prevenir el daño causado por procesos inflamatorios neurogénicos, que involucren la extravasación de proteínas plasmáticas y el daño celular (Awulalia y col., 1994; Alfieri y Gardner, 1997; Alfieri y Gardner, 1998).

Con base en los antecedentes experimentales expuestos, emprendimos una serie de estudios en animales, con la finalidad de alcanzar estudiar el papel de la sP y del NO en la producción de la cistitis neurogénica por CFM, así como la posible actividad terapéutica contra la inflamación neurogénica de antagonista NK1 e inhibidores de la síntesis del NO.

Para alcanzar los objetivos experimentales, se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley. En un experimento piloto se determinó que el tiempo necesario para que la CFM (150 mg/kg, i.p.) produjera aumentos significativos en la excreción urinaria de nitratos + nitritos en dichos animales es de 6 horas. Este aumento se acompañó por un incremento en la actividad de iNOS cuantificada como cambios en la formación de ¹⁴[C] citrulina a partir de ¹⁴[C] arginina (Alfieri y col., 2000).

Posteriormente, y en la misma especie, se evaluó la actividad de drogas antagonistas NK1 (GR205171 y WIN-51708) y de los siguientes inhibidores de la NOS: la N-nitro-L-arginina (L-NNA, no selectivo); la s-metilisotiurea (MITU, selectivo endotelial) y el 7 nitroindazol (7-NI, selectivo neuronal).

Estos tratamientos, salvo el realizado con el inhibidor de la isoforma neuronal de la NOS, produjeron reducciones significativas de la producción de nitratos + nitritos y de la extravasación de proteínas plasmáticas (EPP, considerado una medición indirecta de inflamación y edema) (Fig.16A)(Fig.16B) (Tabla4), junto con una mejoría histológica (Alfieri y Cubeddu, 2000; Alfieri y Cubeddu, 2002 y Alfieri y col., 2001).

	Urinary Excretion of NO Metabolites (mmol/g creatinine)
--	--

Control	0.22 ± 0.08
GR-205171	0.18 ± 0.08
L-NNA	0.05 ± 0.04*
CYP	0.42 ± 0.05*
CYP + GR-205171 (one dose)	0.38 ± 0.1
CYP + GR-205171 (two doses)	0.22 ± 0.08**
CYP + L-NNA	0.11 ± 0.05**
CYP + GR-205171 (two doses) + L-NNA	0.14 ± 0.08**

Significantly different from control values at * P < .01.

Significantly different from CYP values at **P < .01 . .

Tabla 4: Excreción Urinaria de metabolitos del NO. (Alfieri y Cubeddu., 2000)

Las ratas recibieron ciclofosfamida (CYP) sola o junto con un tratamiento con antagonista NK1 (GR205171) o in inhibidor inespecífico de la síntesis del NO (L-NNA).

Los resultados de estos trabajos sobre el papel del NO en la cistitis neurogénica por CFM, junto con hallazgos previos (Alfieri y Gardner, 1997; Alfieri y Gardner, 1998) ponen de manifiesto el importante papel de la sP, los receptores NK1 y de la generación de NO en la citotoxicidad inducida por CFM en vejiga urinaria de la rata.

Con base en nuestros estudios y en las evidencias previamente publicadas (Cox, 1979; Ahwulalia y col., 1994; Szabó y Dawson, 1998), propusimos el siguiente mecanismo para la producción de cistitis inducida por CFM: la acroleína, metabolito urinario de la CFM, al concentrarse en la vejiga y entrar en contacto con el urotelio, estimula, entre otras, a las fibras ricas en sP y, por estimulación antidrómica, se liberaría este péptido, activando receptores NK1. También se estimularía la producción de citokinas, interleukinas y factor de necrosis tumoral. Esto sería parte de las señales inflamatorias, capaces de estimular la iNOS presente en macrófagos, células epiteliales y endoteliales, con el consecuente incremento en la producción del NO, el cual actuaría como un mediador importante del proceso inflamatorio y de la citotoxicidad producida por la CFM. Los antagonistas de los receptores NK1 bloquearían dicho receptor por lo cual la sP (u otra neurokinina) sería incapaz de activarlos; esto prevendría parcialmente el inicio del proceso, en este caso, inflamación neurogénica en la vejiga urinaria. Los resultados obtenidos con el inhibidor de la síntesis del NO (L-NNA) explican porqué la activación del receptor NK1, sin subsiguiente síntesis de NO, es capaz de iniciar otros procesos mediados por sP, como EPP; sin embargo, al estar inhibida la NOS, tanto la EPP como el daño celular son menores, debido a que no se producen los procesos de destrucción celular mediados por el NO, en la vejiga urinaria. El hecho de que el 7-NI no haya producido cambios en la excreción de nitratos + nitritos refuerza la evidencia que señalan que es la forma iNOS, y no la nNOS la isoforma que juega un papel fundamental en el desarrollo de cistitis por CFM.(Fig.16A) (Fig.16B)(Fig.17)

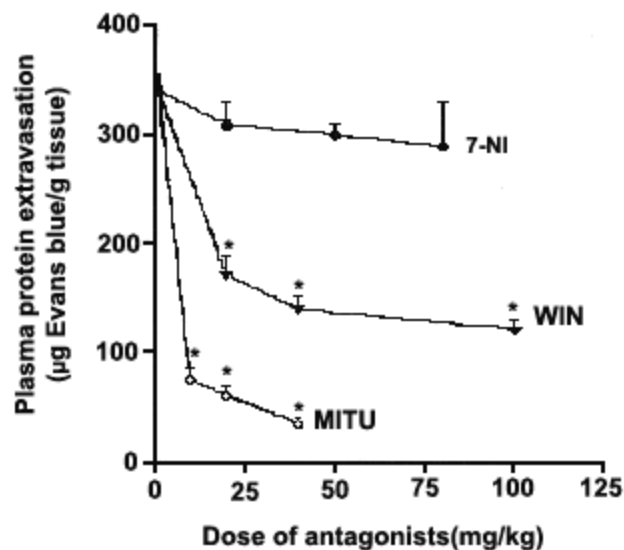


Figura 16.A
Extravasación de proteínas plasmáticas en vejiga.
(Alfieri y col., 2001)

