



## Revisión de Tema

# El Papel del Óxido Nítrico como Mediador de Disfunción Endotelial en la Respuesta Inflamatoria

Jorge Humberto Echeverri Perico\*  
Paola Cáceres Corredor\*\*  
Fanny Rocío Monroy Rodríguez\*\*\*

### Resumen

**L**os estados inflamatorios recurrentes de infección figuran como uno de los mecanismos que desencadenan la presentación de eventos vasculares debidos a disfunción endotelial. Se conoce que en el proceso de disfunción participan un gran número de mediadores: moléculas de adhesión, citoquinas pro inflamatorias (FNT $\alpha$ , IL $_1$ , IL $_6$ , IL $_8$ ), factores de crecimiento, COX $_2$ , NOS inducible, ecosanoides y radicales libres, entre otros.

*El efecto conjunto o individual de estas sustancias determina un cambio en las actividades de síntesis y metabolismo del endotelio, de modo que se favorecen la tendencia al vasoespasmo, la alteración de la permeabilidad para las lipoproteínas, el reclutamiento de células blancas, la disminución en la regeneración endotelial y el desbalance fibrinolítico que promoverá la generación de trombina y el depósito de plaquetas y fibrina con la consiguiente formación de la placa aterosclerótica.*

*Es importante reconocer al NO no sólo como mediador y regulador de la fisiología vascular normal, sino también como una sustancia metabólicamente activa y multifuncional que en el caso de la infección y de la inflamación interfiere en el ciclo biológico de la célula endotelial (por inhibición de la respiración mitocondrial, generación de radicales más tóxicos y daño directo al ADN); esto conduce al mantenimiento del desbalance en la producción endotelial de los mediadores hemostáticos y hemodinámicos, prevalenciando aquellos que conducen a enfermedad endotelial. De esta manera se induce la migración de células musculares lisas hacia la íntima, y la diferenciación hacia fibroblastos*

\*Md Patólogo. Profesor Asociado de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga.

\*\*Estudiante VI Semestre de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga.

\*\*\*Estudiante VIII semestre de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga.

**Correspondencia:** Dr. Echeverri. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Campus El Bosque. Calle 157 # 19-55, Cañaveral Parque. E-mail: humbetchev@usa.net

para aumentar el tamaño de la placa aterosclerótica, respuesta anormal ante el estrés dinámico, con la consecuente formación de trombos y progresión acelerada hacia la disminución del calibre vascular, que conlleva a incrementar la isquemia del tejido distal.

---

**Palabras clave:**

Inflamación, endotelio, óxido nítrico, radicales libres, aterosclerosis.

---

## INTRODUCCIÓN

Con la instalación de la cátedra Lope Carvajal Peralta, en la Universidad Autónoma de Bucaramanga, tanto docentes como estudiantes de diferentes Facultades de Medicina hemos tenido la oportunidad de iniciar espacios de discusión y procesos de construcción de conocimiento en torno al papel que desempeña el endotelio como tejido complejo y el óxido nítrico en el proceso de aterosclerosis, hipertensión arterial, shock, diabetes, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, enfermedad isquémica miocárdica, así como su relación con la inflamación, con los estrógenos y con la enzima convertidora de angiotensina, entre otros.

Nuestro grupo ha considerado importante evaluar la relación entre los procesos inflamatorios y la disfunción endotelial, para construir bases conceptuales que permitan comprender mejor los procesos de aterogénesis y sus consecuencias. Partimos de revisiones temáticas, como la del presente artículo, con el fin de estimular en los estudiantes la inquietud para identificar problemas de interés médico y formular preguntas que permitan conducirlos hacia la concreción de trabajos de investigación.

Este artículo tiene por objeto dejar sentadas algunas bases para abordar posteriormente la pregunta planteada por muchos en el área clínica, "¿Por qué la infección se considera parte de los factores de riesgo de la enfermedad aterosclerótica?".

La participación del proceso inflamatorio inducido por infecciones en el desarrollo de enfermedad aterosclerótica o la activación de la placa, esta soportado por numerosas publicaciones que permiten trazar un mapa conceptual para explicar satisfactoriamente los mecanismos involucrados y la participación del sistema de la sintasa de óxido nítrico en dicho proceso.<sup>1</sup>

Se empieza a establecer relación entre aterogénesis o enfermedad cardiovascular e infección, desde 1978 cuando inducen aterogénesis en pollos después de infectarlos con virus herpes de las aves. Luego se observa un incremento de las muertes en hombres previamente sanos asociadas a enfermedad cardiovascular después

de epidemias de influenza.<sup>2</sup> Adicionalmente se realiza una serie de estudios epidemiológicos desde 1992 en los cuales se suman evidencias que asocian infección con enfermedad cardiovascular. Dentro de estos estudios vale la pena resaltar los siguientes: asociación de infección por *Chlamydia* con enfermedad coronaria, cerebro vascular y aterosclerótica carotídea,<sup>3,4</sup> complicaciones tromboembólicas en caso de infecciones bacterianas que cursaron con bacteremia;<sup>5</sup> asociación de más del 10% de todas las enfermedades cardiovasculares con infecciones bacterianas precedentes<sup>5</sup>; aumento del riesgo coronario varias semanas después de cirugías abdominales;<sup>6</sup> riesgo relativo de infarto agudo del miocardio 2.7 veces mayor en pacientes con antecedentes de infección respiratoria en los 10 días previos al infarto;<sup>7</sup> relación de infección por *Helicobacter pylori* y *Chlamydia pneumoniae* con aterosclerosis y reestenosis post-angioplastias y aplicación de Stens.<sup>9</sup> También se ha observado reducción en los indicadores de impacto para enfermedad coronaria después de tratamiento farmacológico para *Chlamydia*.<sup>10</sup> Estas observaciones comienzan a tener evidencias más concretas cuando se demuestran títulos de anticuerpos contra *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori* en enfermedad cardiovascular y su reducción después del tratamiento, lo cual hace pensar que existe asociación entre una y otra entidad, siendo además predictivos para enfermedad cardiovascular.<sup>8,9,11</sup> Adicionalmente se realizan modelos experimentales en conejos, con lo cual existe una evidencia más fuerte, donde se presenta desarrollo acelerado de lesiones ateroscleróticas después de infectarlos con *Chlamydia pneumoniae* las cuales se desaceleran con el tratamiento antibiótico.<sup>12-4</sup>

Ahora, es necesario demostrar no solamente títulos elevados para dichas infecciones sino confirmar la presencia de mediadores inflamatorios, lo cual fue evidenciado al relacionar seropositividad para infección por *Helicobacter pylori* con altos niveles de marcadores de inflamación sistémica y enfermedad cardiovascular;<sup>15,16</sup> además, producción aumentada de citoquinas en pacientes con bacteremia o presencia de toxinas circulantes después de cirugías abdominales.<sup>17</sup> Posteriormente se precisa que las citoquinas pro inflamatorias son mediadores de las endotoxinas bacterianas y se encuentran elevadas en pacientes con angina inestable y con infarto agudo del miocardio;<sup>18-21</sup> estas evidencias son concretadas al observar que la determinación de marcadores de inflamación aguda, coinciden con la transformación de un ateroma estable en ateroma activo.<sup>22,23</sup>

En un paso posterior es preciso definir las citoquinas pro inflamatorias comprometidas e identificar la célula diana que inicia la amplificación del proceso y estimula tanto la proliferación y migración, como la diferenciación de células fagocíticas y fibroblásticas comprometidas en el desarrollo de una placa ateromatosa; también identificar

las reacciones bioquímicas que median estos mecanismos, las enzimas comprometidas y las vías comunes para establecer generalizaciones de utilidad clínica.

Se demuestra que la vía para aumentar el riesgo de infarto (IAM) es la disfunción endotelial generada después de la exposición a endotoxinas bacterianas.<sup>24</sup> Se ha observado que interleucina 1 (IL<sub>1</sub>), interleucina 6 (IL<sub>6</sub>) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (FNT $_{\alpha}$ ) generan disfunción endotelial a niveles semejantes a los observados en IAM y angina inestable,<sup>25-8</sup> al demostrar que la depresión del óxido nítrico es consecuencia de la reducción de la vida media de ARN mensajero de la sintasa de óxido nítrico (NOS) y reducción de la expresión del gen NOSe por el FNT $_{\alpha}$ .<sup>29,30</sup> se confirma que la vía comprometida en la disfunción endotelial es la enzima NOS.

