

Óxido nítrico: un campo abierto para la angiología y la cirugía vascular

M. Barbosa Barros

NITRIC OXIDE: OPEN FIELD TO ANGIOLOGY AND VASCULAR SURGERY

Summary. Objective. We aim, with this collection of the last publications about this subject, to promote to the angiologists and vascular surgeons their continuous formation. Development. The biochemistry, formation and regulation, actions, possible uses and clinical relevance of the nitric oxide molecule, which is synthesized by most mammal cells and has both systemic and local vasoactivity, are described in this work. Conclusion. As It has been increasingly demonstrated, the success of nitric oxide in many areas of medicine, especially in the field of vascular medicine, allows us to suggest an endogenous-response manipulatory therapy for this molecule aiming better results on our field of work. [ANGIOLOGÍA 2002; 54: 472-91]

Key words. Atherosclerosis. Endogenous response. Endotelium. L-arginine. Nitric oxide. Vasodilation.

Introducción

¿Por qué la naturaleza eligió al óxido nítrico (NO) para realizar tantas funciones biológicas críticas? ¿Qué posee esta molécula altamente reactiva y de vida breve que le permite asumir funciones tan diversas? ¿Cómo puede una célula llevar a cabo la compleja oxidación que convierte al átomo de nitrógeno de un único aminoácido en NO? Y por último, ¿cuántas funciones fisiológicas y fisiopatológicas se le han atribuido al NO? Muchas de las respuestas a estas cuestiones, pero no todas, se descubrieron gracias a las investigaciones realizadas en los últimos 15 años. El interés evidente y la importancia del NO en la medicina y la biología es fácil-

mente demostrable al citar que sólo en 1993 se publicaron en la bibliografía biomédica alrededor de 2.000 estudios sobre el NO. Este diluvio de hallazgos científicos se retrasó algunos años desde la primera investigación, publicada por Stuehr y Marletta en 1985 [1], que demostró la síntesis del NO en una célula de mamífero. Estos investigadores mostraron que los macrófagos murinos activados producían nitrito y nitrato. El reconocimiento de la enorme importancia del descubrimiento del NO culminó en 1992, cuando fue bautizado como 'la molécula del año' por la revista *Science* [2].

La aterosclerosis es una de la principales causas de morbilidad y mortalidad en América. La insuficiencia arterial resultante de

Departamento de Cirugía Vascular Periférica. Hospital de Clínicas. Universidad Federal de Paraná. Paraná, Brasil.

Correspondencia:
Dr. Marcello Barbosa Barros. Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Av. del Campo Charro, s/n. E-37007 Salamanca. E-mail: marcellobb@bol.com.br
© 2002, ANGIOLOGÍA

las lesiones flujolimitantes puede conducir a disfunciones miocárdicas, renales, mesentéricas y de las extremidades. El tratamiento para estas lesiones arteriales ateroscleróticas incluye angioplastia y puentes (*bypass*) arteriales. Tales terapias están limitadas por la aparición de la hiperplasia intimal (HI), que reduce de manera significativa la mejora hemodinámica. Una serie de agentes farmacológicos con propiedades anticoagulantes y antiplaquetarias han resultado ineficaces en la disminución de la incidencia y grado de la reestenosis. Dada la magnitud de la población de pacientes afectados por HI, se ha convertido en una necesidad enorme la puesta a punto de una terapia que reduzca de manera eficaz tal incidencia [3].

Prácticamente todas las células estudiadas hasta ahora tienen la capacidad de sintetizar NO mediante una de las tres isoformas distintas de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) aisladas hasta el momento. Dependiendo del lugar de producción, de la cantidad de NO sintetizado y de los destinos locales, esta molécula puede desempeñar diferentes funciones. Por ejemplo, la pequeña cantidad de NO liberada en la terminación nerviosa actúa como un neurotransmisor, al regular procesos como la relajación esfinteriana en el tracto gastrointestinal o la neurotransmisión en el sistema nervioso central (SNC). Una cantidad similar de NO en el endotelio vascular regula el estado de relajación del músculo liso adyacente. En cambio, cantidades mayores de NO liberadas por la célula, en respuesta a citocinas, puede acabar con patógenos y, en otros casos, destruir o proteger tejidos del huésped. El lugar, duración y cantidad del

NO producido depende por completo de la isoforma de la NOS responsable de su formación. En este trabajo se apuntan las respuestas a las cuestiones centrales mencionadas anteriormente y se discutirá la relevancia para la medicina clínica del NO.

Características peculiares de la molécula

Para entender por qué el NO fue escogido por la naturaleza para desempeñar tantas y tan diversas funciones nos debemos fijar en primer lugar en las características físicas de esta molécula. La combinación enzimática de un único átomo de nitrógeno con uno de oxígeno da lugar al producto sintético más pequeño de las células mamíferas. Así, el resultado es una molécula con un par de electrones separados en una frenética búsqueda de otra molécula que pueda aceptarlos [4,5]. Las moléculas diana incluyen oxígeno, otros radicales, agrupaciones tiol y metales. En un ambiente rico en estas moléculas, el NO tendrá una semivida extremadamente corta, de segundos o incluso menos. Mientras interactúa con el oxígeno, dando lugar a nitritos y nitratos e inactivando la molécula, interactúa también con otros radicales, tioles o metales como el hierro. La combinación del NO con superóxidos produce otros radicales, entre ellos el peroxinitrato, dióxido de nitrógeno o hidroxilos, que tienen la capacidad de lesionar las células diana; por el contrario, el NO puede suministrar un mecanismo de 'desintoxicación' de los otros radicales. Al interactuar con grupos férricos o tiólicos en proteínas, puede formar com-

plejos que activen o inactiven las células diana. De esa manera, el NO activa una de sus principales enzimas diana, la guanilato ciclasa soluble, fenómeno que aumenta la concentración intracelular de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). La activación hemodependiente de esta enzima por el NO da lugar a una vasorrelajación y neurotransmisión en el SNC. En condiciones de una elevada síntesis de NO, una serie de enzimas pueden ser inhibidas por la interacción NO-enzima [4,5]. Por ejemplo, la enzima glucolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es inactivada por la nitrosilación en un lugar activo de un grupo tiol, frente al que el NO reacciona [6,7], mientras que la aconitasa [8] del ciclo de Krebs y la nicotina adenina dinucleótido (NADH):ubiquinona oxidoreductasa y succinato:ubiquinona oxidoreductasa de la cadena transportadora de electrones son inhibidas cuando el NO ataca al hierro de las agrupaciones Fe-S, esenciales para el funcionamiento de estas enzimas [9,10]. La inhibición de éstas y de otras enzimas (Tabla I) acredita el mecanismo por el cual el NO generado por citocinas puede inhibir el crecimiento de las células diana, células tumorales o linfocitos. Esta capacidad para activar o inhibir enzimas u otras proteínas celulares puede ser importante en la regulación celular en los estados de alta síntesis de NO. Un ejemplo excelente es el papel del NO en la regulación del metabolismo intracelular del hierro, donde se demostró su papel modulador en la regulación posttranscripcional de los genes implicados en la homeostasis del hierro [11].

Aunque la mayoría de las acciones del NO sean locales, esta molécula aún posee

Tabla I. Blancos enzimáticos del óxido nítrico.