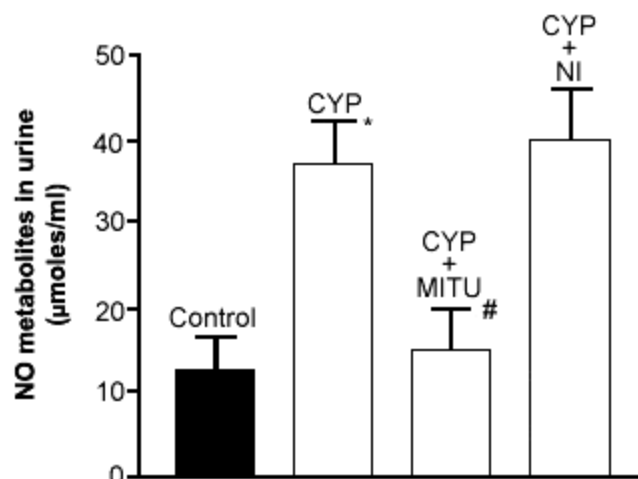


Figura 16.B
Excreción Urinaria de metabolitos del NO.
(Alfieri y col., 2001)

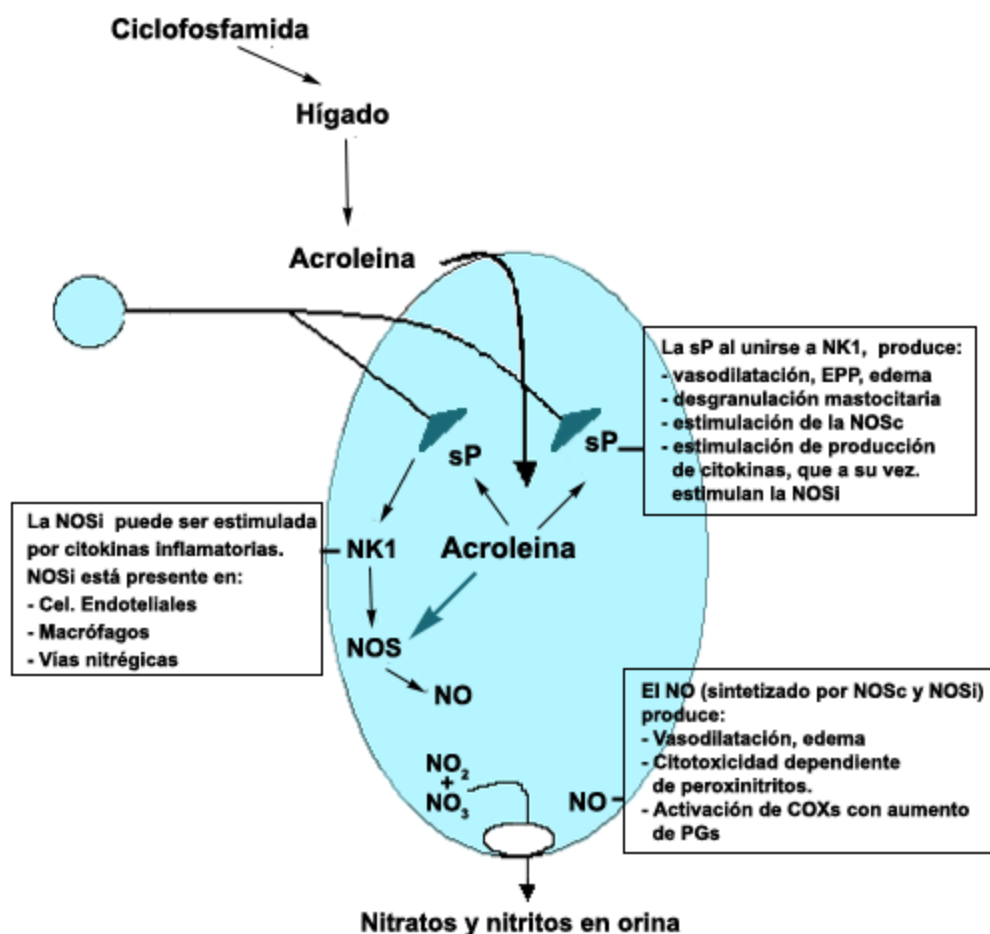


Figura 17
Modelo Propuesto para la Cistitis Neurogénica inducida por Ciclofosfamida
(Alfieri y Cubeddu, 2000; Alfieri y Cubeddu, 2001).

Adicionalmente, puede concluirse que, aunque la sP y el NO son importantes en la producción de la cistitis producida por CFM, otros mecanismos de inflamación diferentes también deben estar operando, ya que la administración conjunta de un antagonista NK1+ el inhibidor selectivo

de la iNOS solo fue capaz de prevenir parcialmente el daño en vejiga urinaria (cuantificado como EPP y por evaluación histológica).

CONCLUSIONES

Los trabajos presentados en esta revisión, cada uno de los cuales ya ha sido discutido, nos demuestra que el NO se ha convertido en el centro de una extraordinaria área de investigación que ha generado en los años recientes una gran cantidad de conocimientos. Está claro que el NO tiene importantes funciones en el sistema cardiovascular, donde las tres isoformas del NOS tienen implicaciones en su fisiología y fisiopatología. La eNOS es importante en la regulación vascular, manteniendo una vasodilatación adecuada y protegiendo la íntima de los agregados plaquetarios y de la adhesión leucocitaria, además de inhibir la proliferación del músculo liso de la pared. La isoforma nNOS del sistema nervioso central y periférico puede también contribuir a regular la presión sanguínea. En las enfermedades asociadas a hipercolesterolemia, diabetes e hipertensión, que están caracterizadas por una disfunción endotelial, se ve reducida la capacidad de vasodilatación mediada por el endotelio. El estrés oxidativo y la inactivación del NO por los aniones superóxido juegan un papel importante en estos estados patológicos. La administración de L-arginina como sustrato de NOS o H4B como cofactor puede aliviar la disfunción endotelial en varias de estas condiciones. Adicionalmente, la eNOS tiene importancia para el mantenimiento del flujo sanguíneo cerebral y la prevención, en cuanto sea posible, del daño neuronal. En la inflamación la iNOS está inducida en la pared vascular por las endotoxinas bacterianas y/o la citoquinas proinflamatorias, produciendo grandes cantidades de NO que actúa como un importante mediador en la vasodilatación arteriolar inducida por agentes citotóxicos.

Las aplicaciones derivadas de las numerosas funciones de esta pequeña e increíble molécula gaseosa han comenzado a materializarse. Las funciones descritas aquí representan solamente el comienzo de la historia que se está escribiendo.