Además, al iniciarse el proceso inflamatorio se activa la NOS inducible (NOSi), generando grandes cantidades de NO que se desvían hacia la formación de peroxinitritos llevando de esta manera a nitrosación de proteínas y daño del ADN;<sup>31-3</sup> además de inhibir la respiración mitocondrial, se activa también la ciclooxigenasa (COX) la cual genera radicales libres de oxígeno que inactivan al óxido nítrico.<sup>24,29,30,34,35</sup>

## REVISIÓN TEMÁTICA

El proceso inflamatorio, como tal, se inicia con la primera línea de defensa, donde el macrófago por sus características reconoce al patógeno, lo fagocita y lo destruye, pues para afrontar la respuesta tiene en su membrana receptores para lipopolisacáridos y manosa de los microorganismos, así como receptores para la fracción C<sub>3</sub>b del complemento y para la fracción cristalizante de las inmunoglobulinas; en este primer encuentro es donde se controla realmente la infección; pero si falla, se activa entonces la cascada de defensa induciendo dos tipos de respuesta que tienen por objeto aumentar el número de células y moléculas para contrarrestar la infección. La primera respuesta es la síntesis de citocinas (FNT $_{\alpha}$ , IL<sub>1</sub>, IL<sub>6</sub>, IL<sub>8</sub> e IL<sub>12</sub>) que inducen inflamación local y efectos sistémicos a través de proteínas de fase aguda como mecanismo innato de inducción temprana. La segunda respuesta es el procesamiento-presentación del antígeno y la coestimulación para activar linfocitos TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> (respuesta adaptativa).

Por tanto, al considerar en el tiempo la secuencia de acontecimientos, en las primeras cuatro horas se activan los mecanismos innatos como los macrófagos, los mastocitos y la vía alternativa del complemento; si la infección no es controlada se induce inflamación local, respuesta de fase aguda, interferones y activación de células NK; pasados cuatro días al no eliminarse la infección se desarrolla la inmunidad adaptativa con la activación de linfocitos B y T.

## Activación de mastocitos

Los mastocitos, cuyo nicho natural es el tejido conectivo perivascular son verdaderos reservorios del sistema inmune; estas células son fácilmente estimuladas por factores físicos, neuropéptidos, quininas, complejos inmunes, Ig E, fracciones C<sub>3</sub>a y C<sub>5</sub>a del complemento y antígenos de los microorganismos. Con su activación, los patógenos son avasallados y reducidos por la fuerza debido a la inundación de la zona con plasma sanguíneo y leucocitos procedentes de los vasos adyacentes como respuesta a la vasodilatación de la microcirculación, al incremento de la permeabilidad vascular, a la inducción de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y a los efectos quimiotácticos de la histamina y factor de necrosis tumoral que liberan; con la liberación de IL<sub>4</sub> activan específicamente al linfocito B para la producción de inmunoglobulinas.

La activación del mastocito se realiza por estimulación de diferentes receptores FcERI de membrana que a través de proteínas G (PG) activan la fosfolipasa C (PLC) y esta permite activación de mecanismos intracelulares que llevan a la degranulación (Figura 1). Este proceso es similar en numerosos complejos biológicos para diferentes funciones; el proceso de degranulación mediante la fosforilación de miosina se da por la activación de la PKC de membrana vía diacilgliceroles y por la activación de cinasas Ca<sup>++</sup>/calmodulina dependientes por la liberación de Ca<sup>++</sup> que induce el IP<sub>3</sub>. Por otro lado al activarse el sistema PG activa a su vez la PLA<sub>2</sub> quien induce producción de PGI<sub>2</sub> y LTC<sub>4</sub> a partir del ácido araquidónico, efecto que se potencia por la liberación de calcio en el retículo endoplásmico. También es importante que con la estimulación del receptor de alta afinidad se activa la adenilciclasa para generar AMPc quien por fosforilación de la PKA inhibe la degranulación, sirviendo de esta manera como mecanismo regulador.

La histamina liberada actúa sobre receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, que se encuentran, el primero en las células endoteliales de intestino, bronquios y grandes vasos donde el efecto es contracción, y el segundo en el músculo liso de la microcirculación donde se produce relajación, así como en células parietales gástricas donde inducen producción de HCl.

Al estimularse el receptor H<sub>1</sub> se activa el sistema de PG y a través de PLC se forma IP<sub>3</sub> que permite liberación intracelular de calcio, los altos niveles de calcio tienen dos efectos: uno se relaciona con la activación de una PK-calicio/calmodulina dependiente (PKCa<sup>++</sup>/CaM), para inducir la contracción de la célula endotelial y de esta manera aumentar la permeabilidad vascular. El otro efecto corresponde a la activación de la PLA<sub>2</sub> que induce la formación de PGI<sub>2</sub>, determinando las propiedades antiagregantes y la activación de tromboxanos que median la agregación plaquetaria; estas dos se mantienen

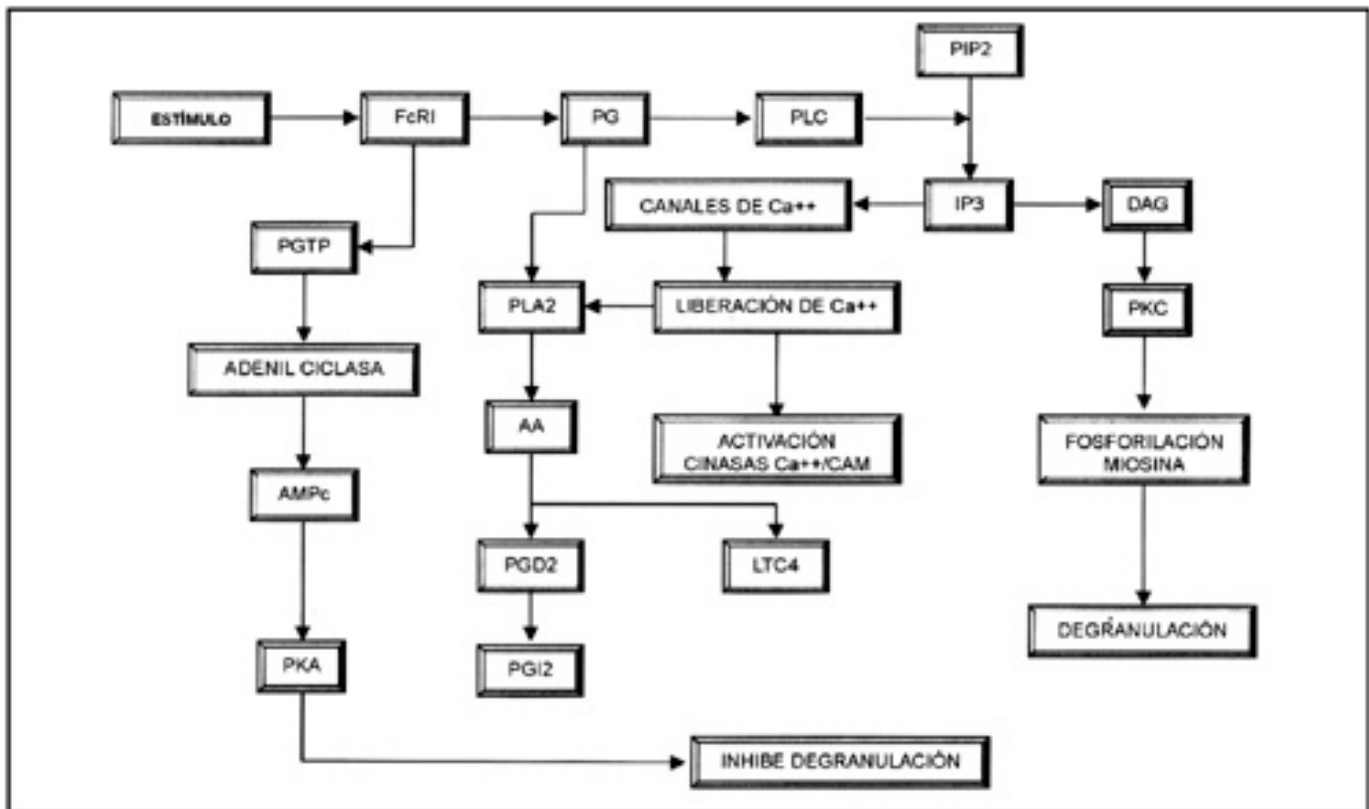


Figura 1. Activación del mastocito

en equilibrio dinámico explicando las propiedades antagónicas que tiene el endotelio. La misma PLA<sub>2</sub> activa la NOS<sub>i</sub> para generar óxido nítrico, el cual difunde a la célula muscular lisa que por vía de guanidil ciclasa genera relajación muscular (Figura 2). Esta vía es potenciada por la PGI<sub>2</sub>. Otra acción secundaria a la activación del receptor H<sub>1</sub> es la activación de PK en la membrana celular que induce mayor síntesis proteica, útil para la expresión de moléculas de adhesión.

Al estimularse el receptor H<sub>2</sub> se activa el sistema de proteína G y ésta a través de la adenilciclase induce la formación de AMPc, que produce relajación sostenida y lenta de la fibra muscular lisa de los vasos sanguíneos.

