

Educación y Formación Médica

La vía L-Arginina-Óxido Nítrico y la Cátedra Lope Carvajal-Peralta: Dos Modelos Novedosos e Integradores

Patricio López-Jaramillo ¹
Norma Cecilia Serrano Díaz ²
Juan Pablo Casas ³
J. Hernán Villa-Roel ⁴.

Resumen

Varias instituciones públicas y privadas de la ciudad de Bucaramanga decidieron formar la corporación Instituto Colombiano de Investigaciones Biomédicas ICIB para fortalecer y acelerar el desarrollo de los grupos y centros de investigación en el campo de las ciencias biomédica en el Departamento de Santander. La misión principal de esta organización es la de crear un centro fuerte en investigación; y en este contexto ha sido creada la cátedra Lope Carvajal-Peralta. Su objetivo principal es el de identificar los recursos humanos que puedan participar en ese proceso de desarrollo. Por esta razón la Vía L-Arginina-Óxido nítrico, recientemente descubierta y su caracterización como un sistema generalizado y ubicuo para la comunicación celular, nos ofrece la posibilidad de unir varias especialidades médicas y biomédicas en su estudio. Esta vía desarrolla funciones en toda la economía humana y su descripción en diferentes sistemas no se ha dilucidado totalmente.

El artículo tratará de describir en forma sintética algunas de las funciones del óxido nítrico (ON) en el hombre y enfatizará en algunos puntos en los cuales la cátedra Lope Carvajal-Peralta investigará en un futuro así como una línea importante de investigación para desarrollar en Colombia.

Palabras clave

Óxido Nítrico, L-Arginina, Endotelio.

¹ MSc en Biología. Ph.D en Ciencias. Instituto Colombiano de Investigaciones Biomédicas.

² MSc en Genética Humana. Centro del Conocimiento Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga.

³ MD. Fundación Cardiovascular del Oriente Colombiano.

⁴ Director Ejecutivo del Instituto Colombiano de Investigaciones Biomédicas.

Correspondencia:

Patricio López-Jaramillo

Director Científico

Instituto Colombiano de Investigaciones Biomédicas
A.A.#.384, Bucaramanga, Colombia.

Teléfono: (577) 6399561

Fax: (577) 6392744

E-mail: ibiomedi@b-manga.cetcol.net.co

INTRODUCCIÓN

La necesidad de fortalecer y acelerar el desarrollo de grupos de investigación productivos en el área Biomédica en el Departamento de Santander, determinó que en una actitud objetiva, realista y madura, varias instituciones públicas y privadas del sector Salud de la ciudad de Bucaramanga decidieran en un esfuerzo integrador contribuir con sus recursos y potencialidades para conformar la Corporación Instituto Colombiano de Investigaciones Biomédicas, (ICIB), organismo que tiene la misión principal de crear, a través de acciones de promoción y gestión, las mejores condiciones posibles a corto, a mediano y a largo plazo, para que las instituciones corporadas formen, consoliden, crezcan y mantengan líneas y grupos de investigación biomédica, que a través de su producción científica y tecnológica contribuyan al desarrollo regional e integral del país. La conjunción entre instituciones del sector público con gran tradición y prestigio en el área educativa-investigativa, como la Universidad Industrial de Santander (UIS), y particularmente su Facultad de Salud, con instituciones privadas de sólido desarrollo tecnológico y académico, con reconocida calidad en la prestación de servicios médicos como la Fundación Cardiovascular del Oriente Colombiano (FCV), y la Fundación Oftalmológica de Santander, Clínica Carlos Ardila Lulle (FOS-CAL), con instituciones jóvenes y transformadoras como la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Bucaramanga (UNAB), junto con entidades no directamente relacionadas con el sector salud pero de gran solvencia científico-técnica como el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), contribuirá a soportar el proceso que busca convertir a Bucaramanga en un polo de desarrollo Científico - Tecnológico en Biomedicina.

