

EFECTOS FISIOPATOLOGICOS DEL OXIDO NITRICO Y SU RELACION CON EL ESTRES OXIDATIVO

PATRICIA H. CARRIZO, MARTA DUBIN, ANDRES O. M. STOPPANI

Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, CONICET, Universidad de Buenos Aires

Resumen El óxido nítrico (NO·) es producido por la oxidación de la arginina a citrulina, una reacción catalizada por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS). Se acepta que esa reacción es la única capaz de producir NO· en los sistemas biológicos, en condiciones normales o patológicas. El NO· regula diferentes funciones en células y tejidos de mamíferos, tales como: (a) el control de la presión sanguínea; (b) la relajación del tono del músculo liso arterial; (c) la agregación y adhesión plaquetaria; (d) la neurotransmisión; (e) la función neuro-endócrina. El NO· también participa en la destrucción de microorganismos patógenos y de células tumorales por leucocitos y macrófagos. La producción de anión superóxido (O_2^-) y NO· ha sido asociada al desarrollo de muchas patologías, pero recientemente se ha comprobado que la interacción de esas moléculas genera el ión peroxinitrito (ONOO⁻), lo que constituye un importante mecanismo fisiopatológico pues, como oxidante, el ONOO⁻ ataca un gran número de blancos biológicos. Por su influencia sobre la producción de ONOO⁻, el balance entre la producción de NO· y O_2^- es crítico en la etiología de procesos como hipertensión, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, infecciones virales, daño por isquemia-reperfusión y cáncer.

Abstract *Physiopathologic effects of nitric oxide and its relationship with oxidative stress.* Nitric oxide (NO·) is produced from L-arginine, as result of a reaction catalyzed by the enzyme nitric oxide synthase (NOS). The reaction is the sole source of NO· in animal tissues. NO· can control physiological processes (or systems) such as (a) blood pressure; (b) relaxation of arterial smooth muscle; (c) platelet aggregation and adhesion; (d) neurotransmission; (e) neuroendocrine secretion. NO· contributes to the killing of pathogenic microorganisms and tumoral cells by phagocytes. NO· reacts with superoxide anion thus producing peroxynitrite, a cytotoxic ion capable of destroying many biological targets. The superoxide/peroxynitrite balance determines the ONOO⁻ production and, accordingly, is essential for the development of hypertension, atherosclerosis, neurodegenerative diseases, viral infections, ischemia-reperfusion injury, and cancer.

Key words: nitric oxide, oxidative stress

Producción y acciones del NO·

El estrés oxidativo puede ser explicado como una situación derivada de un aumento en la velocidad de producción de radicales libres, o de una disminución de los sistemas antioxidantes de defensa enzimáticos o no enzimáticos, o de ambos^{1, 2}. Es por ello que una situación biológica asociada con el estrés oxidativo puede ser estimada por una condición físico-química en la cual haya un incremento en las concentraciones de especies reactivas del oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH·), radical alquilo (R·), radical peroxilo (ROO·) y oxígeno singulete (1O_2), entre otros.

Recientemente se ha encontrado el papel fisiológico de las especies reactivas del nitrógeno (RNS), a partir del hallazgo de que el óxido nítrico (NO·), radical libre estable y segundo mensajero, es producido "in vivo"³. El NO· tiene un electrón no apareado, hecho que le confiere propiedades paramagnéticas. Es sintetizado a partir de la oxidación de la arginina a citrulina⁴ (Figura 1), en una reacción catalizada por óxido nítrico sintasas (NOS), un grupo de enzimas que, según los casos, pueden ser: 1) constitutivas, reguladas por Ca^{2+} y calmodulina (cNOS) y 2) inducibles por citoquinas e independientes de Ca^{2+} (iNOS). Las cNOS están presentes en neuronas y células endoteliales, mientras que las iNOS se encuentran en macrófagos, astrocitos y células de la microglia⁵. Además, estas enzimas están presentes en el hígado⁶, músculo esquelético, granulocitos, neutrófilos peritoneales, macrófagos y células de Kupffer, entre otras^{7, 8}.