El mastocito se estimula para producir histamina no solamente por contacto de las fracciones cristalizables de inmunoglobulinas, sino también por fragmentos del complemento como el C<sub>3a</sub>, C<sub>4a</sub> y C<sub>5a</sub> (anafilotoxinas), que potencian el efecto inflamatorio de los microorganismos opsonizados por éste; por esta razón es importante aclarar la forma como se produce la activación de este sistema dentro del proceso inflamatorio.

### Respuesta de fase aguda

Cuando los macrófagos en respuesta a la infección liberan FNT<sub>α</sub>, IL<sub>1</sub> e IL<sub>6</sub> activan diversas células del organismo,

entre ellas las de médula ósea, para aumentar la producción de células blancas incrementando niveles de factores formadores de colonias; activan el hipotálamo tanto para inducir aumento de temperatura corporal mediado por prostaglandinas, como para la producción de ACTH en hipófisis, generándose de esta manera hidrocortisona en corteza suprarrenal, la cual induce la síntesis de proteínas de fase aguda en el hepatocito. Este también se activa directamente por dichas interleucinas, potenciando el efecto de los esteroides. Tanto la fiebre, como el incremento de la hematopoyesis y la liberación de proteínas de fase aguda, en conjunto, son indispensables para el control del proceso infeccioso.

### Proteínas de fase aguda

Las proteínas de fase aguda más importantes son proteína C reactiva (P-CR), amiloide sérico α (AS<sub>α</sub>), proteína de unión a manosa, componentes del complemento y fibrinógeno, que se sintetizan en el hepatocito, siendo el fibrinógeno un componente importante en la formación de la malla para circunscribir el proceso infeccioso. El mecanismo por el cual se sintetizan estas proteínas en suficientes cantidades durante las primeras 12 horas de la fase aguda implica receptores de IL<sub>6</sub>, activación de fosforilasas de membrana e intracitoplasmáticas y unión de una de ellas a un factor nuclear (NF-IL<sub>6</sub>) que se une al promotor en el ADN para iniciar la transcripción del

respectivo ARN mensajero para cada una de las proteínas de fase aguda. La unión del NF-IL<sub>6</sub> se realiza en el mismo dominio donde en forma constitutiva se une el C/EPB para la síntesis de albúmina y transtirretina, lo cual explica por qué estas dos se deprimen durante el proceso. Las proteínas de fase aguda además simulan las acciones de los anticuerpos en lo relacionado con la activación del complemento sin ser antígenos específicos.<sup>36</sup> Lo importante de este proceso es que la activación del complemento mediado por las proteínas de fase aguda es más rápida que la activación de la vía clásica.

El complemento desempeña un papel importante en el bloqueo de los microorganismos antes de que se desarrolle la respuesta inmune; esto se logra por un lado contra aquellas bacterias que característicamente presentan bajos niveles de residuos sializados a nivel de los lipopolisacáridos de pared, activando la vía alterna; los demás microorganismos activarán al complemento por la vía clásica una vez se les haya unido una inmunoglobulina. El efecto de ambas activaciones se traduce en la formación del complejo de ataque a membrana (MAC) que induce la lisis celular, pero por otro lado se generan fragmentos intermediarios que sirven como agentes opsonizantes o estimulan la quimiotaxis en células de defensa y liberación de histamina en mastocitos.

Es así, como el C<sub>3</sub>a y especialmente el C<sub>5</sub>a son quimiotácticos para leucocitos, inducen la producción de leucotrieno B<sub>4</sub>, la degranulación de mastocitos, activación de la tromboplastina y contractura de músculo liso; sin embargo, una vez se inactive el C<sub>5</sub>a por acción de la carboxipeptidasa B, se remueve arginina la cual promueve relajación muscular. El C<sub>3</sub>b promueve la adherencia inmunológica aumentando la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos.<sup>37</sup>

### Factor de Hageman

El factor de Hageman (XII), no solamente actúa en el sistema de coagulación sino que cumple un papel importante en la amplificación de la respuesta inflamatoria. Este se activa tras la injuria celular y sigue tres vías básicas: precalicreina, plasmina y trombina. La trombina genera por un lado fibrina indispensable para la agregación plaquetaria y por otro forma fibrinopéptidos que por sus cargas negativas aumentan la permeabilidad vascular, incrementan la dismutasa en neutrófilos y aumentan su quimiotaxis. La plasmina genera por un lado productos de degradación de fibrina que se comportan como agentes quimiotácticos en neutrófilos y por otro activan la vía alterna del complemento produciéndose fragmentos quimiotácticos y opsonizantes como C<sub>5</sub>a y C<sub>3</sub>b, respectivamente; la precalicreina por un lado sigue su transformación a calicreina, la cual cliva C<sub>5</sub> en C<sub>5</sub>a y C<sub>5</sub>b, de modo que el C<sub>5</sub>a favorece la degranulación de mastocitos, liberación de neutrófilos desde la médula ósea

y secreción de enzimas; y luego el paso a bradicinina que produce vasodilatación al inducir óxido nítrico (Figura 3).

### Moléculas de adhesión

La acción de la histamina, la trombina y los leucotrienos generados en los procesos anteriores actúan de manera inmediata sobre el endotelio de la circulación, el endotelio alto de ganglios linfáticos y sobre las plaquetas para que expresen moléculas de adhesión, específicamente selectina P que se une a PSGL<sub>1</sub> del neutrófilo; al mismo tiempo, en el endotelio alto de los ganglios linfáticos se expresa Glycam 1 y CD<sub>34</sub> que se unen a la selectina L (LAM<sub>1</sub>) de linfocitos y macrófagos. Estas dos acciones permiten, por un lado, marginar el mayor número de neutrófilos de la microcirculación y por otro permitir el paso de linfocitos y macrófagos hacia la corteza del ganglio linfático para que se realicen los procesos de expansión clonal. Las plaquetas también expresan selectina P que se une a Sialil-LeX (CD<sub>15</sub>s) de los polimorfonucleares.

Otra vía de activación del endotelio para la expresión de moléculas de adhesión está mediada por factores proinflamatorios (IL<sub>1</sub>, INF<sub>γ</sub>, FNT<sub>β</sub>) generados por el macrófago cuando no fue capaz de controlar la infección. La expresión de moléculas es secuencial en el tiempo, de tal manera que entre una y dos horas después de actuar los factores proinflamatorios se expresa selectina P que se une a Sialil-LeX de los neutrófilos. De 6 a 16 horas más tarde por efecto del rodamiento del neutrófilo se activa una serie de quimioatrayentes como quimocinas (IL<sub>8</sub>, MIP<sub>1β</sub>), PAF, C<sub>5</sub>a y péptidos N-formil de origen bacteriano, que por mecanismos que involucran unión a proteínas G tanto en el neutrófilo como en el endotelio, inducen expresión de moléculas de adhesión de mayor afinidad como integrinas y superfamilia de inmunoglobulinas; es así como se expresan LFA<sub>1</sub> e ICAM<sub>1</sub> que se unen a MAC<sub>1</sub> y CR<sub>3</sub> del neutrófilos, respectivamente; a las 16 horas se expresan moléculas VCAM<sub>1</sub> que se unen a VLA<sub>4</sub> de macrófagos y linfocitos, iniciando después de este tiempo los procesos de inflamación crónica. Este proceso nos explica la razón por la cual durante las primeras horas de respuesta actúan especialmente los neutrófilos. Una vez se inicia la inflamación crónica se presentan transformaciones locales en el sitio de la infección donde el endotelio se transforma en endotelio alto similar al de los ganglios linfáticos para potenciar la salida de células mononucleadas. Para la transmigración de estas células inflamatorias se hace necesaria la expresión de PECAM<sub>1</sub> en el endotelio, aunque el mecanismo no lo hemos comprendido bien (Figura 4).<sup>38</sup>

La quimocinas además de promover la unión estable de las células con el endotelio y su transmigración, intervienen en forma definitiva en la quimiotaxis hacia el lugar de inflamación. Se conocen dos grupos principales, uno que participa en la activación de macrófagos y