Es en éste contexto que se crea la Cátedra Lope Carvajal-Peralta, en honor al ilustre médico cirujano bumangués, fallecido en plena etapa productiva de su brillante carrera. La cátedra con carácter formativo, coordinada por el Centro del Conocimiento de la Facultad de Medicina de la UNAB, en estrecha colaboración con el ICIB y las instituciones que la conforman, está abierta a todos los docentes, estudiantes y profesionales de la salud, se realiza con una periodicidad de dos horas semanales en una sola sesión. La Cátedra tiene como objetivo fundamental crear espacios propicios en los cuales la comunidad académica pueda problematizar en torno a una temática específica, de lo cual se derivarán grupos de estudio, los cuales serán los proponentes de proyectos de investigación, multidisciplinarios, interinstitucionales, relevantes y factibles de realizarse en las instituciones que conforman el ICIB. La Cátedra Lope Carvajal-Peralta, así concebida, pretende identificar e integrar voluntariamente a todos los recursos humanos que podrían participar del proceso de desarrollo del área Biomédica. Sí el objetivo de la cátedra es globalizador e integrador, lógicamente se debía encontrar un tema de iguales características. La vía L-Arginina-Oxido Nítrico,

recientemente descubierta, y su caracterización como un sistema generalizado y ubicuo para la comunicación celular, que cumple funciones en toda la economía humana, y cuya descripción en diferentes sistemas no ha sido totalmente dilucidada, nos ofrece la posibilidad de unir alrededor de su estudio a todos los especialistas médicos y biomédicos.

Este artículo pretende en forma sintetizada describir algunas de las funciones del Oxido Nítrico (NO), en el ser humano y destacar aquellos puntos en los cuales la Cátedra Lope Carvajal-Peralta profundizará por considerarlos como líneas prioritarios de investigación a desarrollarse.

LA VÍA L-ARGININA-OXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico es un gas muy simple formado por un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno y cuya relevancia biológica se reconoce a partir de su identidad química como el Factor Relajante Derivado del Endotelio ¹ descrito algunos años antes ².

En el organismo humano el NO se forma prácticamente en todas las células de su economía a partir del aminoácido L-arginina ³, por la acción de una familia de enzimas conocidas como Oxido Nítrico Sintetas (NOS), en presencia de una molécula de oxígeno, reacción que da lugar a la formación en cantidades equimolares de NO y L-citrulina ⁴. Hasta el momento se han caracterizado tres clases de NOS, dos de los cuales, la endotelial y la neuronal son constitutivas, es decir que normalmente se encuentran expresadas en las células endoteliales y en las neuronas, son calcio-dependientes ⁵, catalizan la producción de NO en pequeñas cantidades (picomoles), y por un corto periodo. El NO producido por esta vía es utilizado por el organismo como el sistema de transducción de la Guanilato Ciclasa Soluble y cumple con funciones reguladoras de los sistemas cardiovascular y nervioso ⁶.

La tercera enzima, conocida como de tipo macrófago o inducible, tiene algunas características diferentes, especialmente relacionadas con el hecho de que normalmente no se encuentra presente en las células que la producen, siendo necesario un estímulo inmunológico (lipolisacáridos bacterianos o citoquinas proinflamatorias tipo TNF alfa, Interleuquinas 1 y 6 e Interferon gamma), para expresarse, este proceso demanda un período de 4 a 6 horas para la síntesis de proteínas de "novo"; una vez expresada la NOS tipo macrófago o inducible, cataliza la producción de NO en cantidades mil veces mayores (nanomoles), y por largos períodos. Esta enzima es calcio independiente y el NO producido por esta enzima es el que utilizan las células blancas del organismo para defenderse de la agresión de microorganismos invasores tipo bacterias, parásitos, virus, hongos, etc. Por otro parte el NO producido por esta vía está involucrado en la apoptosis y en procesos citotóxicos y citostáticos ⁷⁻⁹.

El NO, un radical libre que posee un electrón no apareado, es rápidamente inactivado (4 a 5 segundos), por procesos de oxidación que conducen a la formación de sus metabolitos inertes estables, tales como nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3); también reacciona muy rápidamente con el radical libre de oxígeno (O_2) para dar lugar a la formación de otro radical libre, el peroxinitrito (ONOO^\cdot), sustancia con alto poder oxidante y que sirve de sustrato para la síntesis de otros radicales más citotóxicos como el radical hidróxilo (OH^\cdot)¹⁰ (Fig 1).