El NO· formado puede actuar dentro de la célula en la cual fue generado o difundir a las células adyacentes, regulando las funciones de diferentes células y tejidos de mamíferos sanos, entre las que se incluyen: control

Dirección postal: Dr. Andrés Stoppiani, Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina

Fax: 54-1-961-6521; E-mail: stoppani@mail.retina.ar

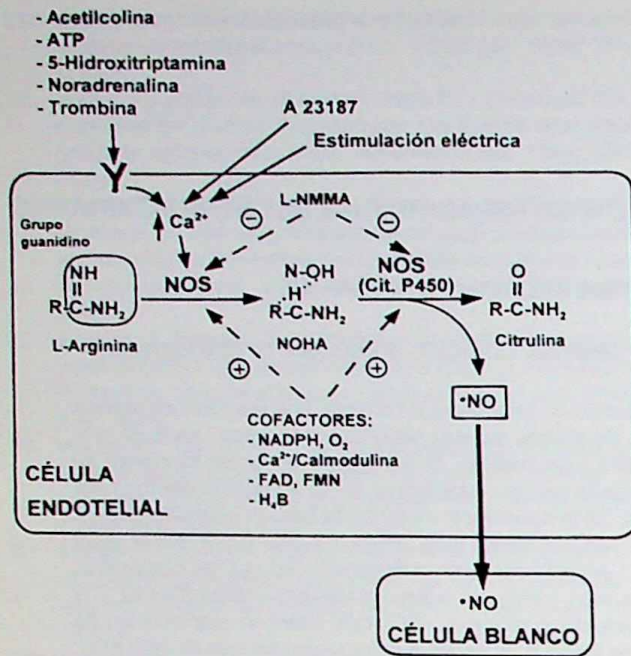


Fig. 1.- Síntesis de óxido nítrico (NO). La activación de las células endoteliales por el ionóforo A23187, estimulación eléctrica o por agonistas que interaccionan con receptores específicos, aumentan los niveles intracelulares de Ca²⁺ que llevan a la activación de la síntesis de NO. La formación de NO ocurre en dos etapas catalizadas por la óxido nítrico sintasa (NOS): la primera consiste en la N-oxigenación del grupo guanidino terminal de la L-arginina a N^ω-hidroxil-L-arginina (NOHA) y la segunda, catalizada por el citocromo P-450, consiste en la ruptura oxidativa de la unión C = N del NOHA llevando a la producción de citrulina y NO. La NOS endotelial usa como cofactores NADPH, O₂, Ca²⁺, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina (H₂B). Esta enzima es inhibida competitivamente por N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA) y otros análogos de la L-arginina (Extraído de Ref. 4).

de la presión sanguínea, relajación del músculo liso, mantenimiento del tono vascular, inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria, neurotransmisión, neuromodulación, formación de la memoria y la secreción neuroendocrina, entre otras. El NO participa, además, en procesos inflamatorios, acción citostática y citotóxica de los macrófagos, muerte de organismos patógenos y de células tumorales^{5, 9-11}.

Experimentos realizados en modelos de shock y reperusión isquémica en cerebro y corazón¹² han sugerido diferentes mecanismos de acción del NO. Se ha propuesto que la activación de la enzima guanilato-ciclasa soluble, ocurrida en presencia de NO, resulta en un aumento de los niveles de GMPc. Este aumento puede conducir al estímulo de la quinasa de las proteínas dependiente de GMPc, la fosforilación alterada de muchas proteínas endógenas, la disminución de la actividad de la enzima fosfolipasa C y la disminución del calcio

citosólico. La disminución del calcio intracelular mediada por NO es la responsable de la relajación del músculo liso vascular y no vascular, de la inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria, de la inhibición de la adhesión leucocitaria y es una señal de transducción del sistema nervioso central y periférico¹³.