Enzima	Función
Activación	
Guanilato ciclasa soluble	Formación de GMPc
Ciclooxigenasa	Síntesis de eicosanoides
Inactivación	
Aconitasa	Ciclo TCA
NADH:ubiquinona oxidoreductasa	Transferencia de electrones
Succinato:ubiquinona oxidoreductasa	Transferencia de electrones
Ribonucleótido reductasa	Síntesis de ADN
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Glucólisis y gluconeogénesis
Citocromo P450	Biotransformación
NADPH oxidasa	Generación de radicales de O ₂
Ciclooxigenasa ^a	Síntesis de eicosanoides

^a La ciclooxigenasa de tipo inducible parece ser activada por las bajas concentraciones de NO, mientras que concentraciones más altas pueden inhibir las otras ciclooxigenasas.

la capacidad de emigrar rápidamente a los lugares donde se encuentran las moléculas diana, frecuentemente en células adyacentes. Por ejemplo, el NO derivado del endotelio relaja el músculo liso adyacente, y el derivado de los leucocitos extermina los organismos fagocitados. Por lo tanto, el NO debe atravesar las membranas. Aquí, el NO es de nuevo único en esta función. A diferencia de muchos productos secretados, que usan transportadores específicos de la membrana, el NO es tan lipofílico que se difunde rápidamente a través de ella (Figura). Si el mensajero local célula-célula perfecto se define como 'una molécula que se difunde

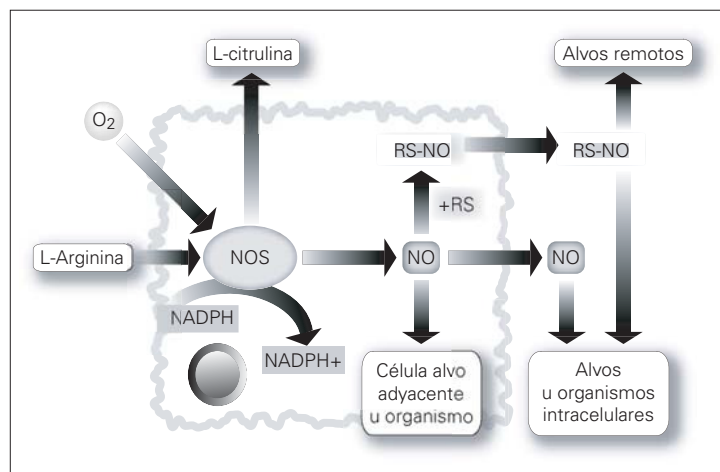


Figura. La síntesis y el destino del NO en las células. El óxido nítrico (NO) es producido por la enzima NO sintetasa (NOS). El NADPH constituye la fuente de electrones, y el oxígeno molecular se incorpora formando NO y L-citrulina, el coproducto de la formación del NO. Una vez formado, el NO puede difundirse hacia los blancos o destinos dentro de la célula, en el espacio extracelular o en células u organismos adyacentes. El NO, que generalmente tiene una vida corta, puede formar compuestos estables por la interacción con grupos tiol en proteínas de transporte o de almacenamiento (RS). Este NO estable es el que ejercerá una acción local o a distancia.

de manera rápida, célula a célula, con una pequeña diseminación y duración de la acción, pero consiguiendo una alta actividad biológica, entonces el NO cumple perfectamente con esta descripción.

¿La diseminación del NO se limita realmente al ambiente local? Al contrario de lo que se pensaba, el NO libre se puede consumir e inactivar rápidamente tanto en su lugar de producción o en la circulación, al interactuar con el grupo hemo de la hemoglobina, como puede circular o difundir hacia lugares remotos. Esto se produce gracias a la capacidad de interactuar con la albúmina o glutatión en la forma de nitrosioles estables, como demostraron Stamler et al [12]. Estos curiosos hallazgos abren nuevas posibilidades para el NO en procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Este proceso puede no estar limitado a su transporte extracelular. Molina et al [13] sugirieron que los niveles elevados de subu-

nidades de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en las plaquetas actúan como un almacén intracelular y sistema de transporte para el NO. Por el momento, aún se desconoce si las mayores cantidades de NO en forma de compuestos estables pueden producirse o almacenarse y después transferirse hacia lugares remotos, aunque las posibilidades de esa acción similar a la acción hormonal son intrigantes.

Formación del óxido nítrico

La L-arginina constituye el único sustrato para la síntesis de NO en los sistemas biológicos. Este aminoácido fue seleccionado por la naturaleza porque contiene dos nitrógenos en el radical guanidina químicamente equivalentes que, fácilmente, aceptan electrones en el proceso de oxidación que da lugar a la formación del NO. Como ya se ha mencionado, esta reacción es efectuada por una de las tres isoformas de la NOS. En esta oxidación de cinco electrones, el NADPH actúa como donante del NO, el oxígeno deriva del oxígeno molecular, N^G -hidroxil-L-arginina se forma como un intermediario de vida corta y la citrulina como un coproducto [4,5] (Figura). El descubrimiento de la caracterización de las tres isoformas de la NOS conocidas fue esencial para comprender las regulaciones y funciones del NO. Cada isoforma exhibe patrones de expresión únicos, mecanismos de regulación peculiares y patrones especializados de la síntesis de NO. En los últimos tiempos, se han producido importantes avances en el campo de la regulación gracias a la definición de las características peculiares de cada isoform-

ma (Tabla II). Estas tres formas tienen en común que producen NO a partir de L-arginina y que todas utilizan flavina mononucleótido, flavina adenina dinucleótido, tetrahidrobiopterina (BH₄) y protoporfirina-IX-hemo como cofactores. Las flavinas, aparentemente, almacenan y transfieren electrones al grupo hemo durante el proceso de oxidación [14]. La tetrahidrobiopterina parece ser importante para mantener la enzima en su forma dimerica activa [15]. Más relevantes que sus semejanzas son sus diferencias. En primer lugar, en los humanos cada una de ellas es el producto de un único gen que comparten, aproximadamente, un 50% de homología en los aminoácidos [16-18]. Dos de estas enzimas se encuentran siempre presentes en la célula y se denominan constitutivas (cNOS), mientras que la tercera isoforma, la NOS inducible (iNOS), se expresa en las células tan sólo después de su estimulación por las citocinas, microbios o productos microbianos. La distribución tisular de cada una de las tres isoformas es peculiar y se discutirá en el próximo apartado. Otra diferencia muy importante guarda relación con la regulación de las isoformas. Ambas isoformas cNOS se activan sólo cuando el calcio liberado en la célula forma complejos de calmodulina y se une a la enzima. La unión de la calmodulina permite el paso de electrones de los grupos flavina al grupo activo hemo [14]. Por lo tanto, las cNOS son activadas por estímulos que aumentan los niveles de calcio intracelular. En cambio, la iNOS posee una unión fija a la calmodulina durante todo el tiempo, circunstancia que permite a la enzima ser prácticamente insensible a las concentraciones de calcio y mantenerla en es-

Tabla II. Características de las isoformas de la NOS.

Características comunes		
Sustrato	L-arginina	
Cofactores	NADPH, FAD, FMN, BH ₄	
Grupo hemo	Protoporfirina IX	
Estructura enzimática	Homodímeros	
Características no comunes		
	cNOS	iNOS
Expresión	Siempre presente	Necesita inducción
Factor limitante	Ca ²⁺ /calmodulina	Disponibilidad de sustrato y cofactor
Cantidad de producción	Pequeña/intermitente	Grande/sostenida
Localización cromosómica	ecNOS: 7 ncNOS: 12	17

NADPH: nicotidamida adenina dinucleótido fosfato; FAD: flavina adenina dinucleótido; FNN: flavina mononucleótido; BH₄: tetrahidrobiopterina; cNOS: NOS constitutiva; ecNOS: cNOS endotelial; ncNOS: cNOS neuronal; iNOS: NOS inducible.

tado activo [19]. Por ese motivo, la cantidad de NO generado por una célula que expresa la iNOS estará limitada únicamente por la cantidad de enzima y la disponibilidad de sustratos y cofactores con el BH₄ y el NADPH. Basándonos en estas características reguladoras, no es sorprendente que pequeñas cantidades de NO liberadas de manera intermitente por la isoforma cNOS participen en los procesos celulares de señalización fisiológicos (neurotransmisión), mientras que grandes cantidades generadas de manera prolongada tras la exposición a las citocinas se destinan a funciones más difusas relacionadas con la infección o inflamación (actividad antimicrobiana o protección tisular). Los aspectos únicos del

NO generado por cada isoforma en la salud y la enfermedad se discutirán en el próximo apartado.