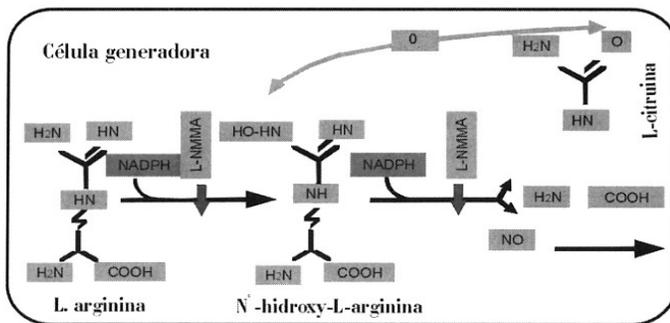


Figura 1. Síntesis de NO a partir de L-arginina.

Funciones de la vía L-arginina: Oxido Nítrico

La vía L-arginina-NO se ha descrito prácticamente en todos los sistemas del organismo, ya sea porque poseen células en las cuales existen las enzimas NOS constitutivas, o porque poseen células con la capacidad de expresar la NOS inducible. En un esfuerzo de síntesis y en términos muy generales las múltiples actividades que cumple el NO se pueden agrupar, por sus mecanismos de acción, en dos categorías:

1. Por activar la Guanilato ciclasa Soluble e las concentraciones GMP cíclico. Este es el mecanismo por el cual el NO cumple su papel como vasodilatador, antiadhesivo, antiagregante plaquetario, y de neurotransmisor y neuromodulador en el Sistema Nervioso Central y Periférico¹¹⁻¹².
2. Por unirse e inactivar diferentes enzimas que poseen centros hierro-sulfuro y que participan en el ciclo de Krebs, tal es el caso de la aconitasa¹³, o en las enzimas de los complejos I, II y III del proceso de respiración mitocondrial¹⁴, o en la ribonucleótido reductasa, enzima que limita la velocidad de síntesis del DNA¹⁵. Estos son los mecanismos que explican las acciones citotóxicas y citostáticas del NO.

Por razones puramente didácticas se discutirá a continuación los papeles fisiológicos y fisiopatológicos de la vía L-arginina-NO, separándolos por sistemas en: sistema cardiovascular, sistema nervioso y sistema inmunológico.

Sistema Cardiovascular

El NO es producido en forma continua en las células del

endotelio vascular y juega un papel fundamental en el adecuado funcionamiento del sistema cardiovascular. Las acciones vasodilatadoras, antitrombóticas y antiaterogénicas del endotelio son mediadas en gran parte por la producción adecuada y por la acción del NO. En condiciones fisiológicas es el NO, y en menor grado la producción endotelial de prostaciclina y del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), las sustancias que mantienen el tono vasodilatado del sistema cardiovascular, y juegan un papel crucial en la regulación de la presión arterial sistémica¹⁶. La actividad antiadhesiva y antiagregante plaquetaria del NO contribuye de manera importante a las acciones antitrombóticas del endotelio, que son además reforzadas por la actividad antiagregante plaquetaria de la prostaciclina y por el apropiado balance en la producción del activador tisular del plasminógeno (tPA) y del inhibidor del tPA (PAI-1), sustancias que participan en el mecanismo fibrinolítico¹⁷. También es importante destacar que las propias plaquetas poseen la maquinaria bioquímica necesaria para producir NO¹⁸.

Finalmente, el NO regula la interacción entre las células blancas sanguíneas y la pared vascular, al inhibir la adhesión y migración de los monocitos al interior de los vasos, confiriéndole al endotelio sus propiedades antiaterogénicas. Este papel del NO es mediado a través de la regulación de la expresión endotelial de las moléculas de adhesión celular tipo Molécula de Adhesión Vascular (VCAM), ICAM (Molécula de Adhesión Intercelular) y selectinas¹⁹.