Las diversas funciones del NO también implican que los medicamentos más eficaces sean aquellos que sólo son activos allí donde es necesario. Un ejemplo claro de esto es el uso de NO inhalado en bebés prematuros con hipertensión pulmonar persistente, tratamiento que ha sido un éxito, ya que el NO sólo se aplica al lugar adecuado, es decir, los vasos sanguíneos de los pulmones prematuros, que lo necesitan para absorber oxígeno (Anggard, 1994). El NO inhalado también ha sido usado satisfactoriamente en el tratamiento del Dístors Respiratorio del adulto (Michael y col., 1998). Otra terapia relacionada con el NO que ha tenido gran impacto social es el medicamento para el tratamiento de la impotencia, el sildenafil (Viagra®). Al desactivar una enzima que destruye el GMPc, el sildenafil mantiene la señal de GMPc por más tiempo en los músculos peneanos y dilata los vasos sanguíneos que irrigan el cuerpo cavernoso (Boolell y col., 1996). El desarrollo de este medicamento es el resultado de un trabajo anterior de Ignarro, que demostró que el NO es el neurotransmisor que causa la erección del pene (Ignarro y col, 1990).

Otra área donde está investigando actualmente es aquella donde se persigue producir medicamentos que sólo desactiven una isoforma de la NOS. Ejemplos mencionados y discutidos la presente revisión son aquellos fármacos capaces de inactivar a la iNOS (NOS-2), y que se podrían utilizar para enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Análogamente, medicamentos que desactiven la bNOS (NOS-1), producida en las células cerebrales, se podrían utilizar para reducir la muerte celular y los daños cerebrales que se producen cuando el cerebro libera un

exceso de NO ante una lesión o falta de oxígeno provocada por una embolia cerebral (Li y Billiar, 2000). Ambos tipos de medicamentos deberían evitar la desactivación de eNOS (NOS-3), de forma que la presión arterial y el flujo de la sangre a los tejidos no se vean afectados. En relación con esto, estudios recientes también han evidenciado que en el inicio del proceso de apoptosis está involucrada la citotoxicidad por generación prolongada de NO. Sin embargo, los resultados han indicado que la vías de traducción del NO no estarían solo adaptadas para citotoxicidad, pero también para la protección. La protección por apoptosis iniciada por NO podría producirse como consecuencia de la interacción controlada del NO con radicales superóxido. Esta interacción NO/superóxido sería capaz de redireccionar la actividad apoptótica a una velocidad que puede ser compensada por el glutatión. Adicionalmente, los efectos protectores mediados por el NO puede ser consecuencia de la inducción de transcripción de proteínas de choque térmico, hemoxygenasa-1 y ciclooxigenasa-2, atenuantes del daño celular. En consecuencia, el balance entre los procesos pro- y anti-apoptóticos podría ser regulado o intervenido con moduladores de la síntesis del NO, abriéndose interesantes posibilidades terapéuticas (Taylor y col., 2003).

A nivel de SNC también se han publicado resultados esperanzadores para futuras terapias; por ejemplo, evidencia reciente le ha asignado al NO un papel muy importante en la regulación del proceso de memoria y aprendizaje, al modificar los umbrales necesarios para producir la Potenciación a Largo Plazo (LTP) y la Depresión a Largo Plazo (LTD). De este modo, el NO podría influir sobre la plasticidad neuronal (Hölscher, 1997; Lev-Ram y col., 2002). En esa misma dirección, Peunova ha descrito al NO como un elemento crucial para el desarrollo del tamaño del cerebro y del número de células cerebrales (Peunova y col., 2001). Las implicaciones de estos resultados son importantes para eventuales tratamientos para enfermedades como la de Alzheimer o dificultades de aprendizaje en niños.

Otra área donde hay un gran interés por el papel del NO es la del tratamiento de la drepanocitopenia o anemia falciforme, ya que estudios recientes han demostrado que el NO permite que la hemoglobina anormal o hemoglobina S de las células falciformes ligue oxígeno con mayor afinidad, sin alterar la afinidad en la hemoglobina normal. Ciertos grupos han tenido éxito al probar los efectos de la inhalación de cantidades pequeñas de NO en pacientes con la enfermedad, encontrando que su sangre retiene mas oxigeno y por mas tiempo, después de la inhalación (Lopez y col., 2003; Weiner y col., 2003); también se ha ensayado con terapias a base de L-arginina (Morris y col., 2003). Estos resultados podrían conducir a una curación potencial para la crisis de este tipo de anemia.

En relación al futuro del NO nítrico en biología y medicina, es bueno citar algunas palabras del Prof. Ignarro. Según él asegura, "ya estamos en el futuro. Actualmente muchos expertos se están centrando en los efectos cardiovasculares del NO y en una nueva línea de investigación es la del estudio de sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento tumoral. Se está estudiando si el crecimiento de células tumorales se puede inhibir con aumentos en la concentración del NO, y si la diseminación de estas células puede deberse a un déficit de NO. Por lo tanto, se ha abierto una nueva vía tanto para el desarrollo de medicamentos donantes de NO como para el tratamiento de ciertos tipos de tumores a través de terapia génica". (Redacción, 2003).

Ya comienza a hablarse del NO como el primer representante de una nueva clase o familia de moléculas mensajeras, que podría incluir también al dióxido de carbono (CO₂). Es irónica la idea

de que entidades químicas que eran conocidas solamente por ser dañinas al cuerpo humano, pudieran ser tan importantes para nuestra salud.

Para finalizar...

La historia de cómo se llega a dilucidar la existencia del NO y su función como mensajero, ilustra como convergen descubrimientos aparentemente inconexos e incógnitas no resueltas, para adquirir un significado biológico. Para ejemplificar esta afirmación, es válida la siguiente anécdota: a menos de dos meses de su muerte en diciembre de 1896, Alfred Nobel escribió la siguiente nota a uno de sus colegas: "¡Es una ironía del destino que me hayan recetado nitroglicerina para uso interno! Le llaman Trinitrina, para no alarmar al farmacéutico ni al público". Nobel sufría ataques angina de pecho y la ironía radicaba en que el inventor e industrial sueco había conseguido gran parte de su considerable fortuna a través del desarrollo y la fabricación de la dinamita, también conocida como nitroglicerina, la cual posteriormente comenzó a utilizarse como fármaco vasodilatador; pero solo en los años 70 y 80 del siglo XX, los investigadores consiguieron develar el misterio de la nitroglicerina al darse cuenta de que ésta sufría una serie de reacciones en el organismo para formar al NO. Una avalancha de investigación se generó a partir en esas décadas y para el año 1992 la importancia del NO ya era un hecho claro, por lo cual fue nombrada "Molécula del año" por la revista Science (Koshland Jr., 1992), nombramiento que apareció junto con un controversial artículo titulado "NO news is good news" (Cullotta y Koshland Jr, 1992).