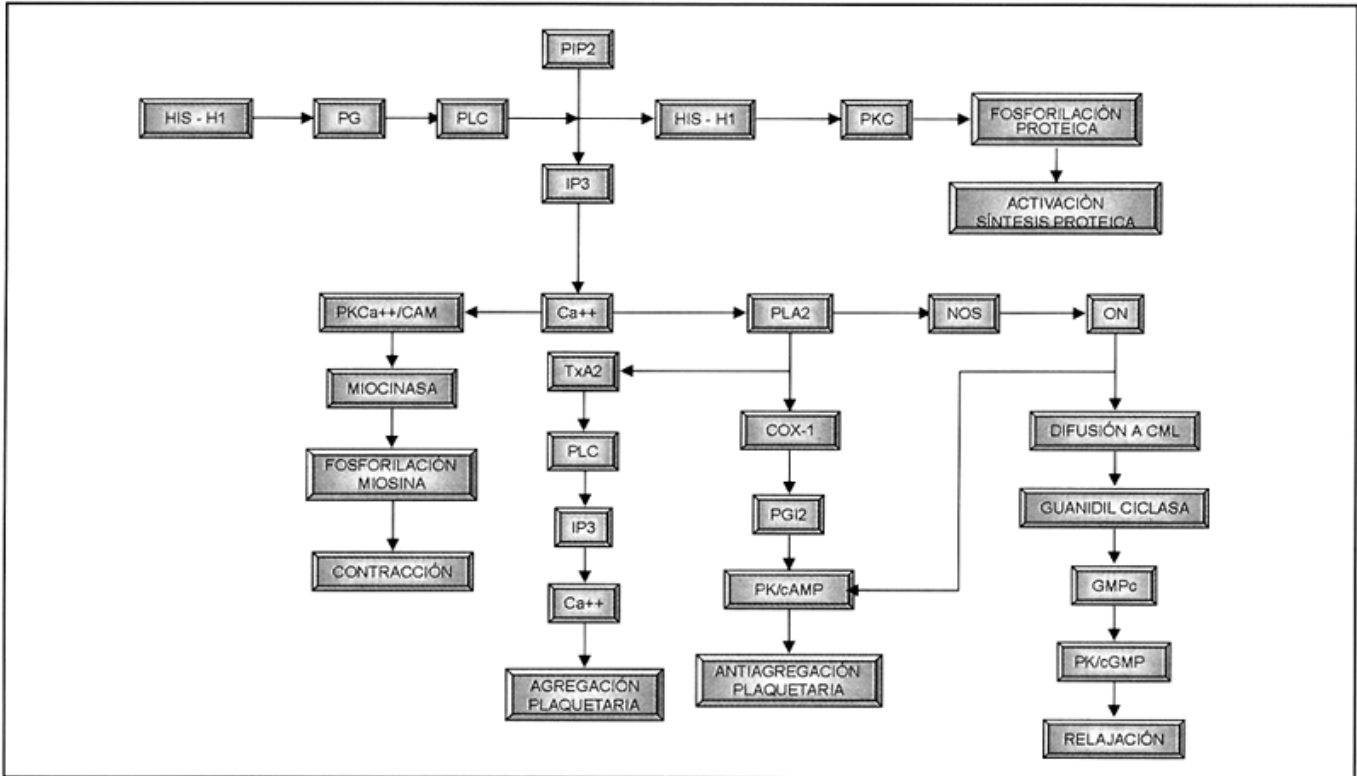


Figura 2. Acción de la histamina sobre el receptor H<sub>1</sub>

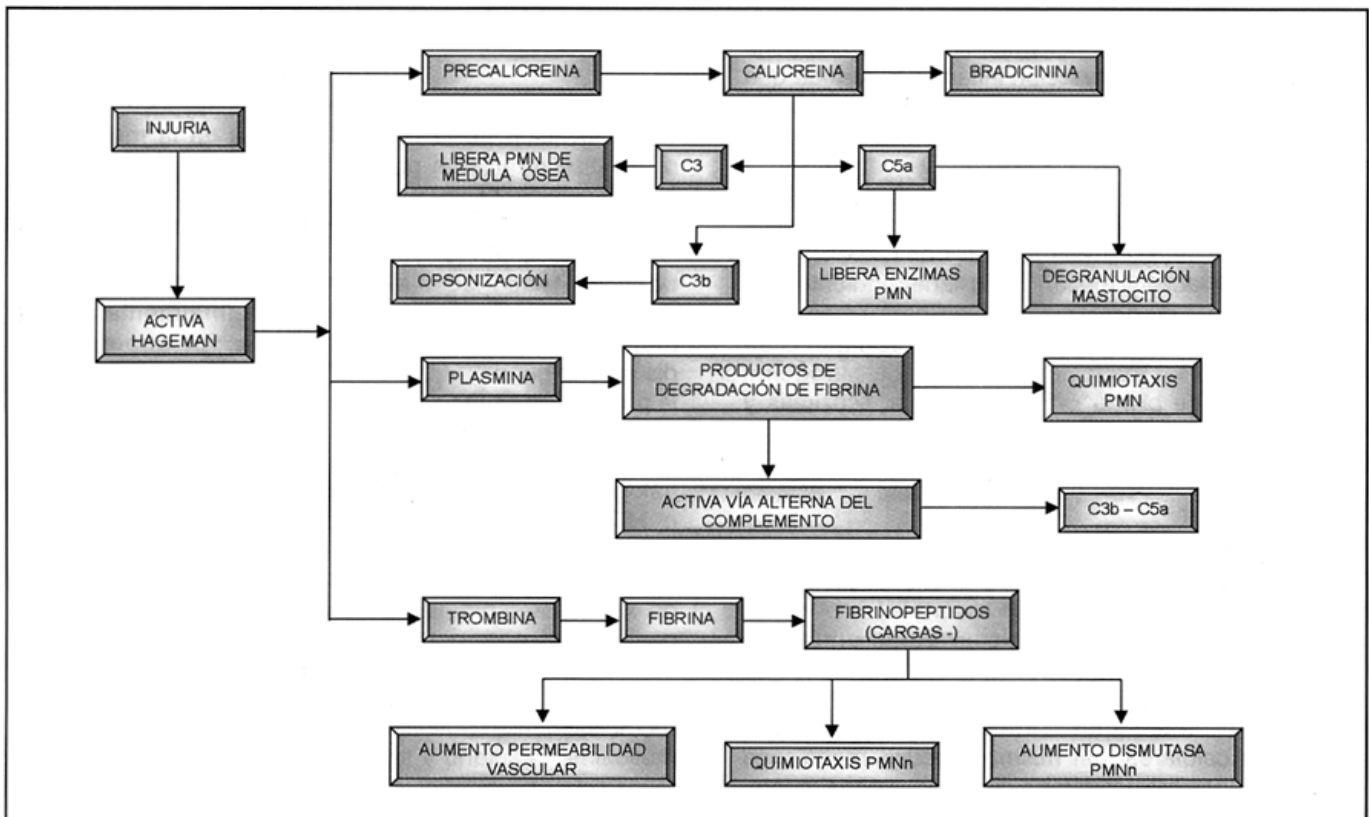


Figura 3. Activación del Factor de Hageman

conocidas como CIS-CIS entre las que se encuentran el factor quimiotáctico estimulador de macrófagos (MCAF), RANTES, MIP<sub>1a</sub> y MIP<sub>1b</sub>; y otro grupo que activa polimorfonucleares conocidas como CIS-X-CIS que incluyen IL<sub>8</sub>, proteína activadora de neutrófilos (NAP<sub>2</sub>), factor plaquetario 4 (PF<sub>4</sub>), factor estimulador de crecimiento de melanoma (MGSA) y la betatromboglobulina ( $\beta$ -TG).<sup>39</sup>

El mecanismo por el cual actúan las quimokinas es semejante a todos los procesos biológicos que inducen síntesis de proteínas, de tal manera que actúan por medio de la PG activando la PLC, que degrada el fosfatidil inositol difosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El DAG tiene dos vías de acción: activa por un lado la PLA<sub>2</sub> de membrana para generar metabolitos del ácido araquidónico, los cuales potencian los efectos inflamatorios, y factor activador de plaquetas (PAF) quien activa plaquetas, es quimiotáctico para eosinófilos y contribuye a la degranulación de los polimorfonucleares; la otra vía activa la PKC citoplasmática que a través de fosforilación de proteínas permite la degranulación y secreción enzimática, así como la activación de los sistemas oxidativos. El IP<sub>3</sub> actúa sobre receptores de membrana para inducir liberación de calcio al citoplasma, que al final se traduce en activar polimerización de actina que interviene en procesos de quimiotaxis y englobamiento, activa la síntesis de FNT $\alpha$ , y por último al activar PLA<sub>2</sub>, se retroalimenta el proceso sosteniendo los niveles de DAG (Figura 5).

Una vez superada la transmigración, se genera una serie de procesos dentro de la reacción inflamatoria aguda que se traducen en quimiotaxis, fagocitosis, amplificación de la respuesta entre otros, que no son el objetivo del presente artículo. Nuestra atención se centra en la instauración de otros mecanismos bactericidas inducidos dentro del macrófago. Para facilitar su comprensión vamos a considerarlos como mecanismos dependientes de oxígeno por un lado, y mecanismos independientes de oxígeno por otro. Los primeros incluyen básicamente las especies reactivas de oxígeno; en los segundos se consideran tanto las especies reactivas de nitrógeno, como el cambio de pH, la B/PI, lactoferrina, lisozimas y defensinas.