En los últimos años se ha definido claramente el concepto de disfunción endotelial, refiriéndose a una pérdida global de las funciones constitutivas del endotelio, tales como, barrera macromolecular, vasodilatador, antitrombótico y antiaterosclerótico, la cual se relaciona no solamente con alteraciones en la producción o en la acción del NO, sino también con la producción anormal por parte del endotelio de otras sustancias que normalmente, o no las produce o lo hace en muy bajas concentraciones, tipo radical superóxido, endotelina o moléculas de adhesión celular.

La disfunción endotelial es la base para que factores de riesgo como: hipertensión arterial, dislipidemia, tabaquismo, inflamación, infección, hiperhomocisteinemia, edad, involucrados en la génesis de las enfermedades cardiovasculares (ECV), produzcan sus efectos nocivos. Esto es muy importante ya que el infarto agudo de miocardio y el accidente cerebrovascular, se constituyen en importantes causas de muerte entre la población colombiana²⁰. Una adecuada comprensión de los mecanismos íntimos que producen la disfunción endotelial es especialmente importante para definir actividades preventivas de las ECV, y para optar por una adecuada aproximación terapéutica de las mismas. En este sentido, el presente artículo se propone revisar algunas evidencias experimentales y clínicas, que permitirán proponer que el defecto básico que conduce a la disfunción endotelial es una alteración en el balance entre los radicales libres NO, O_2^\cdot y ONOO^\cdot . Normalmente un endotelio sano

produce NO en mayores cantidades que las mínimas de O_2 y consecuentemente muy poca cantidad de $ONOO^-$. En estas condiciones el endotelio es vasodilatador, antitrombótico y antiaterogénico. En otras situaciones como la hipertensión arterial esencial, la hipercolesterolemia, y la preeclampsia el endotelio produce menos NO y más O_2 y $ONOO^-$; por lo que pasa a ser un órgano proaterogénico, protrombótico y vasoconstrictor²¹⁻²³. A continuación se intentará ejemplificar la propuesta anterior con las evidencias experimentales y clínicas disponibles.

En la hipertensión arterial esencial se ha demostrado una producción disminuida de NO²¹, sin embargo existe una adecuada respuesta a la administración de NO exógeno²⁴. La menor producción de NO probablemente se debe a una acumulación del análogo antagonista endógeno de la síntesis de NO, la Dimetil Arginina Asimétrica²⁵, posiblemente producto de un defecto en la enzima que la metaboliza, la dimetil arginina dimetil aminohidrolasa, como se ha demostrado en células endoteliales cultivadas²⁶ (Fig 2).

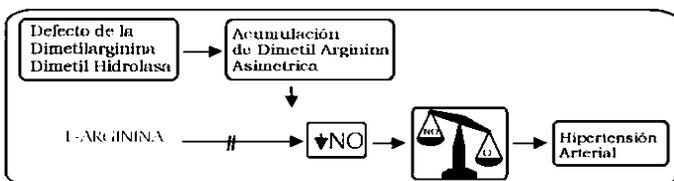


Figura 2. Desbalance de radicales libres en la hipertensión arterial esencial.

En dislipidemia se ha demostrado que la concentración aumentada de LDL estimula la actividad de la NADPH oxidasa²⁷, ocasionando una mayor producción de O_2 , el cual inactiva NO y conduce a un incremento en la concentración de $ONOO^-$ y la posterior secuencia de eventos que llevan al desarrollo de la placa aterosclerótica, (Fig 3).

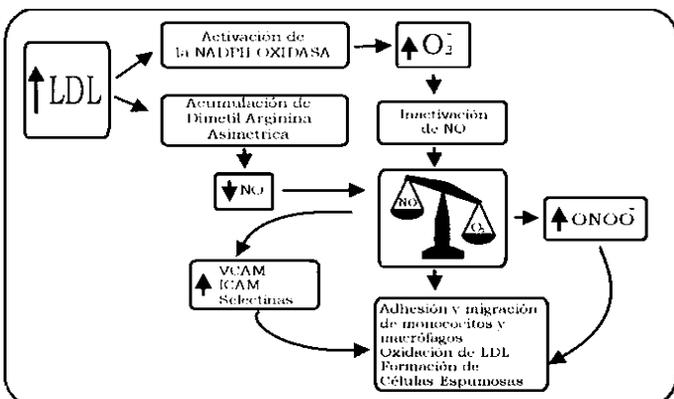


Figura 3. Desbalance de radicales libres en dislipidemia y aterosclerosis.