Es importante recordar que un siglo después de la muerte de Alfred Nobel, el premio que se estableció con su fortuna fue concedido a los descubridores del EDRF o NO y de su papel como importante mensajero del organismo, cerrándose de algún modo un círculo que se inició con el descubrimiento de la nitroglicerina. Entre los nombres que se barajaban como posibles ganadores del premio Nobel estaban los de Furchgott, Ignarro, Moncada y Murad. De acuerdo con la limitación que impide que más de tres personas compartan el premio, el 10 de diciembre de 1998, la Fundación Nobel decidió conceder a Furchgott, Ignarro, y Murad el Premio Nobel en Fisiología y Medicina por su participación en el descubrimiento del NO. Esta premiación ocasionó una gran polémica en diversos sectores científicos, en especial latinoamericanos, que consideraron injusta la exclusión de Salvador Moncada, a favor de un trío de investigadores totalmente norteamericano. Sin embargo, la importancia del trabajo de Moncada ha sido y es reconocida implícitamente por la comunidad científica mundial; su revisión "Nitric oxide – physiology, pathophysiology, and pharmacology," aparecido en 1991 en la revista Pharmacological Reviews, ha sido citado unas 7000 veces, convirtiéndolo en uno de los artículos científicos mas citado en los 90, y sin duda, el mas citado en relación al NO.

REFERENCIAS

1. Ahluwalia A, Maggi CA, Santiccioli P, Lecci A y Giuliani S. (1994) Characterization of the capsaicin-sensitive component of cyclophosphamide-induced inflammation in the rat urinary bladder. Br J Pharmacology 111:1017-22.
2. Alfieri A.B. y Gardner C.J. (1997) The NK1 antagonist, GR203040, inhibits cyclophosphamide-induced damage in the rat and ferret bladder. Gen. Pharmacol. 29(2):245-250.

3. Alfieri A.B. y Gardner C. J. (1998) Effects of GR203040 a novel NK1 receptor antagonist, on plasma protein extravasation and damage induced by radiation and cisplatin, in the ferret. *Gen Pharmacol.* 31(5): 741-746.
4. Alfieri A.B. y Cubeddu L.X. (2000). Nitric Oxide and NK1-Tachynin receptors in Cyclophosphamide-induced cystitis, in rats. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* 295(2):824-829
5. Alfieri A.B., Malavé A. y Cubeddu L.X. (2001). Nitric Oxide synthase and Cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Naunyn-Schiedemberg's Arch. Pharmacol.* 363(3):353-357.
6. Alfieri A.B. y Cubeddu L.X. (2001). Oxido nítrico y sustancia P: papel en la cistitis inducida por ciclofosfamida. *Archivos Venezolanos de Farmacología Clínica y Terapéutica* 20(1):44-50.
7. Alfieri A.B., Rodriguez-Plaza LG y Cubeddu LX (2000) Effects of short- and long-term exercise on urinary cGMP excretion in healthy subjects and in patients with coronary artery disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35(6):891-896.
8. Altenkirch HU, Gerzer R, Kirsch KA, Weil J, Heyduck B, Schultes I, Rocker L (1990). Effect of prolonged physical exercise on fluid regulating hormones. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 61(3-4):209-13.
9. Anggard E. (1994) Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet.* 14;343(8907):1199-206.
10. Barnes PJ, Belvisi MG, Robers DF. (1990) Modulation of neurogenic inflammation: novel approaches to inflammatory disease. *Trends in Pharmacol. Sci.* 11:185-9.
11. Bassenge, E. (1996). Endothelial function in different organs. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 39:209-228.
12. Bech JN, Nielsen CB, Ivarsen P, Jensen KT, Pedersen EB (1998) Dietary sodium affects systemic and renal hemodynamic response to NO inhibition in healthy humans. *Am J Physiol.* 1998 May;274(5 Pt 2):F914-23
13. Berrazueta JR (1995). Implicaciones del óxido nítrico en la fisiopatología y la terapéutica de la hipertensión arterial. En: La vía de L-arginina: óxido nítrico, de su descubrimiento a sus aplicaciones clínicas. P. Lopez-Jaramillo, Editor. Ediciones Científicas. Quito. pp 51-88
14. Bigazzi R, Bianchi S, Baldari D, Sgherri G, Baldari G, Campese VM (1994). Microalbuminuria in salt-sensitive patients. A marker for renal and cardiovascular risk factors. *Hypertension.* 23(2):195-9.
15. Blachley JD, Hill JB (1981). Renal and electrolyte disturbances associated with cisplatin. *Ann Intern Med.* 95(5):628-32.
16. Blair SN, Kampert JB, Kohl HW III, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS (1996). Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA* 276:205-210.
17. Blair SN, Kohl HW III, Barlow CE, Paffenbarger RS Jr, Gibbons LW, Macera CA (1995) Changes in physical fitness and all-cause mortality. *JAMA* ,273:1093-1098.
18. Blann AD and Lip GYH (1998). Endothelial integrity, soluble adhesion molecules and platelet markers in type 1 diabetes mellitus. *Diab Med* 15:634-42.
19. Bode-Boger SM, Boger RH, Schroder EP, Frolich JC (1994). Exercise increases systemic nitric oxide production in men. *J. Cardiovasc. Risk.* 1:173-8. MEDLINE]
20. Boneu B, Abbal M, Plante J, Bierme R (1975). Factor VIII-complex and endothelial damage (Letter). *Lancet* 1:1430.
21. Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IH, Gingell C. (1996) Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 8(2):47-52.