Recientemente, se ha descubierto que el NO también puede derivar de fuentes que no son las NOS. Se sabe desde hace algún tiempo que bacterias de la cavidad bucal reducen el nitrato (NO_3^-) de la dieta a nitritos (NO_2^-), de una forma similar a las bacterias en la orina infectada, utilizando la enzima nitratorreductasa [20]. El NO y otros óxidos de nitrógeno se producen entonces a partir del NO_2^- en el medio ácido-reductor del estómago [21]. En condiciones ácidas, el NO_2^- se convierte en ácido nitroso y, por lo tanto, en óxidos de nitrógeno, entre ellos el NO. La presencia de un agente reductor, como el ácido ascórbico, facilita la producción del NO por la reducción rápida del ácido nitroso [22]. Un sistema similar de producción del NO se demostró en la superficie de la piel. En las glándulas sudoríparas el NO_3^- se convierte en NO_2^- y la superficie ácida de la piel lo convierte en NO [23].

Recientemente se ha descubierto otra vía implicada en la producción de NO. Los neutrófilos activados pueden convertir NO_2^- , mediante la vía de la cadena dependiente de la mieloperoxidasa, en oxidantes inflamatorios: cloruro de nitrilo (NO_2Cl) y dióxido de nitrógeno (NO_2) [24]. Éstos pueden actuar como fuentes de NO.

Óxido nítrico en la salud y en la enfermedad: el papel de las isoformas enzimáticas

cNOS en el endotelio vascular

En 1980, Furchgott y Zawadzki [25] describieron la relajación de los vasos san-

guíneos en respuesta a la acetilcolina, sólo en el caso de que el endotelio estuviera presente. De manera retrospectiva, la actividad biológica de este dilatador altamente lábil y difusible, denominado factor de relajación derivado del endotelio (FRED), es muy parecida a la del NO. De hecho, utilizamos fármacos liberadores de NO hace algunos años (nitroprusiato, nitroglicerina) para promover la vasorrelajación temporal. Mientras tanto, en 1987 se identificó el NO como sustancia vasorrelajadora [26,27]. La importancia de este proceso en la regulación del tono vascular en humanos se demostró en 1989, cuando Vallance et al mostraron que la infusión de un inhibidor del NOS en la arteria braquial de voluntarios humanos producía una reducción acentuada del flujo [28]. Actualmente, sabemos que el NO derivado del endotelio emana de la eNOS endotelial (eNOS) anclada en el plasma y la membrana microsomal [29]. Se ha verificado que la fosforilación de la enzima conlleva su desprendimiento de la membrana y su inactivación [29]. Factores físicos, como un estrés leve, aumentan la expresión genética de la enzima [30]. La región promotora del gen eNOS humano contiene un elemento susceptible a estreses leves, hecho que sugiere que la expresión genética de la eNOS y, en consecuencia, la capacidad para vasorrelajaciones mayores, pueden sobrevenir al aumentar los estreses leves [31]. El factor de necrosis tumoral (FNT) tiene el efecto opuesto: la disminución de la expresión de la eNOS [32]. Como consecuencia del hecho de que tanto las citocinas como el FNT aumentan la expresión de la isoforma de alta producción, iNOS, esta re-

gulación negativa puede conducir a la compensación parcial del aumento del NO derivado de la iNOS. Los activadores farmacológicos de la ecNOS incluyen acetilcolina, bradicinina, histamina e iones de calcio. La liberación local de las sustancias vasoactivas (histamina) debe tenerse en cuenta en la vasodilatación observada en reacciones inflamatorias agudas. Se sugirió que el lipopolisacárido (LPS) puede causar un aumento inmediato en la actividad de la ecNOS de las células endoteliales, como resultado de un aumento del cofactor BH₄ [33]. El descubrimiento de que la citrulina se puede convertir de manera retrógrada en L-arginina en las células endoteliales sugiere que la producción puede no ser dependiente únicamente de la disponibilidad luminal de este aminoácido, puesto que la síntesis endógena de la arginina también puede suministrar el sustrato [34].

La importancia del NO endotelial no se limita únicamente a su papel vasodilatador. El NO previene la agregación y adherencia plaquetaria [35,36], así como también la agregación neutrofílica [37] en el endotelio normal. También está claro que es capaz de actuar en la regulación de los cambios de la permeabilidad endotelial [38] y en la supresión de la proliferación del músculo liso subyacente [39]. Esta función se pierde tras el daño o pérdida endotelial, situaciones asociadas a la hiperplasia intimal y proliferación del músculo liso como parte del proceso de reparación que se sigue en los procedimientos de cirugía vascular. Datos recientes indican que la expresión de la iNOS (la isoforma de alta producción) en el músculo liso vascular, en los lugares sometidos a angioplastia, es

parte de la respuesta a la lesión [40]. Los aumentos de la síntesis de NO son comunes en el proceso de reparación de los vasos lesionados. La importancia del NO para el éxito de la cirugía cardíaca o vascular no debe permanecer desconocido: el papel de las acciones de esta molécula, en contraste con otras moléculas vasoactivas, en las anastomosis, pero especialmente en la microanastomosis y en los conductos vasculares, es probablemente clave para este éxito. Propuestas futuras para aumentar el grado de durabilidad de los injertos tienden a incluir planteamientos para aumentar la síntesis o la liberación local de NO.

Evidentemente, la síntesis deteriorada del NO por el endotelio puede tener otras consecuencias adversas. A través de la pérdida de la función de relajación vascular, el NO endotelial reducido puede contribuir a la aparición de la hipertensión esencial. Algunos estudios en humanos con hipertensión esencial [41] y en ratas espontáneamente hipertensas [42] han señalado que la síntesis del NO podría estar reducida. La consecuencia de la pérdida de la actividad antiplaquetaria y la antiproliferación del músculo liso endotelial podrían contribuir a la disfunción vascular progresiva y a la aparición de las lesiones observadas en enfermedades como la diabetes mellitus y la aterosclerosis [43,44]. Como resultado del importante papel que el NO desempeña en la función vascular, resulta obvio que las alteraciones en la síntesis del NO afectarán tanto a la enfermedad vascular como a la consecuencia de los procesos vasculares patológicos.

De hecho, estudios recientes con transferencia mediada por adenovirus del gen productor de la ecNOS en ratas han de-

mostrado que la expresión de esta enzima puede restaurar la producción del NO vascular y reducir la HI, resultantes de la lesión por la sonda de las carótidas de los roedores [45,46] e ilíacas porcinas [45]. Asimismo, la transferencia del gen de la iNOS humana mediante el adenovirus para injertos venosos porcinos redujo la HI, fundamentalmente en la anastomosis distal, en un 65% ($p=0,0005$), en comparación con los controles [47].