La preeclampsia es otra situación clínica en la cual se encuentra una producción incrementada de O_2 , relacionada probablemente con la presencia de

anticuerpos antireceptor AT1 de angiotensina II²⁸, o con fenómenos infecciosos inflamatorios²⁹, lo que lleva a una mayor inactivación de NO, a reducidas concentraciones de GMP cíclico, a activación plaquetaria, a hipertensión, a edema y a proteinuria (Fig 4).

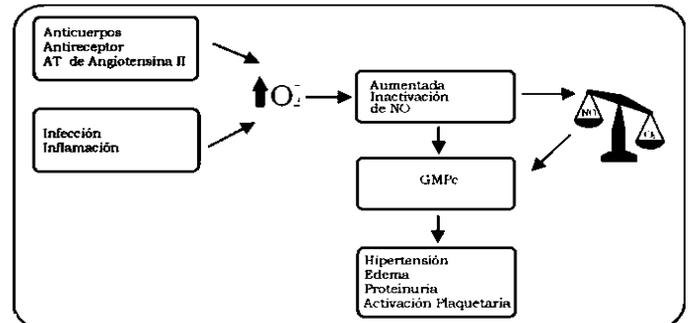


Figura 4. Desbalance de radicales libres en la preeclampsia.

La demostración de los eventos propuestos puede clarificar no solamente los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades cardiovasculares, sino también contribuir a una cabal comprensión de los mecanismos por los cuales ejercen sus efectos beneficiosos intervenciones nutricionales como el consumo de suplementos de vitaminas antioxidantes³⁰⁻³¹, de L-arginina³², de ácido fólico³³, o intervenciones farmacológicas como nitrovasodilatadores³⁴, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina³⁵, estatinas³⁶, estrógenos³⁷.

Debido a la importancia que las ECV tienen en la Salud Pública de Colombia, ésta es una de las áreas prioritarias que la Cátedra Lope Carvajal-Peralta está desarrollando.

Sistema Nervioso

Posterior a la demostración de que la NOS está presente en el cerebro de rata³⁸, y la posterior caracterización de la NOS de tipo neuronal³⁹, el desarrollo experimental en esta área del conocimiento fue vertiginoso.

En la actualidad se conoce perfectamente la distribución de la NOS neuronal en el Sistema Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP). Se han definido las acciones fisiológicas del NO como un neurotransmisor excitatorio en el SNC, su participación en la plasticidad sináptica y la memoria vía potenciación prolongada en el hipocampo y depresión en el cerebelo⁴⁰⁻⁴¹, control del flujo sanguíneo por actividad neuronal⁴², y el establecimiento y refinamiento de proyecciones axonales durante las etapas tardías del desarrollo⁴³. Recientemente nosotros hemos demostrado que los efectos beneficiosos de la terapia estrogénica sustitutiva sobre la depresión involutiva de la menopausia, se asocian a una estimulación en la producción de NO⁴⁴ en el SNC. Actualmente varios grupos están investigando el papel del NO en enfermedades como Alzheimer e isquemia cerebral⁴⁵.

Por otro lado, desde la década de los 60 se conoce que algunos nervios ejercen sus acciones por medio de otros mecanismos, diferentes a los clásicos mediadores noradrenérgicos, colinérgicos o peptidérgicos, por lo que se les denominó como el sistema de neurotransmisión no adrenérgica, no colinérgica. Actualmente se sabe que estos nervios utilizan al NO como el neurotransmisor periférico⁴⁶, y que a través de ellos el NO está involucrado en una serie de procesos fisiológicos como erección del pene, broncodilatación, relajación de esfínteres, fase relajante del peristaltismo intestinal, y que una disfunción de estos nervios nitrérgicos puede llevar a una variedad de desórdenes como la estenosis pilórica hipertrófica, la acalasia y la impotencia masculina. Es en esta área donde la caracterización de la vía L-arginina-NO ha encontrado amplias posibilidades de utilización terapéutica, como en el caso de la disfunción eréctil con inhibidores de la fosfodiesterasa de GMP cíclico⁴⁷, o como NO inhalado para el tratamiento de la hipertensión pulmonar⁴⁸.

