

VI. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR E INSUFICIENCIA RENAL

Estrés oxidativo vascular y disfunción endotelial

G. Zalba, A. González*, J. Beaumont, G. San José, U. Moreno, B. López, S. Ravassa, P. Muñiz, A. Fortuño, M. A. Fortuño y J. Díez

Unidad de Fisiopatología Vascular, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, Pamplona.

*Unidad de Fisiopatología Vascular y becaria del FIS: BEFI 00/9296.

Cada vez existen más indicios que sugieren que numerosas condiciones patológicas se asocian con una mayor producción vascular de especies reactivas del oxígeno. Esta forma de estrés oxidativo vascular y particularmente las interacciones entre el óxido nítrico o monóxido de nitrógeno (NO) y los radicales derivados del oxígeno representan un mecanismo patológico común, presente en muchos de los llamados factores de riesgo de la aterosclerosis. Además, las especies reactivas del oxígeno parecen participar en importantes mecanismos de señalización intracelular responsables de muchas de las características de la formación de la lesión vascular. El propósito de esta revisión es examinar los mecanismos por los cuales las células vasculares producen excesivas cantidades de especies reactivas del oxígeno (y en particular anión superóxido, O_2^-), considerar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a sus reacciones con el NO, y discutir los efectos de las especies reactivas del oxígeno sobre las enfermedades vasculares caracterizables por presentar disfunción endotelial.

ESTRÉS VASCULAR OXIDATIVO

El término estrés oxidativo se usa a menudo para referirse a condiciones en las que las células están expuestas a niveles excesivos bien sea de oxígeno molecular o de derivados químicos del oxígeno llamados especies reactivas del oxígeno. En el proceso normal del metabolismo celular, el oxígeno sufre una serie de reducciones univalentes, que llevan secuencialmente a la producción de O_2^- , peróxido de hidrógeno

(H_2O_2), y H_2O . Otros oxidantes que tienen importancia en la biología vascular son el ácido hipocloroso (HOCl), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el peroxinitrito ($OONO^\cdot$), los aldehídos reactivos, los peróxidos lipídicos, los radicales lipídicos, y los óxidos de nitrógeno. Algunos de estos, tales como el O_2^- , el OH^\cdot , y el NO son radicales con un electrón desapareado en su último orbital. Otros oxidantes como el H_2O_2 o el $OONO^-$ aunque no son radicales son biológicamente activos.

En las células de mamíferos, las fuentes enzimáticas potenciales de especies reactivas del oxígeno incluyen la cadena transportadora de electrones mitocondrial, la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la sintasa de NO, hemo oxigenasas, peroxidasas, hemoproteínas tales como la hemo y la hematina, y las NADH oxidasas. Una de las fuentes mejor caracterizada de especies reactivas del oxígeno es la NADH oxidasa fagocítica. Este sistema enzimático produce grandes cantidades citotóxicas de radicales cuando se activan las células fagocíticas. En los últimos años se ha descrito que una de las principales fuentes de especies reactivas del oxígeno en los casos sanguíneos es una NADH/NADPH oxidasa asociada a membrana expresada por las células endoteliales, las células de músculo liso vascular, y los fibroblastos, que presenta algunas similitudes con la oxidasa fagocítica (comentado más adelante).

Los términos «estrés oxidativo» y «estado redox» se usan a menudo indistintamente, sin prestar atención a su significado real. A diferencia del estrés oxidativo, definido anteriormente, el estado redox o potencial redox de una célula se refiere al ambiente químico dentro la célula en lo que concierne al número de equivalentes reductores disponibles. Esto se puede estimar examinando los cocientes entre los llamados «pares redox». Estos incluyen al lactato/piruvato, al NADH/NAD⁺, y al cociente entre el glutatión reducido y el oxidado. La exposición de las

Correspondencia: Dr. Javier Díez
Unidad de Fisiopatología Vascular
Irunlarrea, s/n
Edificio Departamental
31008 Pamplona
E-mail: jadimar@unav.es