### Radicales libres

A partir del estímulo iniciado por las quimokinas, los radicales libres potencian efectos bactericidas, y a su vez inducen fenómenos de disfunción endotelial cuando se incrementan los niveles fisiológicos. Estas entidades químicas tienen la particularidad de ser extraordinariamente inestables, lo cual les confiere la propiedad de reaccionar inespecíficamente con componentes celulares, así mismo producir reacciones en cadena y daños estructurales a distancia. Normalmente, como resultado del metabolismo celular se generan concentraciones muy bajas de radicales libres, y además

de inactivarse inmediatamente, tienen un radio de acción muy limitado; por el contrario, cuando son generados en el proceso de inflamatorio sus concentraciones son altas, aumentando la probabilidad de reaccionar con otros radicales o compuestos no radicales, lo que induce una reacción en cadena que amplifica el fenómeno miles de veces. Tal es el caso de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, que aunque el radical libre inicial produce sólo efectos locales, el radical secundario y los productos de degradación oxidativa producen efectos a distancia del sitio de formación del primer radical.<sup>40</sup>

### Radicales libres de oxígeno

Como se mencionó anteriormente, para la activación de esta ruta se requiere de un ligando (bacteriano), complejos Ag-Ac, quimiotácticos, entre otros, lo cual se traduce en la activación de receptores en la membrana plasmática, acoplados a proteína G; se estimula de esta manera la PLC con la consiguiente liberación de IP<sub>3</sub> y DAG, involucrados en la elevación de Ca<sup>++</sup> intracitoplasmático. Esta vía tiene dos funciones importantes en el estallido oxidativo: por un lado el DAG induce la traslocación de proteincinasa C del citosol a la membrana plasmática para fosforilar proteínas del sistema oxidasa; y por otro lado, el Ca<sup>++</sup> permite el ensamblaje de microtúbulos y la activación del sistema actina/miosina para la secreción de gránulos y motilidad. Para esto, además se requiere de un aumento del consumo de O<sub>2</sub> para formar las especies reactivas de oxígeno destinados a la destrucción bacteriana (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>, HClO, OCl<sup>-</sup>).

Como primera medida ocurre aumento de O<sub>2</sub> por el sistema, y la activación de la NADPH-oxidasa de la membrana plasmática (gracias a proteincinasa C), donde la enzima es reducida por el NADPH generado en el ciclo del fosfato-pentosa. De esta manera se genera el radical superóxido que debido a su inestabilidad reacciona en dos sentidos básicos: Por un lado, la citocromo C transforma el O<sub>2</sub> a singulete de O<sub>2</sub> para estabilizarse finalmente en O<sub>2</sub> molecular y luz; otra vía mediada por superóxido-dismutasa genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para finalmente progresar hacia la producción de H<sub>2</sub>O por la glutatión reductasa (GSSG), o bien generar radical hidroxilo en presencia de hierro (Fe<sup>++</sup>); finalmente puede transformarse a compuestos halogenados, por la mieloperoxidasa, como por ejemplo el HClO, siendo productos altamente tóxicos, ya que el HOCl disminuye el pH, y con el concurso del Ca<sup>++</sup> se activan las proteasas que forman xantina-oxidasa a partir de xantina deshidrogenasa, sirviendo de esta manera como catalizador para generación de nuevos radicales superóxido por avidez de la xantina. Otro de los efectos de los compuestos halogenados consiste en la formación de mono y dihidroaminas que oxidan residuos de cisteína, metionina, triptófano y tirosina, por lo cual este efecto se manifiesta en un relativo aislamiento de la célula con su entorno, alteración de la comunicación interna y daños irreversibles en proteínas estructurales, debido a que la