Recientemente, se ha descubierto una vía independiente de las NOS para la producción del NO. Se sabe, gracias a los estudios con inhibidores de la NOS, que el NO dependiente de estas enzimas se forma tras lesiones postisquemia/reperfusión, y esto puede ser tanto beneficioso como perjudicial. Sin embargo, Zweier et al [48] identificaron un camino no enzimático para la producción del NO a través de un modelo de lesión por isquemia/perfusión en el músculo cardíaco. Un aumento en la formación del NO a partir del $^{15}\text{NO}_2^-$ se correlacionó con un incremento en la duración de la isquemia y la disminución del pH [49]. En un estudio posterior, el mismo grupo demostró que la reducción del NO_2^- a NO aumentaba 100 veces bajo condiciones ácidas del tejido isquémico [49]:



Además del pH ácido, se descubrió que el tejido isquémico contenía equivalentes reductores no enzimáticos que reducen el NO_2^- a NO y aumentan la producción de NO de 40 a 40.000 veces, cifra que supera los valores fisiológicos máximos posibles generados por las NOS. Existen eviden-

cias que sugieren que la producción del NO independiente de las NOS desempeña un papel en las lesiones por isquemia/reperfusión en el músculo cardíaco [48].

cNOS en las células neuronales

Se ha localizado una cNOS diferente de la endotelial en muchos lugares del SNC y del sistema nervioso autónomo (SNA): la cNOS neuronal (ncNOS) [50]. A diferencia de la ecNOS, la forma neuronal se encuentra únicamente en el citosol celular, mientras que, al igual que la ecNOS, la ncNOS siempre está presente, aunque sólo se activa cuando el complejo calcio-calmodulina se une a la enzima. En el SNC esto ocurre cuando el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) de la terminación postsináptica es estimulado [51]. El NO generado se difunde por la terminación presináptica, donde sus efectos se ejercen mediante la estimulación de la guanilato ciclasa, con aumento del GMPc [50]. Informes recientes sugieren que esto puede influir en la síntesis de otros neurotransmisores, como el glutamato y la norepinefrina [52] en el SNC. Las funciones del NO en el SNC parecen ser importantes para la respuesta a los aminoácidos excitadores [53]. Bajo la estimulación prolongada o excesiva del receptor NMDA por aminoácidos excitadores, se promueve la toxicidad neuronal. Se verifica que sea mediada por el NO [54] y que pueda implicar a la activación de la poli-ADP-ribosa sintetasa, por el ADN dañado por el NO, lo que da lugar a la creación de un ciclo inútil de consumo celular de NADPH [55]. Tal mecanismo puede originar un daño neuronal mediado por el NO en los derrames. Se desconocen si existen esta-

dos de deficiencia de ncNOS en el SNC, sin embargo, como esta compleja historia aún es confusa, el NO parece ser una parte clave en la función del SNC.

En 1989, Gilliespie et al [56] y Ramagopal y Leighton [57] postularon que el NO era un neurotransmisor en una clase de neuronas autonómicas periféricas, denominadas neuronas no adrenérgicas, no colinérgicas (NANC). Desde entonces, se han atribuido funciones importantes a las neuronas periféricas, las cuales liberan NO como neurotransmisor en los sistemas gastrointestinal, urogenital y vascular. En el tracto gastrointestinal (TGI), el NO liberado por las neuronas en el plexo mioentérico da como resultado la relajación del músculo liso intestinal. Estas acciones parecen ser especialmente importantes en la zona esfinteriana: el píloro [58], el esfínter esofagogástrico [59] y el de Oddi [60]. Se demostró que los niños con estenosis pilórica presentaban neuronas mioentéricas deficientes en ncNOS en el píloro [58]. Esta deficiencia condujo, aparentemente, a la hipertrofia y contracción tónica del músculo. Un mecanismo similar puede ser la base de algunas alteraciones observadas en la acalasia [59]. El porqué de que estas neuronas presentasen esta enzima se desconoce. Numerosos estudios en el TGI caracterizan el NO como regulador de la motilidad intestinal. Estas importantes observaciones permitieron realizar avances considerables en el entendimiento de los trastornos de la motilidad intestinal y, quizá, conduzcan a tratamientos clínicos específicos.

Un segundo papel importante del NO como neurotransmisor en la periferia es la erección del pene. La estimulación eléc-

trica de neuronas pélvicas da como resultado la liberación de NO y la erección. La cNOS neuronal se localiza en los ganglios y axones neuronales, inerva el cuerpo cavernoso humano [61,62] y la falta de NO puede ser responsable de algunos tipos de impotencia. Estas observaciones críticas nos pueden permitir encontrar una manera de tratar la impotencia masculina causada por estados de deficiencia de NO, simplemente mediante un suministro exógeno de éste. Por el contrario, puede utilizarse el bloqueo de la actividad de la ncNOS para revertir el priapismo.

Expresión de la iNOS en la infección y la inflamación

Aunque las células no estimuladas no expresen la iNOS, la capacidad de expresar esa enzima está extendida. Los ejemplos incluyen, aunque no se limitan, a macrófagos, condrocitos, neutrófilos, hepatocitos, células musculares lisas de los vasos e islotes pancreáticos de murinos. La expresión es el resultado de la exposición de las células a citocinas, microbios o productos microbianos [63,64]. Una característica distintiva de casi todas las células que expresan la iNOS es el fuerte sinergismo ejercido por numerosos agentes simultáneos, aunque las señales efectivas puedan variar de célula a célula. Por ejemplo, los macrófagos murinos responden de manera significativa a una combinación de lipopolisacárido (LPS) e interferón- γ [1], las células del músculo liso vascular a la interleucina 1 [65], mientras que los hepatocitos precisan de la exposición simultánea a la interleucina 1, factor de necrosis tumoral (TNF), interferón- γ y LPS para que muestren un alto nivel de expresión [66,67]. Se ha de-

mostrado que la inducción de la iNOS en macrófagos murinos incluye la activación de la transcripción de su gen mediante la unión de factores transcripcionales específicos a la región 5' del flanco del gen [68,69]. Datos recientes corroboran que el FNkB desempeña un papel en la expresión inducida por el LPS de la iNOS, pero es probable que la regulación de la expresión genética implique mecanismos sinérgicos complejos tanto desde el punto de vista transcripcional como postranscripcional [70]. Por ejemplo, los esteroides que inhiben la expresión de la iNOS, probablemente bloqueen la transcripción, mientras que otros inhibidores potentes, al transformar el factor de crecimiento- β , reducen tanto el ARNm de la iNOS como su estabilidad proteica [67,71]. Una observación importante es que las células, clásicamente fuera del sistema inmune, puedan participar de manera programada durante una inflamación y que respondan a la estimulación de las citocinas, expresando la iNOS y genes asociados. Las células, como las del músculo liso vascular o las de los islotes pancreáticos, que se confirma que no participan en la inflamación, experimentan cambios fenotípicos en esos estados y responden de una manera muy similar a la de las células del sistema inmune cuando éstas pasan a expresar la iNOS.

Mientras que la demostración de la isoforma cNOS en el humano era relativamente simple, la de la iNOS era mucho más difícil. La célula prototipo para esta demostración era el macrófago murino [1,72]. Cuando se realizaron las primeras pruebas para conseguir lo mismo en macrófagos y monocitos humanos, sólo se detectaron bajos niveles de la síntesis del NO después de la

exposición prolongada a altos niveles de citocinas y LPS [73]. La cuestión no descansó hasta que Nussler et al [74] demostraron que los hepatocitos humanos en cultivo respondían de una manera prácticamente idéntica a las células del hígado de los roedores. Esta observación permitió a estos investigadores clonar el ADNc de la iNOS humana [18]. La iNOS humana muestra varios aspectos peculiares en ambos, gen y proteína, lo que garantiza el examen detallado de la iNOS humana en cuanto a su papel en enfermedades humanas, preferiblemente a su estudio en otras especies. Estos avances contribuirán significativamente en nuestro entendimiento del papel de la iNOS en la fisiopatología de muchas enfermedades inflamatorias y, con la ventaja de la tecnología del ADN recombinante, nos conducirán a estrategias dirigidas a modular su actividad en ciertos estados de la enfermedad. Más recientemente, los clones de ADNc homólogos se aislaron en condrocitos humanos [75] y en las células derivadas del adenocarcinoma humano [76], lo que sugiere una capacidad similar de amplia diseminación para la expresión de la iNOS humana. Todos estos datos confirman que las actividades descritas hasta el momento, para la iNOS, se pueden atribuir a una única isoforma generada a partir de un único gen.