La mayoría de los efectos fisiológicos y patológicos del NO están relacionados con la inhibición de la respiración celular por competencia con el oxígeno a nivel de la enzima citocromo c oxidasa mitocondrial y, en consecuencia, con la producción celular de ATP⁹. El NO inhibe la transferencia de electrones y aumenta la producción de O₂⁻ en mitocondrias de corazón de rata y partículas submitocondriales¹⁴. Se ha demostrado que, a concentraciones citosólicas de O₂, el NO participa en la regulación del metabolismo energético mitocondrial¹⁵. Los niveles de NO superiores a los requeridos para activar la enzima guanilato-ciclasa pueden inhibir la glicólisis, la cadena respiratoria mitocondrial y la replicación del ADN¹⁶⁻²⁰, a través de la interacción directa del NO con un grupo prostético férrico. Por ejemplo, el NO interacciona con el centro Fe-S de la aconitasa¹⁶ o de algunas enzimas de la cadena mitocondrial de transporte de electrones como la NADH-óxidorreductasa o succinato-óxidorreductasa, alterando el metabolismo energético y la respiración celular¹⁷. El NO también actúa sobre la ribonucleótido reductasa inhibiendo la replicación celular¹⁸. Por otro lado, el bloqueo persistente de la citocromo c oxidasa por NO puede llevar a la liberación de los iones Ca²⁺ libres desde la matriz mitocondrial hacia el citosol celular¹⁹⁻²¹. Estos efectos pueden ser directos como, por ejemplo: la inhibición de las enzimas citocromo c oxidasa¹⁷ y ribonucleótido reductasa¹⁸.

El NO reacciona muy rápidamente con los radicales libres del oxígeno. La reacción del NO con O₂⁻ genera peroxinitrito (ONOO⁻)²². Aunque ni el NO ni el O₂⁻ son potentes oxidantes, el ONOO⁻ es un oxidante muy potente que puede atacar un amplio rango de blancos biológicos²². En condiciones fisiológicas, este radical tiene una vida media de 1 seg. En consecuencia, la molécula de ONOO⁻ puede mediar varios de los efectos citotóxicos del NO como la oxidación de tioles de péptidos y proteínas, la destrucción de los centros Fe-S en las enzimas y el daño oxidativo al ADN²³, contribuyendo de esta manera al daño tisular observado en muchas enfermedades humanas. La evidencia presentada para la participación del ONOO⁻ incluye el hallazgo de altos niveles de nitrotirosina en el tejido dañado, debido a que el ONOO⁻ es capaz de llevar a la nitración de la tirosina²⁴. Teniendo en cuenta que los macrófagos sintetizan simultáneamente O₂⁻ y NO, el ONOO⁻ así formado puede ser considerado un agente bactericida producido por esas células. En la Tabla 1 se mencionan algunas de las condiciones en las cuales la formación de ONOO⁻ sería la responsable del daño tisular.

TABLA 1.— Algunas condiciones en las que participa el ONOO⁻ como causante del daño tisular

Condición
Aterosclerosis
Miositis con cuerpos de inclusión
Artritis reumatoidea
Enfermedad inflamatoria del intestino
Enfermedad neurodegenerativa
Inflamación aguda
Intoxicación por monóxido de carbono
Síndrome de distrés respiratorio en adultos
Inflamación de la piel
Gastritis (infección por <i>H. pylori</i>)
Fibrosis quística
Shock por endotoxinas
Envejecimiento del músculo esquelético
Infección viral

Por otro lado, el NO· puede combinarse con el oxígeno y formar N₂O₃. El ataque nucleofílico del N₂O₃ sobre las moléculas que contienen nitrógeno y azufre puede modificar grupos sulfhidrilos esenciales, producir la formación de compuestos carcinogénicos o la diazotación de aminas primarias. Cuando las aminas son purinas o pirimidinas, el resultado es la alteración de las bases de los ácidos nucleicos por deaminación o entrecruzamiento. Es interesante destacar que las reacciones endógenas que más comúnmente contribuyen al daño al ADN son la oxidación, metilación, depuración y deaminación. El NO·, o más probablemente las especies reactivas derivadas del mismo tales como el NO₂·, ONOO⁻, N₂O₃ y NO₂H· son agentes mutagénicos que pueden llegar a producir reacciones de nitración, nitrosoación y deaminación con las bases del ADN²⁵.