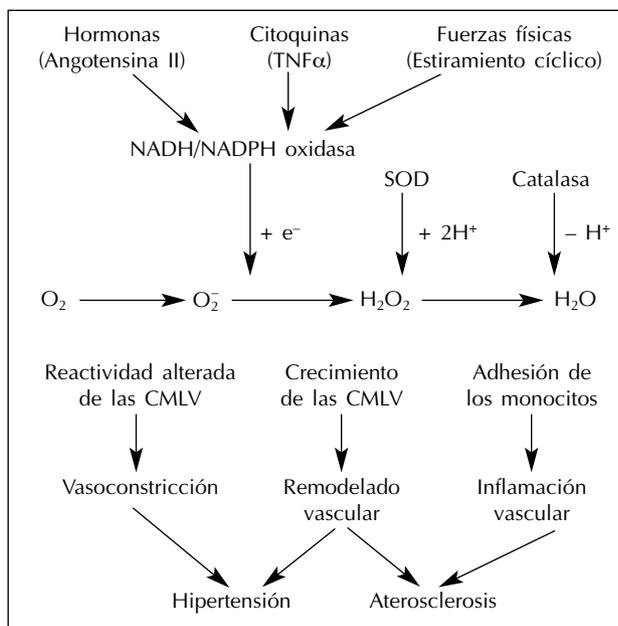


Fig. 1.—Formación y acciones potenciales del anión superóxido (O_2^-) en la pared vascular. SOD, superóxido dismutasa; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; CMLV, células de músculo liso vascular.

células a condiciones oxidantes puede consumir equivalentes reductores y de este modo alterar el estado redox; no obstante el estado redox se puede alterar de otras formas. Por ejemplo, el tratamiento de células con lactato puede aumentar los niveles de NADH, mediante la conversión de NAD^+ en NADH vía la acción de la lactato deshidrogenasa. La exposición a elevadas concentraciones de piruvato puede conseguir el efecto contrario. Asimismo, el estado redox también puede ser alterado por el estrés oxidativo; no obstante un estado redox alterado no tiene por qué cambiar necesariamente el ambiente oxidativo.

Se piensa que en la pared vascular, el aumento de estrés oxidativo, principalmente por generación excesiva de O_2^- , altera diversas funciones fisiológicas importantes (fig. 1). La regulación del flujo sanguíneo, la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición de la adhesión leucocitaria, y el control del crecimiento celular están influenciados por el estrés oxidativo. Estos fenómenos modulan en última instancia el diámetro de los vasos, el remodelado y la formación de las lesiones^{1,2}. Las especies reactivas del oxígeno que parecen tener relevancia en la biología vascular incluyen el O_2^- , el OH^- , el $OONO^-$, los hidroperóxidos lipídicos, los radicales hidroperóxidos y probablemente los radicales tipo hidroxilo. Tanto el H_2O_2 como el $OONO^-$ se generan como

productos de reacción del O_2^- . Mientras que el H_2O_2 emerge principalmente de la dismutación intra- y extracelular del O_2^- por las abundantes superóxido dismutasas, el $OONO^-$ se forma por la reacción rápida del O_2^- con el NO (véase más adelante). Es por eso que, muy probablemente la generación de O_2^- juegue un papel fundamental como fuente de otras muchas especies reactivas del oxígeno.

FUENTES ENZIMÁTICAS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LOS TEJIDOS VASCULARES

Aunque hay una miríada de enzimas y de sistemas enzimáticos que potencialmente podrían producir especies reactivas del oxígeno en las células vasculares, tres han sido extensamente estudiadas en los últimos años. Estas comprenden la NADH/NADPH oxidasa, la xantina óxido-reductasa, y la sintasa de NO (NOS), y se comentarán separadamente más adelante.

NADH/NADPH oxidasa. La principal fuente de especies reactivas del oxígeno en la adventicia vascular y tanto en células endoteliales como de músculo liso vascular son oxidasas unidas a membrana que emplean NADH y NADPH como sustratos³⁻⁵. La estructura de estos sistemas enzimáticos todavía tiene que ser claramente dilucidada. Las NADH/NADPH oxidasas vasculares muestran ciertas similitudes, pero también notables diferencias con la NADPH oxidasa de neutrófilos. Las enzimas vasculares tienen una menor tasa y no muestran el clásico «estallido» de actividad propio de la enzima de neutrófilos. Estas enzimas prefieren predominantemente NADH como sustrato⁶. Las NADH/NADPH oxidasas de células endoteliales y células de músculo liso vasculares probablemente tampoco son todas iguales. En las células endoteliales se han encontrado todos los componentes de la enzima NADPH oxidasa funcional⁷. Por el contrario, en las células de músculo liso sólo se ha podido identificar p22phox y se ha probado su participación en la producción aumentada de O_2^- tras estimulación con angiotensina II y TNFα^{3,8,9}.