Papel del NO en la defensa del organismo

La NOS inducible, calcio independiente, es la enzima que cataliza la producción de NO en grandes cantidades y por largo tiempo. Como se mencionó anteriormente esta enzima necesita el estímulo inmunológico de lipopolisacáridos o citoquinas proinflamatorias para expresarse, situación que ha sido demostrada en casi todos los tejidos de roedores^{50,51}, sin embargo, por motivos todavía no bien definidos, las células humanas expresan menos RNA mensajero para NOS inducible, en respuesta a citoquinas proinflamatorias, de lo que lo hacen las células de murinos. La producción de NO por macrófagos se ha asociado con los mecanismos de resistencia del huésped a las infecciones por patógenos intracelulares como parásitos, hongos, microbacterias y virus⁵²⁻⁵³. Es importante destacar que en el sistema inmunológico, al igual que en los otros sistemas anteriormente revisados, la reacción del NO con el O₂ y con metales de transición lleva a la formación de ONOO⁻ y consecuentemente a reacciones de nitrosilación con grupos tioles⁵⁴. Estas reacciones son especialmente significativas en proteínas de membrana, citosólicas y nucleares que están participando en la respiración celular, en el metabolismo intermediario, en la síntesis de DNA y en la iniciación de la transcripción, procesos todos que explicarían las acciones antimicrobianas del NO⁵⁵. Trabajos recientes sugieren fuertemente que el papel citotóxico del NO está relacionado especialmente con la capacidad que tiene para inhibir a las enzimas del complejo I de la respiración mitocondrial⁵⁶⁻⁵⁷.

La relevancia del papel de la vía L-arginina-NO en los mecanismos de defensa del organismo humano ante la agresión de virus, parásitos, bacterias y hongos, queda todavía por definirse, pero los resultados de los que se dispone por ahora son sugestivos de que tiene un papel crucial, por lo que el estudio en profundidad del tema en la Cátedra Lope Carvajal-Peralta debe originar una serie

de investigaciones en nuestro medio para dilucidar claramente la participación del NO en la fisiopatología de enfermedades con gran prevalencia en nuestra geografía como la enfermedad de Chagas, Leishmaniasis, Dengue, Micosis. Además, un adecuado conocimiento de este tema podría revelar interesantes posibilidades de intervenciones terapéuticas⁵⁸, así como explicar observaciones epidemiológicas que asocian la presencia de enfermedades tropicales al estado nutricional y a la inserción social de la población. La posibilidad de que factores nutricionales como la ingesta de arginina, de ácido fólico, de vitaminas del complejo B y de vitaminas antioxidantes como β carotenol, α tocoferol y ácido ascórbico, se relacionen con la producción e interacción de los radicales libres y con la presencia de enfermedades infectocontagiosas, debe ser enfrentada por nuestros científicos, ya que podría eventualmente contribuir a la resolución de estos problemas de salud.

CONCLUSIONES

El descubrimiento y caracterización de la vía L-arginina-NO como un revolucionario sistema de comunicación celular en el organismo humano permitió que en los últimos 12 años todas las especialidades biomédicas y clínicas experimentaran un gran crecimiento con cambios y modificaciones en conceptos básicos y en conductas terapéuticas. La Cátedra Lope Carvajal-Peralta busca crear un espacio académico, donde todos los jóvenes estudiantes interesados de las Ciencias de la Salud, conjuntamente con docentes y profesionales de la ciudad y con la participación de expertos nacionales y extranjeros, profundicen en el conocimiento del tema y a partir de entonces comiencen a plantearse preguntas novedosas, relevantes y factibles que puedan traducirse en futuras líneas de investigación, creando demanda de infraestructura tecnológica y de actualización académica permanente. La amplitud de la participación del NO en todo el organismo humano, así como la simplicidad de su estructura, es un hallazgo biológico que está permitiendo el desarrollo de un modelo educativo novedoso e integrador en la Cátedra Lope Carvajal-Peralta.