Efecto antioxidante del NO·

El NO· reacciona con los radicales orgánicos ROO· y RO· para generar peroxinitritos orgánicos mucho más estables que ONOO⁻. Un ejemplo de este proceso es la reacción del NO· con los radicales lipofílicos peroxilo (LOO·)²⁶, importantes especies propagadoras de las reacciones en cadena de peroxidación de lípidos, generando alquilperoxinitratos (LOONO·). Estas moléculas parecen ser más estables que ONOO⁻²⁰. El metabolismo de los derivados LOONO· sin la liberación de radicales libres tóxicos es potencialmente beneficioso ya que le permite al NO· frenar la peroxidación de lípidos. Es por eso que, en estos casos, la relación de NO· a ROS

es importante ya que, dependiendo de las condiciones del medio, el ONOO⁻ puede funcionar como especie oxidante o antioxidante. De esta forma, una relación O₂·-: NO· 1:1 genera ONOO⁻ e induce la peroxidación de lípidos (actividad oxidante)²³, mientras que un exceso de NO· puede inhibir la peroxidación lipídica por secuestro de radicales peroxilo, mitigando los efectos biológicos de estos radicales (actividad antioxidante)²⁰.

NO·: algunos ejemplos en relación con la fisiopatología

Algunos de los estados fisiológicos y fisiopatológicos en los cuales está comprometido el NO· se describen a continuación.

La disminución en los niveles de NO· ha sido implicada en el mecanismo de hipertensión primaria o esencial²⁷. El grado de disfunción endotelial es paralelo al grado de hipertensión. La imposibilidad de los vasos para dilatarse estaría asociada a una disminución en la liberación de NO· y no a una incapacidad de las células del músculo liso para responder al NO·.

Se ha demostrado que en la aterosclerosis hay un defecto en la relajación vascular. Uno de los mecanismos propuestos implica la participación de las ROS, ya que el O₂·- y el HO· contribuyen a la oxidación de las LDL, un evento crítico en el desarrollo de la lesión aterogénica²⁸. Tanto el O₂·- como el NO· y el producto de la reacción entre ambos, ONOO⁻, participan activamente en la iniciación y el mantenimiento del estado aterosclerótico y contribuyen a la deficiencia en la relajación vascular²⁹. Además, el ONOO⁻ puede iniciar la oxidación de lipoproteínas, lo que contribuye al engrosamiento de las venas con posterior formación de las placas características de la lesión aterosclerótica³⁰.

Debido a su capacidad de incrementar los niveles de GMPc el NO· es un potente vasodilatador. En el músculo liso cavernoso, la vasodilatación inducida por NO· resulta en la relajación del músculo y, en consecuencia, en la erección penéana. El NO· es sintetizado en las glándulas adrenal y pituitaria y en los testículos, donde el bloqueo de las NOS afecta la producción de testosterona. Por otra parte, Rosselli y col.³¹ han demostrado que el NO· disminuye la movilidad y viabilidad de los espermatocitos por varios mecanismos: a) a través de la inhibición de la síntesis de ATP; b) por reacción con el O₂·- para dar ONOO⁻, potente oxidante que gana un protón y forma HO· y NO₂·. A su vez, Weinberg y col.³² encontraron que elevadas concentraciones de GMPc (segundo mensajero en la acción del NO·) disminuyeron la motilidad de los espermatozoides.

Se ha relacionado la actividad NOS con el grado de malignidad de tumores de mama. Mientras que el NO· puede causar citostasis/citotoxicidad en las células

tumorales, también podría incrementar el flujo sanguíneo hacia el tumor y promover la angiogénesis³³.

La producción de NO· es importante en la inducción de la inmunidad inespecífica y la respuesta antimicrobiana a diferentes parásitos extracelulares. Mecanismos NO-dependientes han sido identificados en la destrucción de organismos (por ejemplo: *Trypanosoma*, *Mycobacterium*, *Schistosoma* y *Leishmania*) mediada por macrófagos³⁴⁻³⁵.

En la sepsis, endotoxinas y citoquinas inducen las NOS en el endotelio, músculo liso vascular y otras células y tejidos, lo que acentúa la vasodilatación, sobrepasa la actividad de los vasoconstrictores y lleva al daño del endotelio. Por otra parte, el NO· tiene efectos beneficiosos: a) antagoniza la acción de los vasoconstrictores generados en la sepsis; b) previene la formación de trombos y el daño mediado por los neutrófilos. Estudios realizados en pacientes con causas múltiples de sepsis (excluyendo el trauma) han mostrado niveles elevados de NO·, medidos como la relación NO₂⁻/NO₃⁻³⁶. En cambio, todos los pacientes con trauma, incluyendo el trauma séptico, tienen niveles de NO· inferiores a los controles normales, probablemente debido a la inhibición de la liberación de NO· secundaria a la hipovolemia.