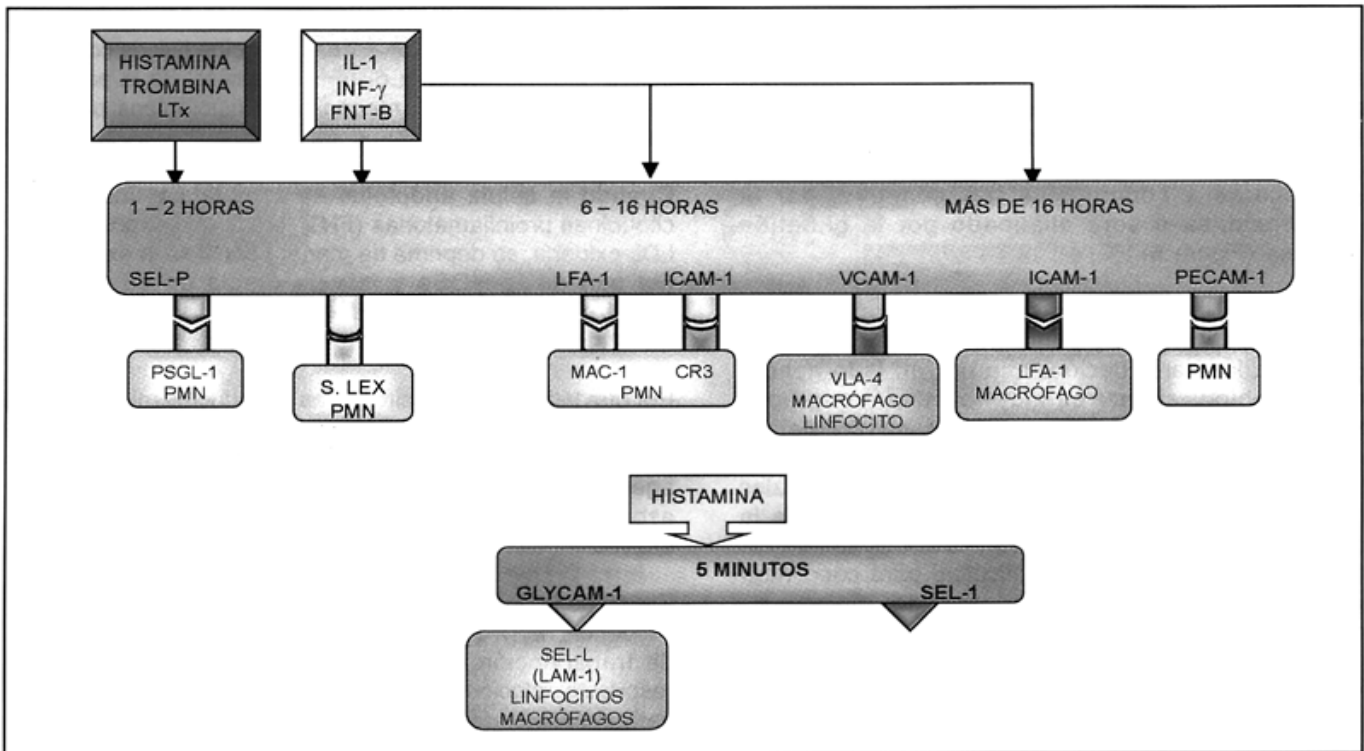


Figura 4. Moléculas de adhesión

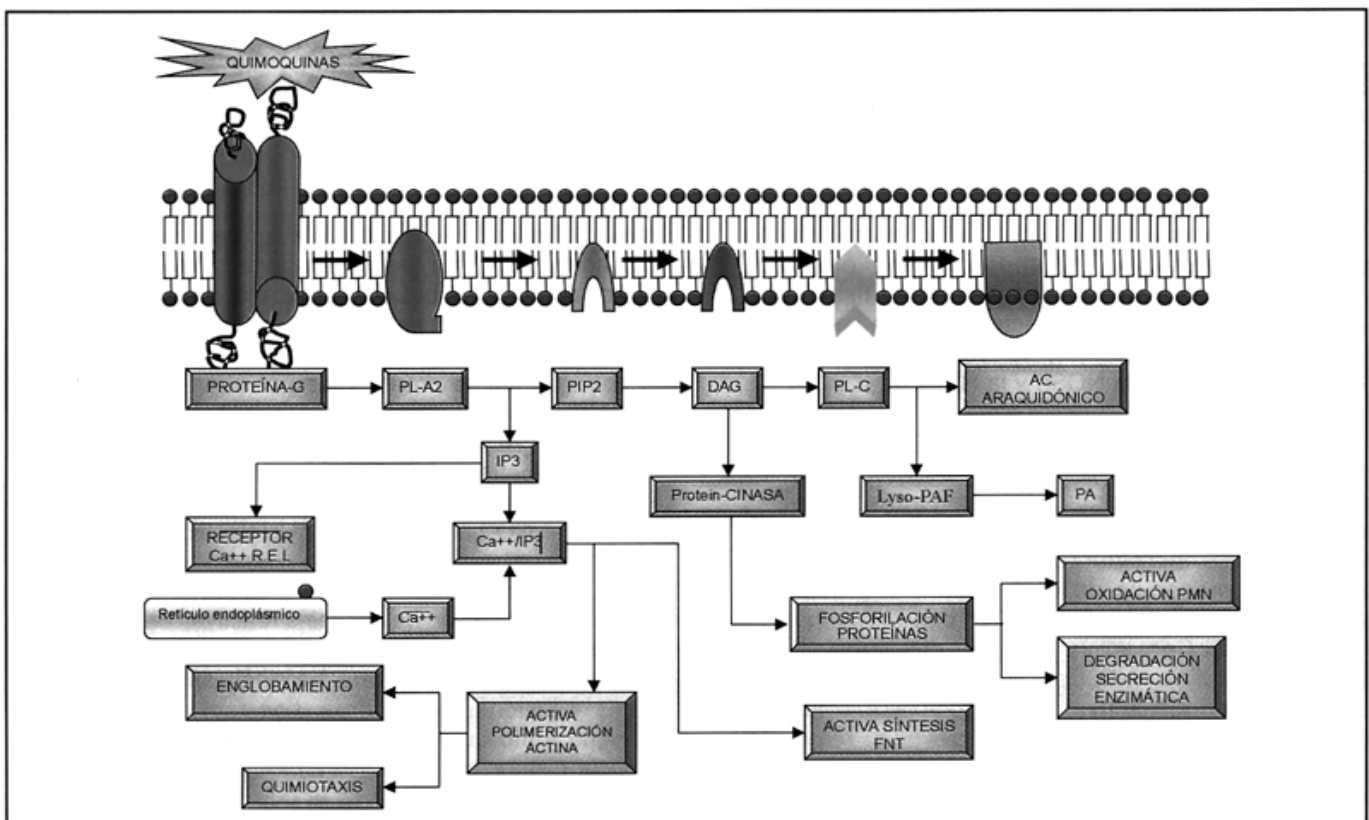


Figura 5. Acción de las quimocinas



mayor parte de receptores transmiten información gracias a la fosforilación de estos residuos de tirosina. El citocromo-b realiza la eliminación del  $O_2$  formando anión superóxido, que será secretado al fagolisosoma; allí mismo los aniones superóxido por la superóxido dismutasa son convertidos a peróxido de hidrógeno, pueden transformarse a compuestos halogenados, por la mieloperoxidasa o será eliminado por la glutatión peroxidasa (Figura 6).<sup>1,36</sup>

Por otro lado es necesario considerar que el mejor conocido mecanismo de daño inducido por radicales libres es la lipoperoxidación, que por un lado genera malonaldehído, el cual es muy reactivo con grupos aminos de proteínas generando bases de Schiff, permitiendo su identificación con fluorescencia, lo cual permite evaluar el proceso. Por otro lado genera radicales peroxilos, hidroperoxilos, que provocan rigidez de la membrana, lo cual interfiere con la movilización de proteínas derivándose en una dificultad para concentrar receptores en un compartimiento de membrana determinado; además reaccionan con los grupos sulfhidrilo desestabilizando la estructura terciaria de las proteínas. Sobre los ácidos nucleicos produce hidroxilación de bases nitrogenadas con la consecuente inhibición de la síntesis protéica, con relación a los carbohidratos se presenta despolimerización de polisacáridos, afectando con mayor intensidad las estructuras de la pared bacteriana.

### Radicales libres de nitrógeno

Para abordar este aspecto, se recuerda que el NO es un gas liberado dentro de las células por vía enzimática a partir del aminoácido l-arginina; dicha enzima es la sintasa de óxido nítrico (NOS) de la cual existen tres isoformas: NOSn (presente en neuronas cerebrales), NOSe (en células endoteliales) y NOSi (inducible en el macrófago); las dos primeras son dependientes de elevadas concentraciones de  $Ca^{++}$  y tienen función fisiológica, mientras la última es independiente de  $Ca^{++}$  e importante en los procesos inflamatorios; por cuestiones de interés sólo nos referiremos a la NOSe y la NOSi.

Constitutivamente la activación de la NOSe tiene como función mantener niveles bajos de NO para garantizar las propiedades vasodilatadoras y antiagregantes requeridas para una buena función hemodinámica. La activación de esta enzima se incrementa por el aumento de  $Ca^{++}$  citosólico y presencia de calmodulina al producirse mecanoactivación de canales de  $Ca^{++}$  con el flujo pulsátil de la sangre. El  $Ca^{++}$  activa la NOSe que transforma l-arginina en l-citrulina y NO. Este último difunde al músculo liso vascular donde activa guanilatociclasa soluble y aumenta los niveles de GMPc que provocan relajación del tejido muscular. La enzima constitutiva requiere de estímulos para la liberación de NO, dentro de los cuales mencionaremos: acetilcolina (Ach), ATP o bradicinina, así

como agonistas independientes como el ionóforo de  $Ca^{++}$  e inhibidores de la ATPasa. Los estímulos físicos como el estrés de rozamiento, la distensión pulsátil de la pared o la hipoxia representan mecanismos fisiológicos para la liberación de NO por el endotelio.<sup>39</sup>

Cuando la célula endotelial es sometida al influjo de citoquinas proinflamatorias (FNT $_{\alpha}$  e IL $_1$ ) o la exposición a LDL oxidada, se deprime de manera sensible la expresión del gen de la NOSe y la vida media de su ARNm, aumentando la actividad de COX $_1$  y llevando a disminución en la producción de NO por vía constitutiva.

Por otro lado, gracias a citoquinas y productos microbianos (FNT, IFN $_{\alpha/\beta}$ , IFN $_{\gamma}$ , LPS) se induce la NOSi en los macrófagos libres y residentes; igualmente lo realizan agentes no microbianos/no citoquina como el ozono y asbesto que también participan en la expresión de la enzima inducible.<sup>40</sup>

El gen de la enzima NOSi consta de un promotor con una secuencia de "TATA-box" y regiones para unión de factores de transcripción (NFK $\kappa$ B), región para elementos de respuesta relacionada con LPS (NF-IL $_6$ -NFK $\kappa$ B) y región para elementos de respuesta para INF $_{\alpha}$ , LPS y para unión del factor regulatorio de INF (IRF-E).

Existen descritas otras vías de generación de ON, como es el caso de la vía no enzimática, a partir de l-arginina o d-arginina, en presencia de peróxido de hidrógeno, como respuesta del organismo al estrés oxidativo generado por ejemplo en los procesos inflamatorios; también la producción no enzimática a partir de reducción de nitritos, que se activa en situaciones de hipoxia por efectos catalíticos del pH ácido.<sup>1</sup>

Todo lo anterior se traduce en la formación de grandes cantidades de NO por tiempo prolongado, lo cual confiere al gas actividad citotóxica y citostática contra virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos y células tumorales. Las acciones antimicrobianas y citotóxicas del NO son igualmente potenciadas por otros productos del macrófago como el glutatión, cisteína,  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ . Aunque la alta producción de NO inicialmente está orientada a la protección contra la infección, el efecto supresivo en la proliferación de linfocitos y el daño a la célula huésped confieren al NO una función dual protectora/destructiva.

La consecuencia inmediata de la producción incontrolada de NO es la activación de especies reactivas de nitrógeno, que por su inestabilidad reaccionan con otras estructuras celulares y en cadena para producir sustancias más tóxicas y lesionar estructuras. Los radicales libres de nitrógeno junto con los de oxígeno generan en última instancia disfunción endotelial con los conocidos efectos a nivel cardiovascular, que es el punto de interés.