SUMMARY

Various public and private institutions of the city of Bucaramanga decided to form the Corporation Colombian Institute of Biomedical Investigation (Corporación Instituto Colombiano de Investigaciones Biomédicas [ICIB]) due to the necessity of strengthening and accelerating the development of productive research groups in the biomedical area in the Department of Santander. This organizations principal mission is to create biomedical research groups. It is in this context that the Lope Carvajal-Peralta cathedra has been created. The fundamental objective of this professorship is to identify human resources that can participate in the process of the development of the biomedical area. For this reason, the recently discovered L-arginine-nitric oxide pathway and its characterization as a generalized and ubiquitous system for cellular communication offers us the possibility of uniting all the medical and biomedical specialties for its study. This pathway performs functions in the entire human economy and whose description in different systems has not been totally elucidated.

This article will try to describe in a synthesized manner some of the functions of nitric oxide (NO) in the human being and will emphasize some points which the Lope Carvajal-Peralta cathedra will investigate further, as they are considered

important lines of investigation to develop in Colombia.

Key words: nitric oxide, L-arginine, endothelium.

REFERENCIAS

- Palmer R, Ferrige A, Moncada S. Nitric Oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327:524-536.
- Furchgott R, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288:373-376.
- Palmer R, Ashton D, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333:664-666.
- Palmer R, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 158:348-352.
- López-Jaramillo P, González MC, Palmer RMJ, Moncada S. The crucial role of physiological Ca⁺⁺ concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol*. 1990; 101:489-496.
- Moncada S, Higgs EA, Hodson HF, Knowles RG, López-Jaramillo P, McCall T, Palmer RMS, Radomski MW, Rees DD, Schulz R. The L-arginine: Nitric Oxide pathway. *J Cardiovas Pharmacol*. 1991; 17(S3):S1-S9.
- Knowles R, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*. 1994; 298:249-258.
- Moncada S, Higgs E. The L-arginine nitric oxide pathway. *New Engl J Med*. 1993; 329:2002-2012.
- Brown GC, Price A, Mc Bride A & V. Nitric oxide induces apoptosis and necrosis via mitochondria. *Acta Physiol Scand*. 1999; 167(suppl:645):9
- López-Jaramillo P. Bioquímica del Endotelio Vascular: Función Endotelial y Radicales Libres. Cuarta Edición. Artes Gráficas Univale, Universidad del Valle, Santiago de Cali. 1998:93-103.
- Garthwaite J, Charles S, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*. 1988; 336:385-388.
- Radomski M, Palmer R, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1987; 92:639-646.
- Drapier JC, Hibbs JB. Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells: inhibition involves the iron-sulphur prosthetic group and is reversible. *J Clin Invest*. 1986; 78:790-797.
- Granger DL, Lehniger AL. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J Cell Biol*. 1982; 95:527-535.
- Kbuons NS, Stueck PJ, Nathan CF. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med*. 1991; 174(4):761-767.
- Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of arteriolar tone in man. *Lancet*. 1989; 2:997-1000.
- Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med*. 1992; 326:800-806.
- Radomski M, Palmer R, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:10043-10047.
- Takahashi M, Ikeda U, Majuyama J, Funayama H et al. Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine*. 1996; 8(11):817-821.
- Pabón Rodríguez A. La Mortalidad en Colombia 1953-1991. Bogotá, Colombia: Instituto Nacional de Salud. 1993.
- Forte P, Copland M, Smith LM, Mileni E, Sutherland J, Benjamin N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet*. 1997; 349:837-842.
- Drexler H, Zeiher AM. Endothelial function in human coronary arteries in vivo: Focus on hypercholesterolemia. *Hypertension* 1991; 18:1190-1199.
- López Jaramillo P, Narváez M, Félix C, Sosa C, Calle A, Nava E, Palmer RMJ, Moncada S: Decreased nitric oxide synthesis in Andean ecuadorian women with pregnancy induced hypertension. In: Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB Jr, Higgs EA, eds. *Biology of Nitric Oxide*. Portland Press. London. 376-379; 1992
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, et al. Abnormal endothelium-dependent relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990; 323:22-7
- Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992; 339:572-5.