Una vez iniciada la expresión de la iNOS y la producción de NO por una célula, por cualquier motivo, muchos sucesos empiezan de manera simultánea para apoyar la actividad de la iNOS. Como ya se mencionó, a diferencia de las isoformas constitutivas, que se regulan por la cantidad de Ca^{2+} , la actividad de la iNOS es limitada apenas por la cantidad de la

misma, la disponibilidad de cofactores y de sustrato. La cantidad de iNOS activada será, a su vez, dependiente del nivel de la expresión del gen y de la disponibilidad de los cofactores (calmodulina y BH_4), los cuales son necesarios para mantener a la enzima en su forma activa. Como resultado de que el NADPH es la única fuente de electrones conocida que soporta la síntesis del NO, no es sorprendente entender que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una enzima necesaria para la formación del NADPH, sea conducida junto con la iNOS en algunas células [77]. Incluso el BH_4 es más importante en la limitación de la actividad de la iNOS. Este cofactor es necesario para la actividad catalítica plena de la enzima y se encuentra en muy pequeñas cantidades, como sucede en las células musculares lisas vasculares. Gross y Levi [78] demostraron en las células musculares lisas de los vasos que la síntesis de NO en células estimuladas por citocinas es dependiente del recién formado BH_4 . Nakayama [79] demostró que el ARNm para la GTP-ciclohidrolasa-1, la enzima que limita el tiempo para la síntesis del BH_4 , era coinducida junto con el ARNm para la iNOS en células del músculo liso vascular. Entender esas relaciones es muy importante, ya que la manipulación de los niveles de los cofactores proporciona una manera de aumentar o disminuir terapéuticamente la actividad de la iNOS.

Ahora sabemos que las células que expresan la iNOS también aumentan de tamaño para asegurar un suplemento adecuado de sustrato. Fuentes potenciales de L-arginina incluyen la capacidad de adquisición de la célula, la producción en-

dógena y la proteólisis celular. Souba et al [80] demostraron que la adquisición de la L-arginina está aumentada en el hígado durante la endotoxemia, y que suministra, por lo tanto, más sustrato para la iNOS. El transporte de la arginina por los macrófagos también aumenta durante la síntesis del NO, y datos recientes indican que un transportador transmembrana de la arginina se coexpresa junto con la iNOS en macrófagos estimulados por el LPS [81]. Este transportador único, denominado transportador murino de aminoácidos catiónicos 2B, también transporta en ratones ornitina y lisina, y puede representar un objetivo para modular la síntesis del NO mediante el bloqueo de la captación de la arginina.

La síntesis endógena de la L-arginina forma parte del metabolismo normal del nitrógeno en el riñón y en el hígado por las enzimas del ciclo de la urea. En el túbulo renal proximal la citrulina circulante se transforma en arginina por la acción combinada de la argininosuccinato sintetasa (AS) y la argininosuccinato liasa. En el hígado, estas mismas enzimas realizan parte del ciclo de la urea, donde el nitrógeno en forma de amonio se convierte en arginina y después en urea, por la acción de la arginasa. La arginina formada por estas enzimas no está disponible para la síntesis del NO por la iNOS de los hepatocitos [82]. Esta cuestión se vuelve aún más interesante fuera del hígado, donde las células, que normalmente expresan apenas pequeñísimas cantidades de argininosuccinato sintetasa, se estimulan para expresar altos niveles de esta enzima cuando se expresa la iNOS. Hasta el momento, se ha demostrado este pro-

Tabla III. Consecuencias de la síntesis inducida del NO.

	Enfermedad	Mecanismo
Beneficio	Infección	Muerte microbiana
	Sepsis/endotoxemia	Citoprotección
Perjuicio	Choque séptico	Vasodilatación excesiva
	Enfermedad autoinmune	Daño tisular
	Inflamación crónica	Daño tisular, ¿carcinogénesis?

ceso en macrófagos [83] y en células del músculo liso vascular [84]. Esta coexpresión de la iNOS y la AS proporciona un mecanismo para reciclar la citrulina en L-arginina. Esta reacción debe acoplarse a reacciones de transaminación; el nitrógeno obtenido de otros aminoácidos se puede utilizar, así, para producir arginina y asegurar un sustrato adecuado en lugares con baja arginina extracelular (heridas). Este ciclo fue denominado 'ciclo del NO-citrulina'.

¿Cuáles son los objetivos y consecuencias de la expresión de la iNOS? (Tabla III). Debe comprenderse que la expresión de la iNOS es parte de una respuesta adaptativa durante la inflamación o la infección. Durante una infección, la estimulación de la iNOS por el microorganismo o por las citoquinas contribuye a la eliminación del agente causal. Las enfermedades parasitarias intracelulares como la malaria [85] y la leishmania [86] son especialmente sensibles al NO, así como también suelen resultar muertas o inhibidas algunas virosis [87], micosis [88] y bacterias [89]. También se demostró que ciertas células tumorales *in vitro* pueden morir por la acción de macrófagos activados mediante esta vía

[9,72]. Se dispone de algunas evidencias *in vivo* para esta función [90], pero no está claro si la síntesis de NO inducido representa un aspecto importante de la respuesta inmunitaria del huésped a las células tumorales. La amplia expresión de la iNOS es parte de la respuesta adaptativa del huésped a la sepsis, cuando la producción de NO desempeña numerosas e importantes funciones. El aumento de la síntesis del NO provoca vasodilatación, lo cual es, con toda probabilidad, parte de una respuesta adaptativa con el objetivo de aumentar al máximo la perfusión tisular para localizar el foco de la sepsis. Evidentemente, la hiperexpresión de la iNOS en el estado de sepsis puede dar lugar a una vasodilatación excesiva con colapso vascular y choque [91]. El entusiasmo inmediato para bloquear la síntesis del NO impulsó varios estudios, entre ellos el de Harbrecht et al [92], quienes remarcaron que la inhibición no selectiva de todas las isoformas de NOS durante la endotoxemia acarrea consecuencias adversas [93-95]. La inhibición no selectiva de todas las isoformas de la NOS inhibirá la exteriorización fisiológica del NO generado por las cNOS, y abolirá cualquier acción beneficiosa de la expresión de la iNOS en un intento de mejorar el tono vascular. Como ocurre con otros vasoconstrictores, este planteamiento puede llevar a descensos no deseados de oxígeno [94]. Acompañan a la inhibición no selectiva de las NOS durante la endotoxemia el aumento de las lesiones hepáticas [96-98], renales [99] e intestinales [100]. Algunos autores han sugerido que la iNOS se expresa para proteger la microcirculación a través de la vasodilatación e inhibición plaquetaria [98,99] y, quizá, la adhesión leucocitaria [36]. Has-

ta que no dispongamos de inhibidores seguros y altamente selectivos para la iNOS, la tarea de inhibir la iNOS para tratar la hipotensión resistente a los vasopresores no podrá resolverse completamente.