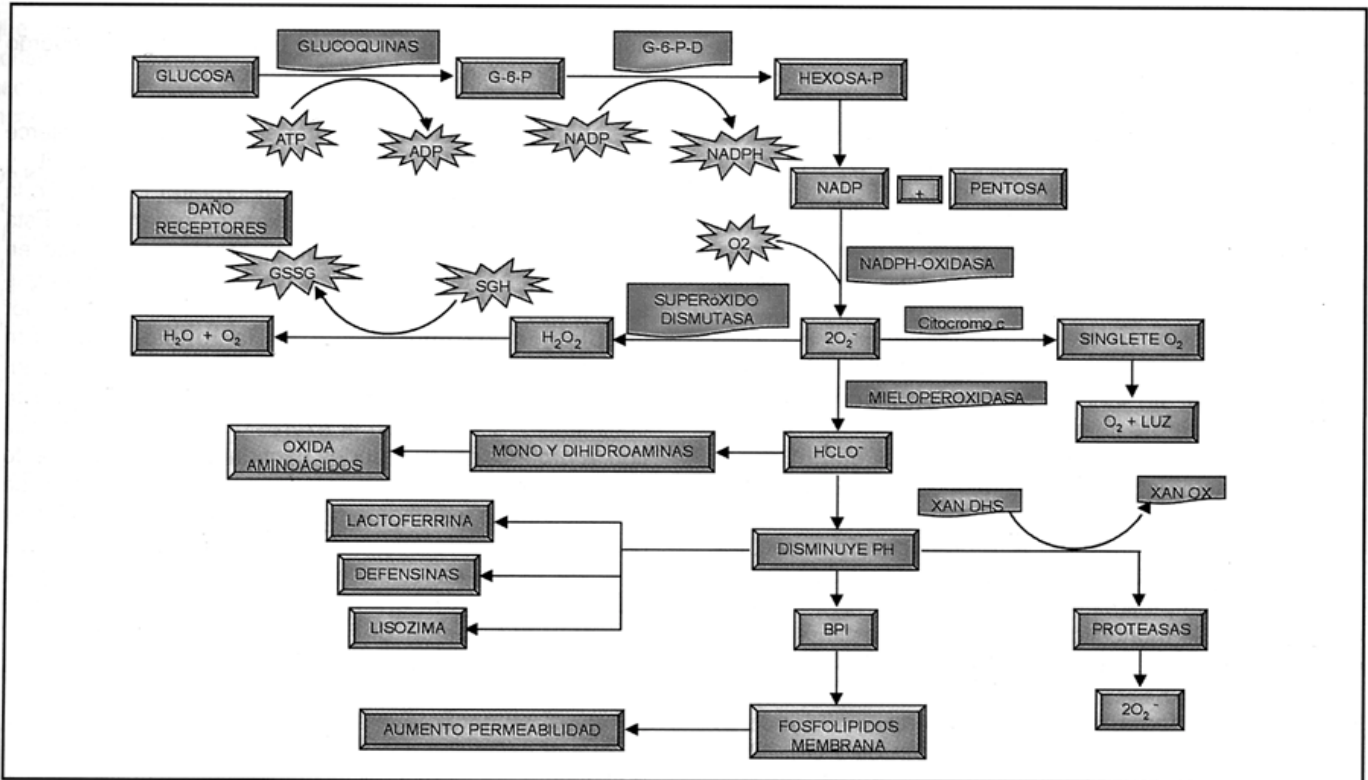


Figura 6. Producción de radicales libres de oxígeno

El ON como radical inestable tiene numerosas alternativas de reacción, de las cuales podemos considerar las siguientes: reacciona con el radical superperóxido ( $O_2^-$ ) para formar el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el cual puede reaccionar en cadena para oxidar grupos sulfhidrilo de proteínas, moléculas de lípidos y DNA, atacar la glutamina sintetasa para impedir la formación de glutamina, finalmente se transforma en ácido peroxinitroso que por disociación produce  $NO_3^- + H^+$  contribuyendo así a la disminución del pH. Como producto intermediario de esta vía, se genera radical hidroxilo altamente tóxico. Por esta vía se activa además la COX, la cual induce la formación de radicales libres.

Por reacción con el oxígeno molecular produce  $NO_2$  el cual se transforma a  $N_2O_4$  y éste a sus productos finales inactivos  $NO_2$  y  $NO_3^-$ . Por reacción con el  $Na^+$  se forma  $NaNO_2$  que se disocia a  $HNO_2$ , el cual contribuye a la acidificación del medio, siendo tóxico para las bacterias.

Reacciona con el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) generando GSH (peroxiglutatión), libera  $Fe^{++}$  de las bacterias y contribuye al rompimiento de las cadenas de ADN, ocasionando la muerte de los microorganismos.

Reacciona con radicales libres lipídicos para producir peroxinitrito lipídico. Induce la formación de nitrosotioles como s-nitrisoglutatión y s-nitrosocisteína potentes

bacteriostáticos, bactericidas y parasiticidas. Bloquea intermediarios del ciclo de Krebs, lo cual disminuye los niveles de ATP disponibles. Por disociación a ácido nitroso ( $HNO_2$ ) disminuye el pH.

Bloquea la ribonucleótido reductasa interrumpiendo la síntesis de ADN y de proteínas tardías en el ciclo celular por falta de desoxiribonucleótidos, impidiendo la replicación viral y la síntesis de factores de virulencia, entre otros.

Las diferentes posibilidades de reacción del NO están orientadas inicialmente a destruir los microorganismos, sin embargo también los efectos en cadena se extienden a células vecinas como es el caso del endotelio vascular, donde contribuyen en la generación de una serie de alteraciones que denominamos disfunción endotelial.

**Disfunción endotelial**

Ante todo se recuerda el papel multifuncional que desempeña el endotelio dentro de la circulación sanguínea, siendo a su vez un factor crítico en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. Constituye la interfase multifuncional entre la circulación sanguínea, tejidos y órganos. Es una barrera selectivamente permeable para macromoléculas.

Corresponde a un tejido metabólicamente activo, fuente de múltiples factores (péptidos, proteínas, lípidos) que son críticos para la homeostasis normal; donde se incluyen estimuladores e inhibidores del crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDFG), factor transformante de crecimiento beta ( $TGF_{\beta}$ ), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), glicosaminoglicanos análogos a heparina, vasoconstrictores y vasodilatadores como endotelina 1 (ET<sub>1</sub>), angiotensina II y el antiguo factor relajante del endotelio (NO).<sup>49</sup>

Contiene diversas propiedades protrombóticas, estimulando por un lado la agregación plaquetaria y la adhesión mediante la producción del factor de Von Willebrand (FvW) y factor activador plaquetario (PAF); generando factores procoagulantes como el factor tisular, factores ligadores de IXa y Xa; inhibiendo la fibrinólisis, por medio del inhibidor de t-PA; o produciendo moléculas de adhesión leucocitaria (selectina E, selectina P, ICAM<sub>1</sub>, VCAM<sub>1</sub>) y múltiples citoquinas (IL<sub>1</sub>, IL<sub>6</sub>, IL<sub>8</sub>), péptido quimiotáctico de monocitos (MCP<sub>1</sub>), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF).

Manifiesta propiedades antitrombóticas, inhibiendo la agregación plaquetaria por la producción de PGI<sub>2</sub>, NO y ADPasa; inhibiendo la trombina para lograr efectos anticoagulantes por la producción de moléculas análogas a la heparina, activación de la proteína C/S por la trombomodulina y generación de macroglobulina a<sub>2</sub>; o bloqueando la fibrinólisis con la producción del activador tisular del plasminógeno (t-PA).

La disfunción endotelial aparece no solamente durante los procesos inflamatorios, sino que es un mecanismo común en hiperhomocisteinemia, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipertensión y tabaquismo, entre otros, generando una alteración multifactorial que altera el equilibrio entre las propiedades trombogénicas y trombolíticas y alterando su permeabilidad para lipoproteínas.<sup>1</sup>

En lo que nos ocupa, es decir, el papel que las infecciones agudas o crónicas desempeñan en la disfunción endotelial, se puede plantear que los estudios no precisan el mecanismo por el cual los microorganismos inducen la lesión aterosclerótica, ya que en varias oportunidades y en forma repetitiva los cultivos de dichas placas son estériles; esto indica que el microorganismo no ejerce una acción directa, sino mediada por los factores de respuesta inmune producidos a distancia; esto explica además la íntima asociación epidemiológica entre IAM, activación de la placa y reestenosis tras la aplicación de Stens en arterias coronarias, con niveles elevados de proteínas de fase aguda y citoquinas proinflamatorias. Se llegó a pensar que el macrófago que inicialmente contacta y fagocita partículas bacterianas (*C. pneumoniae*) migraría al sitio de lesión aterosclerótica para potenciar el daño mediado por radicales libres, hipótesis que sería una

asociación meramente casual que no está de acuerdo con la consistencia de las observaciones.

La inflamación asociada a procesos infecciosos, ejerce disfunción endotelial a través de citoquinas como IL<sub>1</sub>, IL<sub>6</sub> y TNF $\alpha$ , que son liberadas por el macrófago cuando en la primera fase hace contacto con los microorganismos. Esta observación se sustenta por el efecto observado en infecciones bacterianas productoras de endotoxinas que estimulan la liberación de IL<sub>1</sub> y TNF $\alpha$ , las cuales por circulación sistémica, alteran la función mediante "aturdimiento" endotelial; este efecto se traduce en disminución en la expresión de la enzima NOS<sub>e</sub> de tipo constitutivo, aumento en la expresión de NOS<sub>i</sub> endotelial con la producción de grandes cantidades de NO, aumento en la expresión de COX<sub>1</sub>, que induce la producción de radicales libres y aumento en la expresión de las enzimas de la cascada oxidativa. Estas cuatro situaciones llevan a la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que se traducen en inhibición de la respiración mitocondrial, lesión del ADN, nitrosación proteica y producción de radical hidroxilo.<sup>1</sup>

A su vez, se generan círculos de potenciación del efecto, ya que al estimularse la NADP-oxidasa, se activan genes que responden a oxidación, para la síntesis de factores de crecimiento, quimoquinas y moléculas de adhesión que permiten la interacción del endotelio con leucocitos y el crecimiento de las células musculares lisas.