22. Borkenstein M y Muntean W (1982). Elevated factor VIII-activity and factor VIII-related antigen in diabetic children without vascular disease. *Diabetes* 31:1006-9.
23. Brady F, Bakhle YS, Bell C (2002). Evaluation of the involvement of nitric oxide and substance P in reducing baroreflex gain in the genetically hypertensive (GH) rat. *Acta Physiol Hung.* 89(4):451-61
24. Breslow MJ, Tobin JR, Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH, Traystman RJ (1993). Nitric oxide as a regulator of adrenal blood flow. *Am J Physiol.* 264(2 Pt 2):H464-9.
25. Bruce AN (1910). Über die Beziehung der sensiblen Nervenendigungen zum Entzündungsvorgang. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Exp. Path. Pharmacol.* 63:424-4334.
26. Calver A, Collier J, Vallance P (1993). Nitric oxide and the control of human vascular tone in health and disease. *Eur J Med.* 2(1):48-53.
27. Campese VM (1994). Salt sensitivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications. *Hypertension.* 23(4):531-50.
28. Carvalho JJ, Baruzzi RG, Howard PF, Poulter N, Alpers MP, Franco LJ, Marcopito LF, Spooner VJ, Dyer AR, Elliott P (1989). Blood pressure in four remote populations in the INTERSALT Study. *Hypertension.* 14(3):238-46.
29. Chapman V y Dickerson AH. (1993) The effect of intrathecal administration of RP 67,580, a potent NK1 antagonist on nociceptive transmission in the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 157:149-152.
30. Chen PY, Sanders PW (1991). L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J Clin Invest.* 88(5):1559-67.
31. Chiarelli F, de Martino M, Mezzetti A, Catino M, Morgese G, Cuccurullo F, Verrotti A. (1999). Advanced glycation end products in children and adolescents with diabetes: relation to glycemic control and early microvascular complications. *J Pediatr.* 134: 486-91
32. Chopra S, Kaufman JS, Jones TW, Hong WK, Gehr MK, Hamburger RJ, Flamenbaum W, Trump BF (1982). Cis-diamminedichloroplatinum-induced acute renal failure in the rat. *Kidney Int.,* 21:54-64.
33. Cirino G, Wheeler-Jones CPD, Wallace JL, Del Soldato P, Baydoun AR (1996). Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by novel nonsteroidal anti-inflammatory derivatives with gastrointestinal-sparing properties. *Br. J. Pharmacol.* 117, 1421-6.
33. Correa RA y Alfieri AB (2003). Plasmatic nitric oxide, but not von Willebrand Factor, is an early marker of endothelial damage in type 1 diabetes mellitus patients without microvascular complications. *J.Diab. Compl.* 11:56-59.
34. Court O, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A (2002). Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care.* 6(6):500-8.
35. Cox PJ (1979) Cyclophosphamide cystitis. Identification of acrolein as the causative agent. *Biochem. Pharmacol.* 28:2045-2049.
36. Culotta E, Koshland DE Jr. (1992) NO news is good news. *Science.* 258(5090):1862-5.
37. Dahl, L.K. (1960). Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. Pp. 53-65 in P. Cottier and K.D. Bock, eds. *Essential Hypertension: An International Symposium.* Springer-Verlag, Heidelberg, Federal Republic of Germany.
38. Dahl, L.K. y Love RA. (1957). Etiological role of sodium chloride intake in essential hypertension in humans. *J. Am. Med. Assoc.* 164:397
39. Daugaard G (1990). Cisplatin nephrotoxicity: experimental and clinical studies. *Danish Med. Bull.* 37: 1-12.

40. DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ. (1975) The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *J Clin Invest.* 1975 Apr;55(4):845-55.
41. De Koninck Y y Henry JL. (1991) SP-mediate slow excitatory postsynaptic potential elicited in dorsal horn neurons in vivo by noxious stimulation. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 88:11344-11348.
42. Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH (1993). Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J. Appl. Physiol.* 75:1354-63.
43. Di Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moncada S (1990). Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 1246.
44. Durante W, Sen AK y Sunahara FA (1988). Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol* 94: 463-467
45. Dusting GJ (1995). Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J. Vasc. Res.* 32:143-161.
46. Ekelund LG, Haskell WL, Johnson JL (1988). Physical fitness as a predictor of cardiovascular mortality in asymptomatic North American men. The Lipid Research Clinics Mortality Follow-up Study. *N.Engl.J.Med.* 319:1379-1384.
47. Elliot P. (1991). Observational studies of salt and blood pressure. *Hypertension.* 17(1 Suppl):13-8.
48. Ferrer D, Jorge C, García Rodríguez RG y Martínez Anglada PF (1998). Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *MEDISAN* 2(3):45-53
49. Ferri C, Bellini C, Desideri G, Giuliani E, De Siati L, Cicogna S, Santucci A (1998). Clustering of endothelial markers of vascular damage in human salt-sensitive hypertension: influence of dietary sodium load and depletion. *Hypertension.* 32(5):862-8.
50. Fontenla JA, Gil J y Villar R (2003) Autacoides II. Péptidos: angiotensina, cininas y otros péptidos. Oxido Nítrico. En "Farmacología Fundamental". Velasco, San Roman, Serrano, Martinez-Sierra y Calavid (Editores) McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España.
51. Forte JG, Miguel JM, Miguel MJ, de Padua F, Rose G (1989). Salt and blood pressure: a community trial. *J Hum Hypertens.* 3(3):179-84.
52. Fraiser LU, Sarathchandra K y Kehrner JP. (1991) Cyclophosphamide Toxicity. Characterising and avoiding the problem. *Drug* 42:781-95.
53. Fujiwara K, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Ozawa Y, Saruta T. (1999). Altered pressure-natriuresis in obese Zucker rats. *Hypertension.* 33(6):1470-5.
54. Fujiwara T, Ohsawa T, Takahashi S, Ikeda K, Okuno A, Ushiyama S, Matsuda K, Horikoshi H (1998). Troglitazone, a new antidiabetic agent possessing radical scavenging ability, improved decreased skin blood flow in diabetic rats. *Life Sci.* 63(22):2039-47.
55. Furchgott RF y Zawadzki JV.(1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:373-376.
56. Furchgott RF, Carvalho MH, Khan MT, Matsunaga K. (1987). Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels.* 24(3):145-9.
57. Galajda P, Martinka E, Mokán M and Kubisz P(1997). Endothelial markers in diabetes mellitus. *Thromb Res* 85: 63-5
58. Gardiner SM, Compton AM, Bennet T, Palmer RMJ y Moncada, S. (1990). Regional haemodynamic changes during oral ingestion of N-monometil-L-arginine or N-nitro-L-arginine methylester in conscious Brattleboro rats. *Br.J.Pharmacol.* 101:10-12.