Un trabajo reciente informa de que la expresión de la iNOS puede también participar en la descompensación vascular observada en el choque hemorrágico prolongado [101]. Estos autores demostraron la actividad de la NOS aumentada en el pulmón y el hígado después de más de tres horas de choque hemorrágico. Mientras tanto, esta expresión de la NOS puede representar un fenómeno muy tardío del choque. Algunos estudios indican que la expresión de la iNOS no se observa en la aorta en choque grave pero sí en las vísceras no huecas tras la descompensación vascular.

Una segunda consecuencia de la expresión de la iNOS en la inflamación es la inmunorregulación. El NO puede expresarse para suprimir, de manera selectiva, algunos puntos de la respuesta inmunitaria. Como ya se ha mencionado, la supresión de la adherencia neutrofílica constituye uno de estos ejemplos [36], así como la proliferación linfocítica. Estudios realizados por Hoffman [102-104] ponen de manifiesto que la expresión de la iNOS está asociada al rechazo de injertos y puede conducir a una supresión de la proliferación linfocítica y a la aparición de los linfocitos T citotóxicos. Está claro que el NO desempeñará otros papeles reguladores en la inflamación y sepsis en el ámbito celular. La importancia del NO en las respuestas 'aloimunes' (rechazo de trasplantes), en suprimir o regular respuestas inmunitarias o en contribuir a la protección o daño tisular, consiguió un gran avance

cuando Shears et al [105] publicaron su trabajo, en el que se evidenciaba que la estimulación inmunomediada de la expresión de la iNOS protege parcialmente a los injertos aórticos de la aparición de arteriosclerosis en el injerto, y que la transferencia genética del gen de la iNOS puede resultar útil en la prevención de la progresión de la enfermedad, que de otra manera sería intratable.

En cuanto a la inflamación como resultado de un proceso de mala adaptación, la expresión de la iNOS puede ser perjudicial. Ejemplos de ese tipo de inflamación incluyen enfermedades autoinmunes u otras formas de inflamación crónica de etiología desconocida, como las enfermedades inflamatorias del intestino o algunos trastornos neurodegenerativos. Investigaciones recientes indican que la expresión de la enzima puede ser el hecho final que conduce a la lesión de los islotes pancreáticos en la diabetes juvenil [106], lesión de las articulaciones en la artritis inmunomediada [107] y lesiones de las articulaciones y riñón en un modelo murino del lupus eritematoso sistémico [108]. El aumento de la actividad de la iNOS en la pared del colon, en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal [109], abre la posibilidad de que el NO pueda contribuir en los cambios patogénicos de esta enfermedad. Es también tentador especular que el NO, que es capaz de dañar el ADN y formar carcinógenos [110], pueda contribuir en la etiología de transformaciones malignas frecuentemente encontradas en la enfermedad inflamatoria intestinal y en otras enfermedades inflamatorias crónicas. En ese contexto, es difícil comprender cómo el NO inducido

puede ser beneficioso, mientras que en otras situaciones puede ser perjudicial. Se sugiere que las consecuencias actuales de la expresión de la iNOS dependerán del grado y duración de esa expresión así como del medio en el que actúa.

Otros papeles del NO

Las funciones biológicas del NO no se limitan a las descripciones antes mencionadas, las cuales ya se clasificaron según la isoforma de la NOS. Ejemplos de algunas de las otras áreas en las que es sobradamente conocida la importancia del NO en los papeles reguladores son la función renal normal [111], como mediador de la función secretora endocrina normal [112] y como relajador del músculo liso durante el embarazo [113]. No existen dudas de la existencia de otros relevantes papeles que aún no se han descubierto y del futuro avance en nuestra comprensión de las funciones ya establecidas.

NO como blanco terapéutico

Existen condiciones en las cuales es más beneficioso el aumento del NO y otras en las que su inhibición selectiva es lo más adecuado. Esta molécula podrá incrementarse con el suministro de fuentes exógenas de la misma. Hay evidencias de que la terapia inhalatoria con gas NO, en bajas dosis, es eficaz para reducir selectivamente la presión vascular pulmonar en poblaciones pediátricas y en el síndrome de la angustia respiratoria moderada del adulto [114,115]. Las sustancias liberadoras de NO, como el nitroprusiato de sodio y la nitroglicerina, se han empleado desde hace años para pro-

mover la vasodilatación. Estos compuestos son útiles porque nos permiten promover cantidades pequeñas de NO, aunque altamente eficaces, con el fin de aumentar la vasodilatación, la antiagregación plaquetaria, la adhesión neutrofílica y, quizá, la supresión del crecimiento de células y otros microorganismos. Otros planteamientos para aumentar el nivel de NO endógeno pueden incluir la administración de más sustrato o cofactores. Hay ejemplos en los que el aporte excesivo de L-arginina resulta beneficioso, y aumenta el nivel de síntesis de NO [39]. También resulta atractiva la posibilidad de suministrar BH₄ como cofactor. Dado que este compuesto se requiere en pequeñas cantidades, para asegurar la actividad de las NOS, estas pequeñas cantidades de BH₄ o de sustrato para su formación pueden aumentar la síntesis de NO. Conforme se pone de manifiesto en esta revisión, las isoformas exhiben patrones de producción de NO bien diferentes, circunstancia que resulta ventajosa desde el punto de vista terapéutico, ya que se produce iNOS, de alta actividad, vía transferencia genética a lugares con deficiencia en NO. Tales planteamientos pueden ser especialmente provechosos para reducir las consecuencias de la enfermedad o lesión vascular y en el tratamiento de infecciones en las cuales los organismos son especialmente sensibles al NO. De hecho, ya se ha planteado experimentalmente con buenos resultados [45-47,105].

Tales planteamientos, que tienen por objetivo su reducción, pueden ser beneficiosos en situaciones específicas, lo que se puede conseguir a través del aporte exógeno de inhibidores de las NOS, reducción de los cofactores, uso de 'ligadores'

del NO y bloqueo selectivo de la expresión del gen para la iNOS. Una de las metas importantes es reducir las consecuencias patológicas de la expresión local crónica de la iNOS, mientras se mantienen las funciones fisiológicas importantes de las isoformas cNOS. Debido a que muchas de las consecuencias adversas de la expresión de la iNOS se producen en procesos localizados (p. ej., diabetes mellitus juvenil), los planteamientos que ofrecen inhibición local específica son los más atractivos. Actualmente, no existen grandes dudas de que los tratamientos terapéuticos venideros incluirán el uso de agentes farmacológicos que influirán en la disponibilidad y producción del NO. Un estudio reciente, realizado en Alemania, mostró una mejoría significativa en la distancia recorrida libre de dolor en pacientes con enfermedad arteriosclerótica, y también en la distancia absoluta recorrida, en torno a $230 \pm 63\%$ y $155 \pm 48\%$, con el uso

de L-arginina infundida por vía intravenosa durante tres semanas, en comparación con la prostaglandina E_1 , que fue de $209 \pm 63\%$ y $144 \pm 28\%$ [116]. Esto demuestra que la restauración de la formación del NO endotelial provoca realmente una mejoría clínica significativa en la claudicación de los pacientes con enfermedad arteriosclerótica periférica. De hecho, estos datos corroboran otro estudio realizado posteriormente por un grupo de California, en el que se postula que el uso de la L-arginina como suplemento alimenticio en conejos puede, realmente, reducir las lesiones arterioscleróticas previamente existentes. Según los datos de este estudio, el uso de L-arginina induce la apoptosis de macrófagos en lesiones internas por su metabolismo de NO, el cual actuará con una vía independiente del GMPc [117]. En caso de que esto se confirme en humanos, marcará el inicio de una nueva era en el tratamiento de la enfermedad arteriosclerótica.