Al afectarse la permeabilidad del endotelio como efecto de los agentes inflamatorios, se aumenta la permeabilidad para lipoproteínas (LDL) y se acelera el potencial de su oxidación, lo cual induce mayor activación del endotelio, que garantiza la trans migración de monocitos sanguíneos, su transformación a macrófagos y la expresión del receptor "barrendero" para LDL oxidada. Este proceso acelera nuevamente la oxidación de LDL, que disminuye los niveles de GMP cíclico inducido por NO, porque disminuye la producción de NO y aumenta la vasoconstricción inducida por agonistas.<sup>1</sup>

Uno de los aspectos importantes en la activación de la placa aterosclerótica es la intensa lipoperoxidación resultante de la activación de NOS<sub>i</sub> tanto en el endotelio como en el macrófago, que por incremento de radicales libres de oxígeno, desvían el equilibrio hacia la producción de grandes cantidades de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el cual además de sus efectos oxidantes, impide la degradación del superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) hacia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por ser una vía tres veces más rápida que esta.<sup>1</sup>

Al activarse todos los procesos oxidativos y sostenidos por la acción de citoquinas, se induce de manera activa la migración de células musculares lisas hacia la íntima, y diferenciación hacia fibroblastos para aumentar el tamaño de la placa. Además que alterado el equilibrio endotelial, se presenta una respuesta anormal ante el estrés dinámico

que se produce en la superficie del endotelio, con la consecuente formación de trombos y progresión acelerada hacia la disminución del calibre vascular, que conlleva a incrementar la isquemia del tejido distal.

Observando la relación que guardan los niveles elevados de TNF $\alpha$  y IL $_6$  con los niveles de P-CR, consideramos prudente realizar una serie de estudios de tipo epidemiológico que busquen asociación entre P-CR y activación de la placa aterosclerótica en pacientes con infección aguda previa o con infección crónica, con el fin de evaluar si los niveles de P-CR sirven de pronóstico en enfermedad cardiovascular isquémica aterosclerótica, y en la estenosis post angioplastia y aplicación de Stens.

## SUMMARY

The recurrent inflammatory states of infection figure as one of the mechanisms that provoke the presence of vascular events due to endothelial dysfunction. It is known that a big number of mediators participate in the dysfunction process: adhesion molecules, proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL $_1$ , IL $_6$ , IL $_8$ ), growth factors, COX $_2$ , NOS inducible, eicosanoids, free radicals, and others.

The general or individual effect of these substances determines a change in the activities of endothelial synthesis and metabolism, that increases vasospasm tendency, lipoprotein permeability alteration, white cells migration, diminution in the endothelial regeneration, fibrinolytic imbalance that will cause the thrombin generation, and platelets and fibrin deposit with the following formation of the atherosclerotic plaque.

It is important to recognize NO not only as a mediator and a regulator of normal vascular physiology but also as a active metabolite and multifunctional substance that in the case of the infection and inflammation interferes in the endothelial cell biological cycle (by the inhibition of mitochondrial respiration, generation of more toxic radicals and a direct damage of DNA); this conduces to the maintenance of the imbalance in the endothelial production of hemostatic and hemodynamic mediators, having more impact those which conduces to endothelial injury. In this way, the migration of smooth muscle cells to the intima and fibroblast differentiation increase the size of the atherosclerotic plaque, can be induced; an abnormal response to the dynamic stress, with a following thrombus formation and an accelerated diminution of the vascular caliber which increases the distal tissue ischemia

**Key words:** Inflammation, endothelium, nitric oxide, free radicals, atherosclerosis.

## REFERENCIAS

- López-Jaramillo P. Bioquímica del endotelio vascular. Cuarta edición. Santiago de Cali: Editorial Univalle, 1998: 245.
- Tillet HE, Smith JW, Gooch CD. Excess deaths attributed to influenza in England and Wales: age at death and certified cause. *Int J Epidemiol* 1983; 12:344-52.
- Saikka P, Leinonen M, Tenkanen L, et al. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med* 1992; 116:273-8.
- Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS, et al. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1995; 92:3397-400.
- Vahtonen V, Kuikka A, Syjanen J. Thrombo-embolic complications in bacteraemic infections. *Eur Heart J* 1993; 14 (suppl K): 23-6.
- Mamode N, Cobbe S, Pollock JG. Infarcts after surgery. *BMJ* 1995; 310: 1215-6.
- Meier CR, Jick SS, Derby LE, et al. Acute respiratory-tract infections and risk of first-time acute myocardial infarction. *Lancet* 1998; 96:1467-71.
- Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and reestenosis. An assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997; 96:4095-103.
- Gurfinkel E, Bozovich G, Daroca A, et al. Randomised trial of roxithromycin in non-Q-wave coronary syndromes. *Lancet* 1997; 350:404-7.
- Gupta S, Leatherman EW, Carrington D, et al. Elevated Chlamydia pneumoniae and coronary Heart disease. *BMJ* 1997; 514:1778-9.
- Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997; 350:430-6.
- Moazed TC, Kuo C, Patton DL, et al. Experimental rabbit models of Chlamydia pneumoniae infection. *Am J Pathol* 1996; 148:667-76.
- Fong JW, Chiu B, Vira E, et al. Rabbit model for Chlamydia pneumoniae infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35:48-52.
- Muhlestein J, Anderson J, Hammond E, et al. Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in rabbit model. *Circulation* 1998; 97:633-6.
- Patel P, Mendall MA, Carrington D. Association of Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ* 1995; 311:711-4.
- Mendall MA, Patel P, Ballam L, et al. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study. *BMJ* 1996; 312:1061-5.
- Baigrie FJ, Lamont PM, Whiting S, et al. Portal endotoxin and cytokin responses during abdominal aortic surgery. *Am J Surg* 1993; 166:248-51.
- Basaran Y, Basaran MM, Babacan KF, et al. Serum tumor necrosis factor levels in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *Angiology* 1993; 44:332-7.
- Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, et al. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol* 1995; 269:R229-R35.
- Miyao Y, Yasue H, Ogawa H, et al. Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1993; 126:1299-304.
- Martich GD, Boujoukos AJ, Suffedini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology* 1993; 187:403-16.
- Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331:417-24.
- Brody JI, Pickering NJ, Capuzzi DM, et al. Interleukin-1 alpha as a factor in occlusive vascular disease. *Am J Clin Pathol* 1992; 97:8-13.
- Bhagat K, Moss R, Collier J, et al. Endothelial stunning following a brief exposure to endotoxin. A mechanism to link infection and infarction. *Cardiovasc Res* 1996; 32:822-9.
- Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 1997; 96:3042-7.
- Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 119:771-8.
- Neuman FJ, Ott I, Gawwas M, et al. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; 92:748-55.
- Tashiro H, Shimokawa H, Yamamoto K, et al. Monocyte-related cytokines in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 130:446-52.
- Smith CJ, Sun D, Hoegler C, et al. Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circ Res* 1996; 78:58-64.
- Darley-Usmar V, Halliwell B. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions and the vascular system. *Pharm Res* 1996; 13:649-62.
- Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9:1319-30.
- Habib A, Creminon C, Frobert T, et al. Demonstration of a inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase. *J Biol Chem* 1993; 268:23448-54.
- Moncada S, Higgs EA, Hodson HF, et al. The L-arginine: Nitric Oxide pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17:S1-S9.
- Bhagat K, Collier J, Vallance P. Vasodilatation to arachidonic-acid humans. An insight into endogenous prostanoids and effects of aspirin. *Circulation* 1995; 92:2113-8.
- Vallance P, Patton S, Baghat K, et al. Direct measurement of nitric-oxide in human-beings. *Lancet* 1995; 346:153-4.
- Kuby J. Immunology. Third edition. New York. W.H. Freeman & Company, 1997:370-3.
- Rojas M W. Inmunología. Décima edición. Medellín: CIB, 1995:31-6.
- Murray R K. Bioquímica de Harper. 13ª edición. Buenos Aires: El Manual Moderno SA, 1994:837-8.
- López-Jaramillo P. La vía L-arginina-óxido nítrico: de su descubrimiento a sus aplicaciones clínicas. Primera edición. Quito: Ediciones Científicas, 1995:56-7.
- MacMicking J, Quiao-wen X, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:323-50.
- Born GV, Schwartz CJ. Vascular endothelium. Physiology, Pathology and Therapeutic opportunities. First edition. New York: Schattauer (New horizon series), 1997:287-94.