En ratones se observó que el NO· presenta una acción dual sobre las hormonas reguladoras del metabolismo de la glucosa tanto "in vivo" como "in vitro"³⁷. El NO· es un modulador negativo de la secreción de insulina y un regulador positivo de la secreción de glucagón, lo cual tendría profundas implicancias en varios aspectos de la fisiopatología de la diabetes mellitus. En pacientes con diabetes mellitus no insulino-dependientes se han encontrado anomalías en la vía metabólica del NO·, las que podrían deberse a la inactivación del NO· o a la incapacidad del músculo liso vascular para responder al NO·. Esto podría contribuir a la elevada incidencia de la enfermedad vascular en estos pacientes^{37, 38}.

En los enfermos de Alzheimer se postula que un incremento en la producción vascular de NO·, mediador potencialmente neurotóxico en el sistema nervioso central, puede contribuir a la susceptibilidad de las neuronas al daño y muerte celular en esa patología³⁹.

Un caso particular: daño por isquemia y reperfusión. Su relación con el trasplante hepático

Se ha propuesto que en los tejidos con una alta velocidad metabólica como hígado, corazón, cerebro, músculo y riñón, el daño celular provocado por la isquemia y reperfusión está relacionado con la generación de radicales libres en la mitocondria durante la reperfusión. La hipótesis mitocondrial que explica el daño en los tejidos

producido por la isquemia-reperfusión propone que, durante la isquemia, se produce la pérdida del aceptor de electrones (oxígeno molecular), la inhibición de la transferencia de electrones causada por los subproductos de la isquemia y la reducción de todos los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. Cuando se restaura la oxigenación, este "estrés reductivo" promueve la formación intracelular de especies reactivas del oxígeno que pueden atacar lípidos, tioles y otros componentes celulares, culminando en daño letal. En estas condiciones, se dispara la generación de O₂⁻ catalizada por el complejo I (NADH-ubiquinona óxidorreductasa) y complejo II (ubiquinol-citocromo c óxidorreductasa), lo cual permite el aumento en la velocidad de auto-oxidación de las principales fuentes de O₂⁻ como la ubisemiquinona (UHQ·) y la flavin-semiquinona NADH deshidrogenasa (FMNH). Ambas concentraciones de semiquinona están aumentadas debido a la inhibición de la transferencia de electrones. El O₂⁻ intramitocondrial es incapaz de salir de la mitocondria y, por acción de la enzima Mn-superóxido dismutasa, dismuta a H₂O₂ que difunde a través de las membranas mitocondriales hacia el citosol. En consecuencia, el resultado del incremento en la velocidad de producción de O₂⁻ intramitocondrial será el aumento de concentración de H₂O₂ celular. El H₂O₂ puede reaccionar con el grupo hemo del citocromo c mitocondrial y del citocromo P₄₅₀ citosólico formando el radical hidroxilo (HO·) o ferrilhemoproteínas (Fe^{IV} = O) y especies oxidantes altamente reactivas capaces de iniciar las reacciones en cadena de los radicales libres como la peroxidación de lípidos (Figura 2).

La hipótesis que postula la conversión de la enzima xantina deshidrogenasa (XD) a la forma oxidasa (XO) durante la isquemia tisular, con un incremento concomitante en la velocidad de la producción de O₂⁻ durante la reperfusión sería aplicable al intestino y otros tejidos con alta actividad XD. Sin embargo, la misma hipótesis falla al explicar la injuria por reperfusión observada en corazón humano y otros tejidos en los que la actividad XD es prácticamente no detectable⁴⁰.

Trasplante hepático, inmunosupresión y producción de NO·

Desde 1963, el trasplante de hígado se ha convertido en una terapia acertada para los pacientes con fallo hepático severo. Durante la última década, los avances realizados en las técnicas quirúrgicas y de inmunosupresión han logrado que el trasplante hepático sea una herramienta clínica importante. Es necesario tener en cuenta que en el trasplante hepático el hígado se somete a isquemia fría, la cual trae aparejada la anoxia y sus consecuencias dañinas en las células del órgano a