Es interesante señalar que, al parecer la actividad de estas oxidasas está regulada por citoquinas, fuerzas físicas, y hormonas tisulares que están muy involucradas en la patogénesis de las enfermedades vasculares relacionadas con el estrés oxidativo (fig. 1). La exposición de células de músculo liso vascular en cultivo a angiotensina II y TNFα aumentó la actividad de las NADH/NADPH oxidasas y se observó la formación subsecuente de especies reactivas del oxígeno^{3,4}. De acuerdo con esto, el tratamiento de ratas con angiotensina II aumentó la producción

vascular de O_2^- independientemente de la hipertensión concomitante, como evidencian experimentos paralelos que empleaban infusiones continuadas de noradrenalina¹⁰. La generación de O_2^- inducida por angiotensina II era dependiente de NADH/NADPH y lo más probable es que ocurriese en el músculo liso¹¹. También se ha probado que el estiramiento cíclico aumenta la producción tanto de O_2^- como de H_2O_2 por parte de las células endoteliales y de las células de músculo liso vascular¹²⁻¹⁴.

Xantina oxido-reductasa. La xantina óxido-reductasa es una molibdoenzima capaz de catalizar la oxidación de la hipoxantina y la xantina en el proceso del metabolismo de las purinas. Existen dos formas interconvertibles de la xantina óxido-reductasa, la xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa. La primera reduce NAD^+ , mientras que la última prefiere oxígeno molecular llevando a la producción tanto de O_2^- como de H_2O_2 ¹⁵. Se ha demostrado que los estadios tempranos de colesterolemia se asocian con una producción aumentada de O_2^- derivada de la xantina oxidasa endotelial^{16,17}. Tanto la inhibición de la xantina oxidasa con oxipurinol como su desplazamiento del lugar de unión de la heparina mediante infusión de heparina mejoró el deterioro en la relajación vascular dependiente de endotelio. Recientemente, se ha probado que la xantina oxido-reductasa se localiza asimétricamente en la superficie externa de células endoteliales humanas en cultivo¹⁸. El papel de la xantina oxidasa en la producción vascular de especies reactivas del oxígeno no está todavía bien definido, en parte debido a que en la forma oxidasa, la enzima no se inhibe con oxipurinol y puede emplear NADH como sustrato para la reducción de oxígeno¹⁵, y de este modo puede enmascarse como una NADH oxidasa, similar al sistema enzimático descrito anteriormente. Los métodos para separar la función de los dos sistemas enzimáticos no están todavía universalmente disponibles.

NOS endotelial. Otra fuente potencial de producción de O_2^- vascular es la isoforma endotelial de la NOS (eNOS). Estudios anteriores con NOS neuronal demostraron que este tipo de enzima es capaz de producir especies reactivas del oxígeno si la L-arginina o la tetrahydrobiopterina están ausentes^{19,20}. Es interesante el hecho de que, también se ha observado que el co-factor de la NOS tetrahydro biopterina es capaz de generar O_2^- de forma no enzimática, y que esto limita la capacidad de la NOS para producir NO libre en ausencia de la superóxido dismutasa²¹. Recientemente, estos estudios se han extendido a la eNOS. Xia y cols., han demostrado que en ausencia de tetrahydrobiopterina, la eNos puede generar O_2^- , probablemente vía su centro hemo. En este estudio, la producción de O_2^- por parte de la eNOS no se vio afectada por la L-

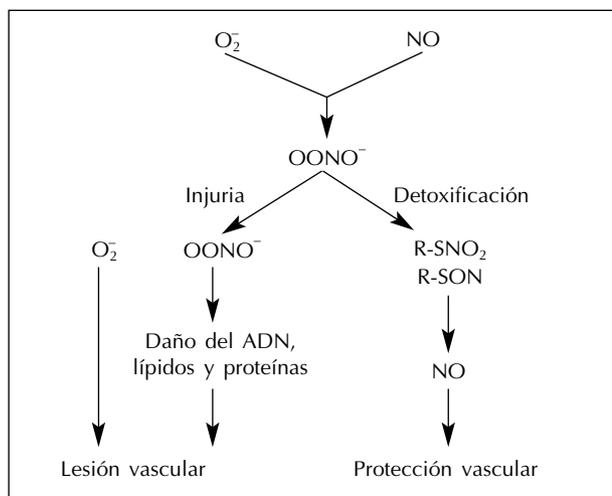


Fig. 2.—Formación y acciones potenciales del peroxinitrito ($OONO^-$) en la pared vascular. O_2^- , anión superóxido; NO, óxido nítrico; R-SNO₂, nitrosotiol.