59. Giraldeho CM, Zappellini A, Muscara MN, De Luca IM, Hyslop S, Cirino G, Zatz R, de Nucci G, Antunes E (1994). Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1994 May 12;257(1-2):87-93. *Eur. J. Pharmacol.* 257: 87.
60. Gosgnach W, Messika-Zeitoun D, Gonzalez W, Philippe M, Michel JB (2000). Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(6):C1880-8.
61. Grimberg-Funes D, Sheldon C y Weiss M (1990). The use of prostaglandin F2 alpha for the prophylaxis of cyclophosphamide induced cystitis in rat. *J. Urol.* 144:1500-1504.
62. Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC (2002). Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes.* 51(10):3120-7.
63. Hars B. (1999). Endogenous Nitric Oxide in the Rat Pons Promotes Sleep. *Brain Research* 816: 209-219.
64. Heath GW, Ehsani AA, Hagberg JM, Hinderliter JM, Goldberg AP (1983). Exercise training improves lipoprotein lipid profiles in patients with coronary artery disease. *Am. Heart J.* 105:889-895.
Herencia F, Ferrándiz ML, Ubeda A, Guillén I, Dominguez JN, Charris JE, Lobo GM, Alcaraz MJ (1999). Novel anti-inflammatory chalcone derivatives inhibit the induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* 453, 129-34.
65. Hibbs JB Jr (1991). Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. *Res Immunol.* 142(7):565-9; discussion 596-8.
Hölscher C (1997). Nitric Oxide, the Enigmatic Neuronal Messenger: Its Role in Synaptic Plasticity. *Trends in Neuroscience* 20(7): 298-303.
66. Holtzer P. (1988) Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: unvolment of tachikinin, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24:739-68.
67. Holtzer P (1991) Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and peripheral inflammation. *Neuroscience* 67(3):
68. Holzmann S (1982). Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP incoronary arterial strips. *J Cyclic Nucleotide Res* 8(6):409-19.
69. Hori O, Yan SD y Schmidt AM (1997). The receptor for advanced glycation endproducts: implications for the development of diabetic vascular disease. En: "The endothelium in clinical practice", Rubanyi G M y Dzau V J, Eds., NYC, USA.
70. Horning B, Maier, V y Drexler H.(1996). Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation* 93:210-214.
71. Huszka M, Kaplar M, Rejto L, Tornai I, Palatka K, Laszlo P (1997). The association of reduced endothelium derived relaxing factor-NO production with endothelial damage and increased in vivo platelet activation in patients with diabetes mellitus. *Thromb Res* 86: 173-180
72. Huynh NT, Tayek JA (2002). Oral arginine reduces systemic blood pressure in type 2 diabetes: its potential role in nitric oxide generation. *J Am Coll Nutr.* 21(5):422-7.
73. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and veins is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:9265-9269.
74. Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. (1990). Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum

smooth muscle.

Biochem Biophys Res Commun. 31;170(2):843-50.

75. Ikenaka H, Suzuki H, Ishii H, Itohl I, Saruta T. (1993). Role of NO on pressure natriuresis in Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int.* 43: 205-211.
76. Iyadomi M, Higaki Y, Ichiba M, Morimoto M, Tomokuni K. (1998). Evaluation of organic solvent-induced inflammation modulated by neuropeptides in the abdominal skin of hairless rats. *Ind Health.* 36(1):40-51;
77. Jaffe EA, Hoyer LW y Nachman RL (1974). Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 1906-9
78. Jancso N, Jancso-Gabor A y Szolcsanyi J. (1967) Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by deervation and by pretreatment with capsaicine. *Br J Pharmacol* 31:138-51.
79. Jungersten L, Wall B, Wennmalm A (1996). Physical fitness regulates nitric oxide formation in healthy man. *Circulation* 94:1497.
80. Kawachi S, Cockrell A, Laroux FS, Gray L, Granger DN, van der Heyde HC, Grisham MB (1999). Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of VCAM-1 expression in gut inflammation. *Am J Physiol.* 277(3 Pt 1):G572-6.
81. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW.(1996) Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res.*;79(3):363-80.
82. Kentsch M, Otter W, Drummer C, Peinke V, Theisen K, Muller-Esch G, Gerzer R (1995). The dihydropyridine calcium channel blocker BAY t 7207 attenuates the exercise induced increase in plasma ANF and cyclic GMP in patients with mildly impaired left ventricular function. *Eur J Clin Pharmacol.* 49(3):177-82.
83. Kingwell BA, Sherrard B, Jennings GL, Dart AM (1997). Four weeks of cycle training increases basal production of nitric oxide from the forearm. *Am J Physiol.* 272(3 Pt 2):H1070-7.
84. Kingwell BA, Tran B, Cameron JD, Jennings GL, Dart AM (1996). Enhanced vasodilation to acetylcholine in athletes is associated with lower plasma cholesterol. *Am J Physiol.* 270(6 Pt 2):H2008-13.
85. Knowles RG, Moncada S (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298 (Pt 2):249-58.
86. Koshland DE, Jr. (1992), The molecule of the year (Editorial) *Science* 258:1861.
87. Koshland DE, Jr (1992) NO news is good news (Molecule of the year) *Science.* 258:1862-1863
88. Krakoff IH (1979) Nephotoxicity of cis-Dichlorodiamminoplatinum (II). *Cancer Treat. Rep.* 63:9-10.
89. Lacchini ML, Lopes AG, Malnic G, Giebisch G (1992) Cisplatinum-induced lesion of proximal tubule acidification in the rat. *Ren Physiol Biochem.* (2):106-12.
90. Lamontagne D, Pohl U, Busse R (1992). Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. *Circ Res.* 70(1):123-30.
91. Laurence W. (2003) Nitric Oxide May Be Just What The Doctor Ordered For Burns <http://www.tamu.edu/univrel/aggiedaily/news/stories/archive/092898-2.html>
92. Li J y Billiar TR. (1999) Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver *Am. J. Physiol.* 276, G1069-73.
93. Li J y Billiar TR. (2000) The role of nitric oxide in apoptosis. *Semin Perinatol.* Feb;24(1):46-50.

94. Lip GYH y Blann A (1997). von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders?. *Cardiovasc Res* 34: 255-65
95. Lopez BL, Kreshak AA, Morris CR, Davis-Moon L, Ballas SK, Ma XL.(2003) L-arginine levels are diminished in adult acute vaso-occlusive sickle cell crisis in the emergency department. *Br J Haematol.* 120(3):532-4.
96. Lopez-Jaramillo P, Terán E Y, de Felix, M. (1995). Alteraciones del endotelio vascular en dislipidemias y aterosclerosis:implicaciones terapéuticas. En: La vía de L-arginina:óxido nítrico, de su descubrimiento a sus aplicaciones clínicas. P.Lopez-Jaramillo, Editor. Ediciones Científicas. Quito. pp 89-135
97. Lowry H. Rosenbrough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent, *J.Biol.Chem*, 193:265-275.
98. Luber-Narod J, Austin-Ritchie T, Hollins C 3rd, Menon M, Malhotra RK, Baker S, Carraway RE. (1997) Role of substance P in several models of bladder inflammation. *Urol Res.* 25(6):395-9.
99. Lundberg J (1996). Airborne nitric oxide: inflammatory marker and autocrine messenger in man. *Acta Physiol. Scand.* 157 (suppl 633):1-27.
100. Luscher TF y Noll G (1995). The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis.* 118 Suppl:S81-90.
101. Lyons CR (1996) Emerging roles of nitric oxide inflammation. *Hosp Pract (Off Ed)* 15;31(7):69-73, 77-80, 85-6
102. MacMahon SW, Macdonald GJ, Blackett RB (1985). Plasma lipoprotein levels in treated and untreated hypertensive men and women. The National Heart Foundation of Australia Risk Factor Prevalence Study. *Arteriosclerosis.* 5(4):391-6.
103. MacMahon S, Peto R, Cutler S, et al (1990) Blood pressure stroke and coronary heart disease: part 1, prolonged difference in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 335; 765-74.
104. Maggi CA (1997). The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Reg. Peptide* 70:75-90.
105. Maggi CA, Patacchini R, Rovero P, Gianchetti A. (1993) Tachykinin receptors and tachykinin receptors antagonists. *J.Auton.Pharmacol.* 13:23-93.
106. Makimattila S, Virkamaki A, Groop P-H, Cockcroft J, Utriainen T, Fagerudd J (1996). Chronic hyperglycemia impairs endothelial function and insulin sensitivity via different mechanisms in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 94:1276-82.
107. Mannarino E, Pasqualini L, Menna M, Maragoni G, Orlandi U (1989). Effects of physical training on peripheral vascular disease: a controlled study. *Angiology* 40:5-10.
108. McCartney-Francis NL, Song X, Mizel DE, Wahl SM (2001). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *J. Immunol.* 166 (4): 2734-40.
109. McNally PG, Watt PAC, Rimmer T, Burden AC, Hearnshaw JR y Thurston H (1994). Impaired contraction and endothelium-dependent relaxation in isolated resistance vessels from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Sci* 87:31-6.
110. Meini S y Maggi CA. (1994). Evidence for a capsaicin-sensitive, tachykinin-mediated, component in the NANC contraction of the rat urinary bladder to nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol.* 112:1123-1131.
111. Meraji S, Jayakody L, Senaratne MPJ, Thomson ABR y Kappagoda T (1987). Endothelium-dependent relaxation in aorta of BB rat. *Diabetes* 36: 978-81