Bibliografía

1. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 7738-42.
2. Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science* 1992; 258: 1861.
3. Kibbe M, Billiar TR, Tzeng E. Gene therapy for restenosis. *Cir Res* 2000; 86: 829-37.
4. Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ. The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News* 1993; 71: 26-39.
5. Nathan CF. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-64.
6. Molina y Vedia L, McDonald B, Reep B, Brune B, Di Silvio M, Billiar TR, et al. Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 1992; 267: 24929-32.
7. McDonald LJ, Moss J. Stimulation by nitric oxide of a NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 6238-41.
8. Drapier J, Hibbs J Jr. Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells: inhibition involves iron-sulfur prosthetic group and is reversible. *J Clin Invest* 1986; 78: 790-7.
9. Hibbs J Jr, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 1987; 138: 550-65.
10. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989; 169: 1543-5.
11. Drapier JC, Hirling H, Wietzerbin J, Kaldy P, Kuhn LC. Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J* 1993; 12: 3643-9.
12. Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ram-

- dev P, Arnelle D, et al. Endogenous nitrogen oxides and broncodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 10957-61.
13. McDonald B, Reep B, Lapetina EG, Molina y Vedia L. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for the transport on nitric oxide in platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 11122-6.
14. Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide syntheses reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 10769-72.
15. Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, Stuehr DJ. Macrophage nitric oxide synthase subunits: purification, characterization, and the role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem* 1993; 268: 21120-9.
16. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 14519-22.
17. Nakane M, Schmidt HHHW, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993; 316: 175-80.
18. Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 3491-5.
19. Cho HJ, Xie Q, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992; 176: 599-604.
20. Weitzberg E, Lundberg JNO. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide Biol Chem* 1998; 2: 01-07.
21. Lundberg JNO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alvin K. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 1994; 35: 1543-6.
22. Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B. Inhibitors of endogenous nitrosilation: mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutat Res* 1988; 202: 307-24.
23. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones DA, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric-oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 391: 393-7.
24. Weitzberg E, Lundberg JNO. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide Biol Chem* 1998; 2: 01-07.
25. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 228: 373-6.
26. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity on endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
27. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 9265-9.
28. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 2: 997-1000.
29. Michel T, Li GK, Busconi L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 6252-6.
30. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992; 90: 2092-6.
31. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 17478-88.
32. Aoki N, Siegfried M, Lefer AM. Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated, perfused cat carotid arteries. *Am J Physiol* 1989; 256: H1509-12.
33. Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Schmidt K, et al. Pteridine biosynthesis in human endothelial cells. Impact on nitric oxide-mediated formation of cyclic GMP. *J Biol Chem* 1993; 268: 1842-6.
34. Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggard EE, Vane JR. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 8612-6.
35. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; ii: 1057-8.
36. Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ. Evidence for inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 1981; 57: 946-55.
37. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 4651-5.

38. Kubes P, Granger DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 1992; 262: H611-5.
39. Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1990; 1898: 347-53.
40. McNamara DB, Bedi B, Aurora H, Tena L, Ignarro LJ, Kadowitz PJ, et al. L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 291-6.
41. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: 22-7.
42. Durante W, Sem AK, Sunahara FA. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneous diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1988; 94: 463-8.
43. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991; 87: 432-8.
44. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial-derived relaxation factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* 1992; 89: 10-8.
45. Shears LL II, Kibbe MR, Murdock AD, Billiar TR, Lizonova A, Kovesdi I, et al. Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs *in vivo*. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 295-306.
46. Janssens S, Flaherty D, Nong Z, Varenne O, van Pelt N, Hausermans C, et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation* 1998; 97: 1274-81.
47. Kibbe MR, Tzeng E, Gleixner SL, Watkins SC, Kovesdi I, Lizonova A, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of human inducible nitric oxide synthase in porcine vein grafts inhibits intimal hyperplasia. *J Vasc Surg* 2001; 34: 156-65.
48. Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med* 1995; 1: 804-9.
49. Samouilov A, Kuppusamy P, Zweier JL. Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems. *Arch Biochem Biophys* 1998; 357: 01-7.
50. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992; 8: 3-11.
51. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988; 336: 385-8.
52. Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 1994; 263: 973-7.
53. Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 1991; 154: 1503-6.
54. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 6368-71.
55. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994; 263: 687-9.
56. Gillespie JS, Liu XR, Martin W. The effects of L-arginine and N^G monomethyl-L-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 1080-2.
57. Ramagopal MV, Leighton HJ. Effects of N^G monomethyl-L-arginine on field stimulation-induced decreases in cytosolic Ca⁺⁺ levels and relaxation in the rat anococcygeus muscle. *Eur J Pharmacol* 1989; 174: 297-9.
58. Vanderwinden J-M, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ, De Laet MH. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N Engl J Med* 1992; 327: 511-5.
59. Mearin F, Mourelle M, Guarner F, Salas A, Riveros-Moreno V, Moncada S, et al. Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 724-8.
60. Kaufman HS, Shermark MA, May CA, Pitt HA, Lillemoen KD. Nitric oxide inhibits resting sphincter of Oddi activity. *Am J Surg* 1993; 165: 74-80.
61. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to anandrenergic, oncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* 1992; 326: 90-4.
62. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401-3.
63. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leuk Biol* 1993; 54: 171-8.
64. Morris SM Jr, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1994; 266: E829-39.
65. Busse R, Mülsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1990; 175: 87-90.

66. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Ochoa JB, Harbrecht BG, Flint SG, et al. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibits total protein synthesis. *Ann Surg* 1990; 212: 462-71.
67. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, et al. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 522-6.
68. Xie Q-W, Whisnau R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993; 177: 1779-84.
69. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 9730-4.
70. Xie Q-W, Kashwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NFkB/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269: 4705-8.
71. Vodovotz Y, Bodgan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor β . *J Exp Med* 1993; 178: 605-13.
72. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235: 473-6.
73. Denis M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depend on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J Leuk Biol* 1991; 49: 380-7.
74. Nussler A, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, et al. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 1992; 176: 261-4.
75. Charles IG, Palmer RMJ, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, et al. Cloning characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 11419-23.
76. Sherman PA, Laubach VE, Reep BR, Wood ER. Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry* 1993; 32: 11600-5.
77. Corraliza IM, Campo ML, Fuentes JM, Campos-Portuguez S, Soler G. Parallel induction of nitric oxide and glucose-6-phosphate dehydrogenase in activated bone marrow derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 342-7.
78. Gross SS, Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis: an absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 1992; 267: 25722-9.
79. Nakayama DK, Geller DA, Di Silvio M, Bloomgarden G, Davies P, Pitt BR, et al. Increased activity of *de novo* tetrahydrobiopterin synthesis in pulmonary artery smooth muscle cells stimulated to produce nitric oxide. *Am J Physiol* 1994; 266: L455-60.
80. Inoue Y, Bode BP, Beck DJ, Li AP, Bland KI, Souba WW. Arginine transport in human liver: characterization and effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Ann Surg* 1993; 218: 350-63.
81. Closs EI, Lyons CR, Kelly C, Cunningham JM. Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters: identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J Biol Chem* 1993; 268: 20796-800.
82. Pastor CM, Billiar TR. The roles of endogenous vs. exogenous sources of L-arginine for induced nitric oxide synthesis in the isolated perfused liver. [Submitted].
83. Nussler AK, Billiar TR, Liu ZZ, Morris SM Jr. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line: implications for regulation of nitric oxide production. *J Biol Chem* 1994; 269: 1257-61.
84. Morris SM Jr, Nakayama DK, Nussler AK. Coinduction of NO synthase and argininosuccinate synthase gene expression: implication for regulation of NO synthesis. *Proceedings of the Third International Meeting on the Biology of Nitric Oxide*. [In press].
85. Nussler A, Drapier JC, Renia L, Pied S, Miltgen F, Gentilini M, et al. L-arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation. *Eur J Immunol* 1991; 21: 227-30.
86. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 1990; 144: 278-83.
87. Karupiah G, Xie QW, Buller RML, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD. Inhibition of viral replication by interferon- γ -induced nitric oxide synthase. *Science* 1993; 261: 1445-8.
88. Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT. Specific amino acid (L-arginine) require-