arginina²². Vasquez-Vivar y cols., han observado que la eNOS puede producir cantidades considerables de O_2^- mediante dos mecanismos distintos²³. En ausencia de co-factores suficientes, el dominio oxigenasa de la eNOS es capaz de generar O_2^- a partir de la disociación del complejo hemo ferroso-dioxígeno. Estos investigadores también han demostrado que las flavinas del dominio reductasa de la eNOS pueden producir O_2^- . Mientras que la generación de O_2^- por parte de la eNOS puede ser demostrada en preparaciones bioquímicas *in vitro*, no está tan claro que las enzimas NOS estén alguna vez tan desprovistas de sus co-factores *in vivo* como para poder servir como fuente de O_2^- . Pritchard y sus cols. han constatado que el tratamiento de células endoteliales en cultivo con lipoproteína de baja densidad (LDL) nativa, puede aumentar su producción de O_2^- en una forma que parece ser dependiente de eNOS, quizá debida a la disociación de la L-arginina de la eNOS²⁴. El mecanismo mediante el cual las LDL podrían afectar de esta manera a la función de la eNOS no ha sido definido, sin embargo, un mecanismo tal podría tener consecuencias patológicas sustanciales.

REACCIONES DEL O_2^- CON EL NO EN LA PARED VASCULAR

Tanto el O_2^- como el NO son radicales altamente reactivos e inestables. Por lo tanto, no es sorprendente que reaccionen muy rápido a un ritmo estimado de $6,7 \times 10^9 \text{ mol s}^{-1}$ para formar como producto principal $OONO^-$ (fig. 2)²⁵. Esta reacción es

aproximadamente tres veces más rápida que la dismutación de O_2^- por la superóxido dismutasa, esto implica que posiblemente la generación aumentada de O_2^- en la pared vascular inhiba las funciones fisiológicas del NO. Además el $OONO^-$ es un oxidante fuerte y es más estable que el NO o el O_2^- ²⁶. A pH neutro, el $OONO^-$ puede protonarse para formar ácido peroxinitroso que por ruptura homolítica puede producir radicales tipo hidroxilo y dióxido de nitrógeno que también son oxidantes fuertes^{27,28}.

Aunque el $OONO^-$ puede producir vasodilatación, este efecto ocurre a concentraciones mucho mayores que las concentraciones vasorrelajantes efectivas del NO²⁹⁻³². Las reacciones de oxidación inducidas por el $OONO^-$ tales como la modificación de grupos hierro-sulfuro, dedos de zinc, proteínas con grupos tioles, y lípidos de membrana probablemente estén implicadas en numerosos procesos fisiopatológicos^{22,27,33}. Los efectos probablemente relacionados con las enfermedades vasculares están ilustrados en la figura 2.

Además de su exagerada producción a partir de NO y O_2^- , el excesivo $OONO^-$ también puede provenir de una metabolización deficiente de este compuesto por los agentes «detoxificantes» presentes en el ambiente vascular. Hasta ahora se han descrito dos vías de metabolización del $OONO^-$: una implicando la generación de componentes nitrosotioles³⁴ y la otra incluyendo un mecanismo tiol-independiente que todavía no ha sido identificado³⁵.

IMPORTANCIA FISIOPATOLÓGICA

Poco después del descubrimiento del EDRF (factor relajante derivado de endotelio) se hizo aparente que algunas enfermedades se asocian con un deterioro de la vasorrelajación dependiente de endotelio. En conejos y monos hipercolesterolémicos, la vasorrelajación mediada por acetilcolina es casi nula o ha cambiado a vasoconstricción^{36,37}. Se han hecho observaciones similares en pacientes con enfermedad arterial coronaria^{38,39} o con factores de riesgo que predisponen a la aterosclerosis⁴⁰. Del mismo modo, la vasorrelajación dependiente de endotelio es anormal en enfermedades tales como la insuficiencia cardíaca, la diabetes y la hipertensión⁴¹. En la mayoría de estos desórdenes, hay una pérdida de producción endotelial y/o biodisponibilidad de NO. Esta alteración de la función vascular se ha denominado en la literatura científica disfunción endotelial. Aunque este término es ampliamente empleado, es bastante impreciso. La disfunción endotelial puede referirse al deterioro de otras funciones endoteliales importantes distintas a la va-