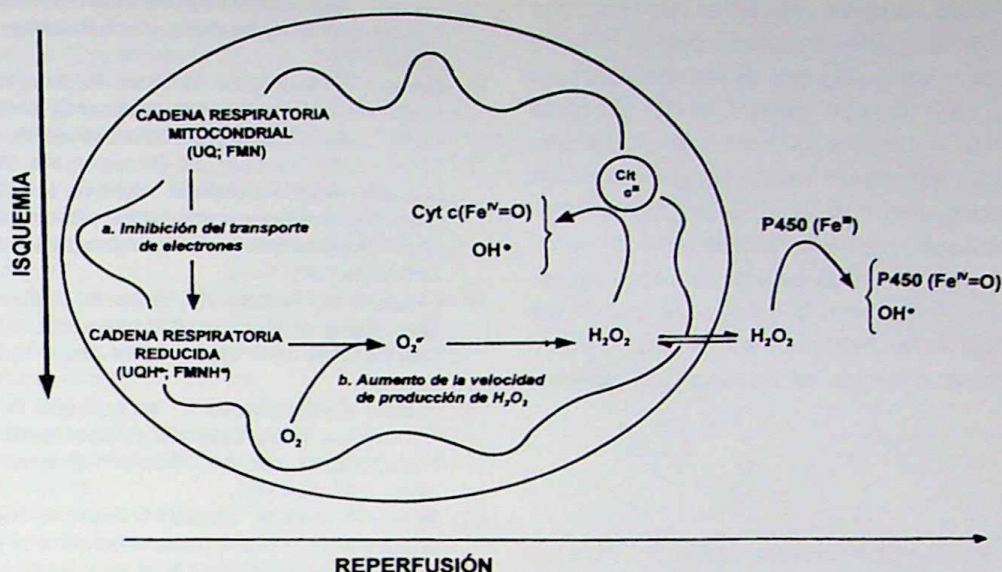


Fig. 2.- Esquema de pasos bioquímicos asociados a la isquemia o anoxia y la reperfusión en el hígado. UQ y UQH: ubiquinona oxidada y parcialmente reducida, respectivamente; *cyt c*: citocromo FMN y FMNH: NADH deshidrogenasa oxidada y parcialmente reducida, respectivamente; *c*; P_{450} : citocromo P-450 (extraído de Ref. 51).

transplantar. Uno de los mayores problemas asociados a este tratamiento es la aparición, relativamente frecuente (10% de los casos), de la pérdida de funcionalidad del órgano transplantado, con un alto grado de daño producido por preservación/reoxigenación. El origen de la falta de funcionalidad del órgano está dado por una serie de factores, entre los que se incluyen: el estado clínico del receptor, factores inmunológicos, calidad de la preservación del órgano a transplantar y duración de la isquemia⁴¹. A pesar de que se ha investigado exhaustivamente la injuria por reperfusión en corazón, intestino, hígado y riñón, no existe un amplio consenso acerca de los mecanismos clave que participan en este proceso. La mayoría de los investigadores sostiene que los radicales libres (derivados del oxígeno) formados durante la reperfusión son los elementos importantes en este tipo de daño⁴². Esos radicales están involucrados en la peroxidación de lípidos⁴³, oxidación de proteínas, entrecruzamiento de cadenas proteicas y como señales para otros procesos dañinos como la quimiotaxis de los neutrófilos y el bloqueo microvascular⁴⁴.

Se han realizado varios estudios para establecer el papel del NO^{\cdot} en la respuesta inmunológica al trasplante. En modelos animales, Langrehr y col.⁴⁵ demostraron que la síntesis de NO^{\cdot} aumenta en la respuesta aloinmune. La participación del NO^{\cdot} en los procesos relacionados con el rechazo se evidenció estudiando, en plasma, la cinética de la producción de nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), productos finales del metabolismo del NO^{\cdot} en la sangre, después del trasplante. Experimentos realizados con ratas que recibieron hígado ortotópico, co-

razón heterotópico o intestino delgado ortotópico dieron como resultado niveles elevados de NO_2^- y NO_3^- durante el rechazo del órgano transplantado⁴⁵. En el hombre, Ioannidis y col.⁴⁶ encontraron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de nitratos durante los primeros diez días posteriores al trasplante. Este incremento fue aún mayor en presencia de complicaciones clínicas como rechazo, infección⁴⁵ y/o fallo renal⁴⁷.