- ment for the microbiostatic activity of murine macrophages. *J Clin Invest* 1988; 81: 1129-36.
89. Malawista SE, Montgomery RR, van Blaricom G. Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasm. *J Clin Invest* 1992; 90: 631-6.
90. Yim CY, Bastian NR, Smith JC, Hibbs JB Jr, Samlowski WE. et al. Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light-induced murine skin cancers. *Cancer Res* 1993; 53: 5507-11.
91. Kilbourn RG, Jubran A, Gross SS, Griffith OW, Levi R, Adams J, et al. Reversal of endotoxin-mediated sick by N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 172: 1132-8.
92. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa JB, Curran RD, et al. Nitric oxide synthesis serves to reduce hepatic damage during acute murine endotoxemia. *Crit Care Med* 1992; 20: 1568-74.
93. Cobb JP, Natanson C, Hoffman WD, Lodato RF, Banks S, Koev CA, et al. N^G-amino-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, raises vascular resistance but increases mortality rates in awake canines challenged with endotoxin. *J Exp Med* 1992; 176: 1175-82.
94. Robertson FM, Offner PJ, Ciceri DP, Becker WK, Pruitt BA Jr. Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition in septic shock. *Arch Surg* 1994; 129: 149-56.
95. Minnard EA, Shou J, Naama H, Cech A, Gallagher H, Daly JM. Inhibition of nitric oxide synthesis is detrimental during endotoxemia. *Arch Surg* 1994; 129: 142-8.
96. Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stuehr DJ, Demetris AJ, Simmons RL. Modulation of nitrogen nitric oxide synthesis *in vivo*: N^G-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukoc Biol* 1990; 48: 565-9.
97. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa J, Curran RD, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 390-4.
98. Harbrecht BG, Stadler J, Demetris AJ, Simmons RL, Billiar TR. Nitric oxide and prostacyclin interact to prevent hepatic damage during murine endotoxemia. *Am J Physiol* 1994; 266: G1004-10.
99. Shultz PJ, Raji L. Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *J Clin Invest* 1992; 90: 1718-25.
100. Boughton-Smith NK, Hutcheson IR, Deakin AM, Whittle BJ, Moncada S. Protective effect of S-nitrous-N-acetyl-penicillamine in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Eur J Pharmacol* 1990; 191: 485-8.
101. Thiernemann C, Szabo C, Mitchell JA, Vane JR. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 267-71.
102. Hoffman RA, Langrehr JM, Billiar TR, Curran RD, Simmons RL. Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine. *J Immunol* 1990; 145: 2220-6.
103. Lancaster JR Jr, Langrehr JM, Bergonia HA, Murase N, Simmons RL, Hoffman RA. EPR detection of heme and nonheme iron-containing protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat renal allograft. *J Biol Chem* 1992; 267: 10994-8.
104. Hoffman RA, Langrehr JM, Simmons RL. Nitric oxide synthesis: a consequence of alloimmune interaction. *Xeno* 1994; 2: 05-7.
105. Shears LL, Kawaharada N, Tzeng E, Billiar TR, Watkins SC, Kovesdi I, et al. Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis. *J Clin Invest* 1997; 100: 2035-42.
106. Corbett JA, Lancaster JR Jr, Sweetland MA, McDaniel ML. Interleukin-1-β-induced formation of EPR-detectable iron-nitrosyl complexes in islets of Langerhans: role of nitric oxide in interleukin-1-β-induced inhibition of insulin secretion. *J Biol Chem* 1991; 266: 21351-4.
107. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, et al. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1993; 178: 749-54.
108. Weinberg JB, Granger DL, Pisetsky DS, Seldin MF, Misukonis MA, Mason SN, et al. The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-1pr/1pr mice, and reduction of spontaneous nephritis and arthritis by orally administration of N^G-monomethyl-L-arginine. *J Exp Med* 1994; 179: 651-60.
109. Middleton SJ, Shothouse M, Hunter JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993; 341: 465-6.
110. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3030-4.
111. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Tay-

- lor G, Levi R, et al. Nitric oxide synthase in macula dense regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 11993-7.
112. Ceccatelli S, Hulting AL, Zhang X, Gustafsson L, Villar M, Hokfelt T. Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 11292-6.
113. Sladek SM, Regenstein AC, Lykins D, Roberts JM. Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 1285-91.
114. Rossaint R, Falke KJ, López F, Slama K, Pison U, Zapol WM. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328: 399-405.
115. Shah N, Jacob T, Exler R, Morrow S, Ford H, Albanese C, et al. Inhaled nitric oxide in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 1010-5.
116. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, et al. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Col Cardiol* 1998; 32: 1336-44.
117. Wang BY, Ho HK, Lin PS, Schwarzscher SP, Pollman MJ, Gibbons GH, et al. Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation* 1999; 99: 1236-41.

ÓXIDO NÍTRICO: UN CAMPO ABIERTO PARA LA ANGIOLOGÍA Y LA CIRUGÍA VASCULAR

Resumen. *Objetivo. El objetivo es promover la formación continua de los profesionales de la cirugía vascular y angiología mediante una recopilación de las últimas publicaciones sobre el tema. Desarrollo. Abordamos la bioquímica, formación, regulación, acciones, posibles usos y la relevancia clínica de la molécula de óxido nítrico, compuesto sintetizado por la mayoría de las células de los mamíferos y que presenta efectos vasomotores locales y sistémicos de importancia para la mayoría de las patologías y tratamientos del ámbito de la cirugía vascular y de la angiología. Conclusión. Se han identificado las diversas áreas de actuación para su uso y se ha sugerido la terapia manipuladora de la respuesta endógena del compuesto mencionado, con el fin de obtener mejores resultados en los ámbitos de la medicina citados anteriormente. [ANGIOLOGÍA 2002; 54: 472-91]*

Palabras clave. Aterosclerosis. Endotelio. L-arginina. Óxido nítrico. Respuesta endógena. Vasodilatación.

ÓXIDO NÍTRICO: CAMPO ABERTO PARA A ANGIOLOGIA E CIRURGIA VASCULAR

Resumo. *Objetivo. Objetiva-se promover a formação contínua dos profissionais da cirurgia vascular e angiologia com um apanhado das últimas publicações sobre o assunto proposto. Desenvolvimento. Abordamos a bioquímica, formação, regulação, as acções, possíveis usos e relevância clínica da molécula de óxido nítrico, composto sintetizado pela maioria das células mamíferas e que tem efeitos vasomotores locais e sistémicos de relevância para a maioria das patologias e tratamentos no âmbito da cirurgia vascular e da angiologia. Conclusão. São identificadas as diversas áreas de actuação para seu uso e é sugerido a terapia manipulatória da resposta endógena do referido composto para melhores resultados nos campos da medicina supracitados. [ANGIOLOGIA 2002; 54: 472-91]*

Palavras chave. Aterosclerose. Endotélio. L-arginina. Óxido nítrico. Resposta endógena. Vasodilatação.