- Ito A, Tsao P, Adimoolam S, et al. Novel mechanism for endothelial dysfunction, Dysregulation of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 1999; 99:3092-5.
- White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, et al. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Pro Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:8745-9
- Wallukat G, Homuth V, Fischer T, et al. Patients with preeclampsia developed agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest*. 1999; 103(7):945-2
- Dekker G, Sibai B, Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *Am J Obstet Gynecol*. 1998; 179:1359-75
- Levine G, Frei B, Koulouris S, et al. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1996; 93:1107-1113
- Diaz M, Frei B, Vita J, et al. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Eng J Med*. 1997; 337:406-14
- Clarkson P, Adams MR, Powe AJ. Oral L-arginine improves endothelium dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest*. 1996; 97:1989-1994
- Naurath HJ, Joosten E, Rizler R, et al. Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplementation in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet*. 1995; 346:85-89
- Abrams J. Nitrates. *Cardiology Clinics: Annual of Drug Therapy*. 1997; 1:25-40
- Mancini J, Henry G, Macaya C, et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition with Quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1996; 94:258-265.
- Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, et al. Cholesterol reduction improves endothelial function after acute coronary syndromes. *The RECIFE. Circulation*. 1999; 99:3227-33.
- Mendelsohn M, Karas R. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Eng J Med*. 1999; 340:1801-11
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:5159-5162.
- Bohme GA, Bon C, Stutzman JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol*. 1991; 199:379-381.
- Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*. 1991; 349:326-328.
- Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993; 361:31-39.
- Ladecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci*. 1993; 16:206-214.
- Gally JA, Montague PR, Reeke GN Jr, Edelman GM. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:3547-3551.
- Lopez Jaramillo P, Terán E, Molina G, et al. Oestrogens ad depression. *Lancet*. 1996; 346:135-136.
- Hurtado O, Olivenza R, Menchén L, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA. Involvement of metalloproteinases in the expression of iNOS in an *in vitro* model of brain ischaemia. *Acta Physiol Scand*. 1999; 167(suppl:645):24
- Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol*. 1992; 262:G379-G392.
- Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, et al. Oral Sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. *N Engl J Med*. 1998; 338:1397-1404
- Gust R, McCarthy TJ, Kozlowski J, Stephenson AH, and Schuster DP. Response to Inhaled Nitric Oxide in Acute Lung Injury Depends on Distribution of Pulmonary Blood Flow Prior to Its Administration. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 159:563-570.
- Ding A.H, C. F. Nathan, and D. J. Stuehr. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 1988; 141:2407-2413.
- Nathan C., and Q. *, Xie. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cells* 1994; 78:915-918.
- Stenger S H, Thuring M, Rollinghoff, and Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to Leishmania major. *J Exp Med* 1994; 180:783-793.
- De Groot MA, Fang FC. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin Infect Dis*. 1995; 21:s162-5.
- Fang FC. Mechanism of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*. 1997; 99:2818-25.
- Stamler, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 1994; 78:931-936.
- Zaragoza C, Ocampo CJ, Saura M, McMillan A, and Lowenstein CJ. Nitric oxide inhibition of coxsackie virus replication *in vitro*. *J. Clin. Invest*. 1997; 100:1760-1767.
- Moro MA, Lizasoain I, Knowles RG, Darley-Usmar V, Moncada S. Distinct effects of nitric oxide and peroxynitrite on respiration by brain submitochondrial particles. *The Biology of Nitric Oxide - Part 5*. 1996:97.
- López-Jaramillo P, Ruano C, Rivera J, Terán E, Esplugues JV, Moncada S: The use of S-nitroso-N-acetylpenicillamine, a nitric oxide donor, in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Lancet*. 1998; 351:1176-1177.
- López-Jaramillo P, Ruano C, Rivera J, Terán E, Moncada S: Treatment of cutaneous mycosis with the NO donor S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP). In: Moncada S, Stamler R.J, Gross S, Higgs EA, eds. *The Biology of Nitric Oxide Part 5. Portland Press*. London. pp. 36, 1996.