Los niveles de nitratos en plasma dependen de la efectividad del tratamiento inmunosupresor del organismo receptor. Cuanto más agresiva sea la inmunosupresión, mayor será la disminución en la producción de NO^{\cdot} . Hasta el presente no está claro cuáles son las células responsables de la síntesis de NO^{\cdot} posterior al trasplante ortotópico de hígado en humanos. Los altos niveles de nitratos hallados no pueden ser atribuidos a un aumento en la producción de NO^{\cdot} en las células mononucleares o en los granulocitos. En estudios realizados con animales, se ha demostrado claramente la liberación de NO^{\cdot} por las células de Kupffer. En ratas, se ha observado que el número de células de Kupffer aumenta después del trasplante ortotópico de hígado⁴⁸. En consecuencia, en los seres humanos, los macrófagos tisulares constituyen una fuente posible para la elevada producción de NO^{\cdot} observada después del trasplante de hígado. Es por ello que la determinación de los niveles de nitrato sería apropiada para controlar diariamente el seguimiento clínico de los pacientes sometidos a trasplante ortotópico de hígado y así poder detectar el rechazo o una infección asociada.

Estos son sólo algunos ejemplos de estados fisiopatológicos en los cuales está implicado el NO·. Es importante destacar que en algunos de los ejemplos aquí mencionados y, para otros en general, el NO· presenta efectos beneficiosos y tóxicos asociados en una misma patología. El lector interesado en ampliar la información puede recurrir a las revisiones^{3, 49, 50}. Si bien la participación del NO· se sugiere en un gran espectro de ejemplos clínicos (no mencionados aquí por razones de espacio), está aún en discusión la verdadera función del NO· en cada una de las diferentes patologías, dejando abierto un interesante campo de investigación básica y clínica.

Bibliografía

1. Sies H. In: Sies H, editor. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. London, San Diego: Academic Press; 1991. p. XV-XXII.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease. Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-620.
3. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 1995; 369: 131-5.
4. Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Autom Pharmacol* 1995; 15: 279-307.
5. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 83-106.
6. Spitzer JA. Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and nonparenchymal cells of endotoxemic rats. *Hepatology* 1994; 19: 217-28.
7. Wang JF, Komarov P, de Groot H. Luminol chemiluminescence in rat macrophages and granulocytes: the role of NO·, O₂-H₂O₂ and HOCl. *Arch Biochem Biophys* 1993; 304: 189-96.
8. Gatto EM, Carreras MC, Poderoso JJ. Oxido nítrico, sistema nervioso y enfermedad de Parkinson. *Medicina* 1994; 54: 608-9.
9. Brown GC. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 1995; 369: 136-9.
10. Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 1994; 350: 9-12.
11. Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, Nims RW. Inhibition of cytochromes P₄₅₀ by nitric oxide and nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 115-23.
12. Moncada S, Higgs H. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
13. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3030-34.
14. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328: 85-92.
15. Takehara Y, Kanno T, Yoshioka T, Inoue M, Utsumi K. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial energy metabolism by nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1995; 323: 27-32.
16. Castro L, Rodríguez M, Radi R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 29409-15.
17. Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AHV. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 1994; 345: 50-4.
18. Lepoivre M, Flaman JM, Bobe P, Lemaire G, Henry Y. Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 21891-7.
19. Richter C, Gogvadze V, Schlapbach R, Schweizer M, Schlegel J. Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1143-60.
20. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S *et al*. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1994; 269: 26066-75.
21. Packer MA, Murphy MP. Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by cyclosporin A. *FEBS Lett* 1994; 345: 237-40.
22. Pryor WA, Squaduto GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995; 268: L699-L722.
23. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 481-7.
24. Halliwell B. Hypothesis: What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation *in vivo*? *FEBS Lett* 1997; 411: 157-60.
25. Routledge MN, Wink D, Keeler LK, Dipple A. DNA sequence changes induced by two nitric oxide donor drugs in the *supF* assay. *Chem Res Toxicol* 1994; 7: 628-32.
26. Padmaja S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 539-44.
27. Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 1992; 266: 68-77.
28. White RC, Brock TA, Chang L-Y, Crapo J, Briscole P, Ku D, *et al*. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994; 91: 1044-8.
29. Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, *et al*. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1994; 375: 81-8.
30. Hellstrom WJG, Bell M, Wang R, Sikka SC. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. *Fert Steril* 1994; 61: 1117-22.
31. Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Human Reprod* 1995; 10: 1786-90.
32. Weinberg JB, Doty E, Bonaventura J, Haney AF. Nitric oxide inhibition of human sperm motility. *Fertil Steril* 1995; 64: 408-13.
33. Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer* 1995; 72: 41-4.
34. Ioannidis I, de Groot H. Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: evidence for co-operative action with hydrogen peroxide. *Biochem J* 1993; 296: 341-5.
35. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M.

- Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1992; 22: 301-7.
36. Palmer RMJ. The discovery of NO in the vessel wall. A unifying concept in the pathogenesis of sepsis. *Arch Surg* 1993; 128: 396-401.
 37. Panagiotidis G, Åkesson B, Alm P, Lundsquist I. The nitric oxide system in the endocrine pancreas induces differential effects on the secretion of insulin and glucagon. *Endocrine* 1994; 2: 787-92.
 38. Williams SB, Cuscon JA, Roddy M-A, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 567-74.
 39. Dorheim M, Ross Tracey W, Pollock J, Grammas P. Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 659-65.
 40. Brass CA, Narciso J, Gollan JL. Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver. *J Clin Invest* 1991; 87: 424-31.
 41. Lefevre V, Goffin I, Buc-Calderon P. Fructose metabolism and cell survival in freshly isolated rat hepatocytes incubated under hypoxic conditions: proposals for potential clinical use. *Hepatology* 1994; 20: 1567-76.
 42. Wiezorek JS, Brown DH, Kupperman DE, Brass CA. Rapid conversion to high xanthine oxidase activity in viable Kupffer cells during hypoxia. *J Clin Invest* 1994; 94: 2224-30.
 43. Takayama F, Egashira T, Kudo Y, Yamanaka Y. Effects of anti-free radical interventions on phosphatidylcholine hydroperoxide in plasma after ischemia-reperfusion in the liver of rats. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 1749-57.
 44. Chun K, Zhang J, Biewer J, Ferguson D, Clemens MG. Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers. *Shock* 1994; 1: 3-9
 45. Langrehr JM, Hoffman RA, Lancaster JR, Simmons RL. Nitric oxide - a new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 1993; 55: 1205-12.
 46. Ioannidis I, Hellinger A, Dehmlow C, Rauen U, Erhard J, Eigler FW, et al. Evidence for increased nitric oxide production after liver transplantation in humans. *Transplantation* 1995; 59: 1293-97.
 47. Hibbs JB, Westenfelder C, Taintor R, et al. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 1992; 89: 867-93.
 48. Teramoto K, Kaneda K, Seu P, Busuttill RW, Wake K, Kamada N. Ultrastructural and immunohistologic study of Kupffer cells in orthotopic transplanted rat liver. *Transplant Proc* 1991; 23: 126-30.
 49. Proceedings of the 2nd International Meeting on the Biology of Nitric Oxide, London. In: Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB Jr., Higgs EA, Editors. The Biology of Nitric Oxide. 1. Physiological and Clinical Aspects. London: Portland Press, 1992.
 50. Proceedings of the 3rd International Meeting on the Biology of Nitric Oxide, Cologne, Germany. In: Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB Jr., Higgs EA, Editors. The Biology of Nitric Oxide. 3. Physiological and Clinical Aspects. London: Portland Press, 1993.
 51. González Flecha B, Cutrín JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993; 91: 456-64.

Maintenant qu'on a commencé à étudier sérieusement la nature, on se met à réaliser l'ampleur des questions. A mesurer la distance à parcourir pour tenter d'y répondre. Le grand danger pour l'humanité, ce n'est pas le développement de la connaissance. C'est l'ignorance.

Ahora que hemos comenzado a estudiar seriamente la naturaleza, no podemos menos que percibir la amplitud de los problemas y medir la distancia que hay que recorrer para intentar darles respuesta. El gran peligro de la humanidad no es el desarrollo del saber. Es la ignorancia.

François Jacob

La souris, la mouche et l'homme. Paris: Editions Odile Jacob, 1997, p 237
(trad. *El ratón, la mosca y el hombre.* Barcelona: Crítica, 1998, p 195)