112. Michel T (1999). Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res.* 32(11):1361-6.
113. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38:1709-1715.
114. Moncada S, Palmer RMJ y Higgs EA (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142.
115. Moncada S, Higgs A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329(27):2002-12.
116. Moncada S, Higgs A y Furchgott R (1997). XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev.* 49(2):137-142.
117. Morimoto A, Uzu T, Nishimura M, Kuroda S, Nakamura S, Inenaga T, Kimura G (1997). Sodium sensitivity and cardiovascular events in patients with essential hypertension. *Lancet* 350: 1734-1737.
118. Morris CR, Morris SM, Hagar W, Van Warmerdam J, Claster S, Kepka-Lenhart D, Machado L, Kuypers FA, Vichinsky EP. (2003) Arginine Therapy: A New Treatment for Pulmonary Hypertension in Sick Cell Disease? *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Mar 5 .
119. Musiari L, Ceriati R, Taliani U, Montesi M, Novarini A (1999). Early abnormalities in left ventricular diastolic function of sodium-sensitive hypertensive patients. *J Hum Hypertens.* 13(10):711-6.
120. Nantel F, Rouissi N, Rhaleb NE, Jukic D, Regoli D (1991). Pharmacological evaluation of the angiotensin, kinin, and neurokinin receptors on the rabbit vena cava. *J Cardiovasc Pharmacol.* 18(3):398-405 .
121. Nielsen NE, Ahlner J, Malmstedt J, Ohman KP, Swahn E (1999). Plasma levels of cyclic GMP and endothelin in postmenopausal women with unstable coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 59(5):325-34.
122. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ (1992). Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 90(5):2092-6.
123. Noel AA, Fallek SR, Hobson RW, Duran WN(1995). Inhibition of nitric oxide synthase attenuates primed microvascular permeability in the in vivo microcirculation *J. Vasc. Surg.* 1995, 22, 661-9.
124. Otsuka M y Konishi S (1976). Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. *Nature (Lond.)* 264:83-84.
125. Otsuka M y Yoshioka K. (1993) Neurotransmitter function of mammalian tachikininins. *Physiol. Rev.* 73:229-307.
126. Page LB, Damon A, Moellering RC Jr (1974). Antecedents of cardiovascular disease in six Solomon Islands societies. *Circulation.* 49(6):1132-46.
127. Palmer RMJ, Ferrige AG y Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (London)* 327:524-526.
128. Patel AR, Granger JP, Kirchner KA (1994). L-arginine improves transmission of perfusion pressure to the renal interstitium in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol.* 266(6 Pt 2):R1730-5.
129. Paul-Clark MJ, Gilroy DW, Willis D, Willoughby DA, Tomlinson A (2001). Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. *J Immunol.* 166(2):1169-77.

130. Paul-Clark MJ, Mancini L, Del Soldato P, Flower RJ, Perretti M (2002). Potent antiarthritic properties of a glucocorticoid derivative, NCX-1015, in an experimental model of arthritis Proc Natl Acad Sci U S A. 99(3):1677-82.
131. Pearse A G y Polak JM (1975). Inmunocytochemical localization of substance P in mammalian intestine Histochemistry 41:373-375.
132. Peunova N, Scheinker V, Cline H, Enikolopov G. (2001) Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in Xenopus brain. J Neurosci. 15;21(22):8809-18.
133. Peters RK, Cady LD Jr, Bischoff, Bernstein L, Pike MC (1983). Physical fitness and subsequent myocardial infarction in healthy workers. JAMA 249:3052-3056.
134. Phillips FS, Sternberg SS, Cronin AP y Vidal PM.(1961) Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. Cáncer Res. 21:1577-1589.
135. Poveda JJ, Berrazueta JR, Ochoteco A, Montalban C, Garcia-Unzueta MT, Fernandez C, Pena N, Amado JA. (1998) Age-related responses of vasoactive factors during acute exercise. Horm Metab Res. 30(11):668-72.
136. Raji L (1991). Hypertension, endothelium and cardiovascular risk factors. Am. J. Med. 21(suppl 2A):13S-18S.
137. Ralevic V, Khalil Z, Helme RD, Dusting GJ (1995). Role of nitric oxide in the actions of substance P and other mediators of inflammation in rat skin microvasculature. Eur J Pharmacol 284(3):231-9
138. Redacción (2003) El medico interactivo Enero. La deficiencia de óxido nítrico puede provocar la aparición de enfermedades cardiovasculares <http://www.medinet.com/elmedico/noticias/2000/05/10/n6.htm>
139. Regoli D, Escher E y Mizrahi J. (1984) Substance P: structure activity studies and the development of antagonists. Pharmacology 28:301-320.
140. Regoli D y Nantel F.(1991) Pharmacology of neurokinin receptors. Biopolymers 31:777-783.
141. Regoli D, Boudon A y Fauchere JL (1994). Receptors and antagonists for substance P and related peptides. Pharmacol. Rev. 46:551-599.
142. Regoli D, Nguyen QT, Jukic D (1994). Neurokinin receptor subtypes characterized by biological assays. Life Sci 54(26):2035-2047
143. Ridger VC, Greenacre SA, Handy RL, Halliwell B, Moore PK, Whiteman M, Brain SD (1997). Effect of peroxynitrite on plasma extravasation, microvascular blood flow and nociception in the rat. Br J Pharmacol;122(6):1083-8
144. Rioja I, Ubeda A, Terencio MC, Guillen I, Riguera R, Quintela JM, Peinador C, Gonzalez LM, Alcaraz MJ (2000). An anti-inflammatory ditriazine inhibiting leukocyte functions and expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2. Eur J Pharmacol. 397(1):207-17.
145. Rioja I, Terencio MC, Ubeda A, Riguera R, Quintela JM, Alcaraz MJ. (2002) A new ditriazine inhibitor of NF-kappaB modulates chronic inflammation and angiogenesis. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 365(5):357-64.
146. Rivas-Cabanero L, Montero A, Lopez-Novoa JM (1994). Increased glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin-induced renal failure. Eur J Pharmacol . 270(1):119-21
147. Rhodes P, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S, Rhodes PM (1995) The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. Biochem Biophys Res Commun. 1995 Apr 17;209(2):590-6.
148. Rocchini AP (1994) The relationship of sodium sensitivity to insulin resistance. Am J Med Sci. 1994 Feb;307 Suppl 1:S75-80.

149. Rodriguez-Plaza, Alfieri A.B. y Cubeddu L.X. (1997) Urinary excretion of nitric oxide in runners sedentary individuals and in patients with coronary artery disease: effects of 42 Km marathon, 15 Km race, and cardiac rehabilitation program. *J. Cardiovasc. Risk* 4:367-372.
150. Safirstein R, Miller P, Dikman S, Lyman N Shapiro C (1981). Cisplatin nephrotoxicity in rats: defect in papillary hypertonicity. *Am. J. Physiol.* 241:F175-85.
151. Safirstein R, Miller P, Guttenplan JB (1984). Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int.* 25(5):753-8.
152. Saria A, Lundberg JM, Skofitsch G y Lembeck F (1983). Vascular protein leakage in various tissue induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin histamine and by antigen challenge. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 324:212-218.
153. Schmidt HHHW, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher K-E, Klein MM (1988) Arginine is the physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 154:213-216.
154. Schul R (1995). La familia de las enzimas sintetizadoras de óxido nítrico. En: La vía de L-arginina: óxido nítrico, de su descubrimiento a sus aplicaciones clínicas. P. Lopez-Jaramillo, Editor. Ediciones Científicas. Quito. P23-50.
155. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze HT (1994). Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ. Res.* 74:349-53.
156. Shen W, Zhang X, Zho G, Wolin MS, Sessa W, Hintze TH (1995). Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. *Med. & Sci. Sport & Exercise* 27:1125-34.
157. Smith JH y Hook JB (1982) Experimental nephrotoxicity in vivo. En: Nephrotoxicity. Assessment and pathogenesis. Proceedings of the international symposium on Nephrotoxicity, John Wiley & sons, UK. Pp 117-127
158. Stamler R, Stamler J, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH (1978). Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening in one million Americans. *JAMA* 240: 1607-10.
159. Stehouwer CDA, Stroes ESG, Hackeng WHL, Mulder PGH y Den Ottolander GJH (1991). von Willebrand factor and development of diabetic nephropathy in IDDM. *Diabetes* 40: 971-6.
160. Stehouwer CDA, Nauta JJP, Zeldenrust GC, Hackeng WHL, Donker AJM y Den Ottolander GJH (1992). Urinary albumin excretion, cardiovascular disease, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 340: 319-23
161. Stehouwer CDA, Fischer HRA, van Kuijk AWR, Polak BCP y Donker AJM (1995). Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes* 44: 561-4
162. Suárez-Munguía PJ. (2000) Liberación de óxido nítrico inducida por el flujo sanguíneo. Novedades y perspectivas de investigación. *Arch. Inst. Cardiol. Mex* 70: 197-202.
163. Szabo C, Dawson VL (1998). Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci.* 19(7):287-98
164. Taddei S, Virdis A, Mattei P y col. (1996). Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation* 94:1298-1303.
165. Taylor EL, Megson IL, Haslett C, Rossi AG. (2003) Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 10(4):418-30.
166. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-86

167. Thomsen K (1977). The renal handling of lithium: relation between lithium clearance, sodium clearance and urine flow in rats with diabetes insipidus. *Acta Pharmacol Toxicol* (Copenh). 40(4):491-6.
168. Thomsen K, Olesen OV (1984). Renal lithium clearance as a measure of the delivery of water and sodium from the proximal tubule in humans. *Am J Med Sci*. 288(4):158-61.
169. Towler, P.K.; Bennett, G.S.; Moore, P.K.; Brain, S.D. (1998) Neurogenic oedema and vasodilatation: effect of a selective neuronal NO inhibitor. *Neuroreport*. 11;9(7):1513-8.
170. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG (1995) Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*. 269(6 Pt 1):C1371-8.
171. Vallance P (1998). Nitric oxide in the human cardiovascular system--SKB lecture 1997. *Br J Clin Pharmacol*. 45(5):433-9.
172. Vallance P, Collier J (1994). Fortnightly review Biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ*. 309(6952):453-7.
173. Vanhoutte PM (1991). Hypercholesterolaemia, atherosclerosis and release of endothelium-derived relaxin factor by aggregating platelets. *Eur.Heart J*. 12 (supple.E):25-32.
174. Waynforth HB y Fleckenell PA (1992). Experimental and surgical techniques in the rat. Associated Press, NYC1992
175. Weinberger MH (1991). Salt sensitivity as a predictor of hypertension. *Am J Hypertens*. 4(11):615S-616S.
176. Weiner DL, Hibberd PL, Betit P, Cooper AB, Botelho CA, Brugnara C. (2003) Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA* 289(9):1136-42.
177. Whittle BJ (1995). Nitric oxide in physiology and pathology. *Histochem J*. 27(10):727-37
178. Williams SB, Goldfine AB , Timimi FK , Ting HH, Roddy MA , Simonson DC (1998). Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* 97:1695-1701.
179. Winston JA y Safirstein R (1985). Reduced renal blood flow in early cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Am J Physiol* 249(4 Pt 2):F490-6.
180. Wu G y Meininger CJ (1995). Impaired arginine metabolism and NO synthesis in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol* 269: H1312-8.
181. Yaqoob M, Patrick AW, McClelland P, Stevenson A, Mason H, White MC (1993). Relationship between markers of endothelial dysfunction, oxidant injury and tubular damage in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Sci* 85: 557-62
182. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol*. 1996;10(3-4):291-3