sodilatación, incluyendo las propiedades anticoagulantes y anti-inflamatorias del endotelio^{2,42}. Con todo, el término disfunción endotelial ha llegado a ser ampliamente utilizado, y de hecho, la pérdida de NO en estas condiciones puede contribuir a alteraciones en otros aspectos de la función vascular. Es casi seguro que los mecanismos que subyacen a la alteración de la relajación vascular dependiente de endotelio en diversas enfermedades son multifactoriales, y parecen depender de la condición patológica específica, de su duración, y del lecho vascular que se estudie. El tratamiento con L-arginina o con tetrahidrobiopterina ha mejorado la vasodilatación mediada por NO en algunos casos, lo que sugiere que puede existir una deficiencia bien del sustrato de la enzima eNOS o bien de uno de sus co-factores críticos.

Las alteraciones en la señalización celular endotelial pueden deteriorar la activación apropiada de la eNOS en respuesta a estímulos neurohumorales o mecánicos. En aterosclerosis muy avanzadas, la expresión de eNOS en el endotelio decae, casi seguro disminuyendo la relajación vascular dependiente de endotelio. Por último, existen claras evidencias de que en algunas enfermedades, la producción de NO no está alterada, pero su biodisponibilidad está reducida debido a la inactivación oxidativa por la producción excesiva de O_2^- en la pared vascular⁴³. Se han encontrado evidencias de este fenómeno en condiciones tan diversas como la hipercolesterolemia, la hipertensión, el tabaquismo, la aterosclerosis, la diabetes y la insuficiencia cardíaca⁴⁴. Es más, algunas de las alteraciones vasculares presentes en estas condiciones se pueden atribuir a los efectos perjudiciales de un exceso de $OONO^-$ ⁴⁵.

RESUMEN Y PERSPECTIVAS

Cada vez hay más datos provenientes de experimentos animales e investigaciones clínicas que indican que una serie de enfermedades cardiovasculares se asocian con una producción aumentada de O_2^- vascular, deteriorando las importantes funciones del NO de producción endotelial y potenciando la disponibilidad del dañino $OONO^-$. Los mecanismos mediante los cuales las células vasculares producen un exceso de O_2^- están saliendo a la luz ahora, y probablemente serán un objetivo para futuras terapias. Por ejemplo, datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que la administración crónica del antagonista del receptor de la angiotensina II tipo 1 (AT₁) irbesartan a ratas con hipertensión espontánea corrige la producción aumentada de O_2^- dependiente de las NADH/NADPH oxidasas en la pared vascu-

lar⁴⁶. Además, este efecto se asoció con la restauración de la función endotelial normal en los animales tratados. Se requieren estudios posteriores para investigar si el bloqueo de los receptores AT₁ también corregirá la disfunción endotelial vía la supresión del estrés oxidativo en los pacientes hipertensos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander RW: Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: A new perspective. *Hypertension* 25: 155-161, 1995.
- Harrison DG: Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100 (9): 2153-2157, 1997.
- DeKeulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK: Tumor necrosis factor- α activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 329: 653-657, 1998.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 1141-1148, 1994.
- Wang HD, Pagano PJ, Du Y y cols.: Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res* 82 (7): 810-818, 1998.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M: Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med* 132: 9-15, 1998.
- Jones SA, O'Donnell BV, Wood JD y cols.: Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 271: H1626-H1634, 1996.
- Fukui T, Lassegue B, Kai H: cDNA cloning and mRNA expression of cytochrome b558 α -subunit in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Acta* 1231: 215-219, 1995.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271: 23317-23321, 1996.
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T y cols.: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97: 1916-1923, 1996.
- Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S y cols.: p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 80 (1): 45-51, 1997.
- Hishikawa K, Lüscher TF: Pulsatile stress stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation* 96: 3610-3616, 1997.
- Hishikawa K, Oemar BS, Yang Z, Lüscher TF: Pulsatile stress stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle. *Circ Res* 81: 797-803, 1997.
- Howard AB, Alexander RW, Griendling KK, Nerem RM, Taylor RW: Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. *Am J Physiol* 272 (2 Pt 1): C421-C427, 1997.
- Sanders SA, Eienthal R, Harrison R: NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase. Generation of superoxide anion. *Eur J Biochem* 245: 541-548, 1997.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91: 2546-2551, 1993.
- White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR y cols.: Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8745-8749, 1996.
- Rouquette M, Page S, Bryant R y cols.: Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Lett* 426: 397-401, 1998.
- Heinzel B, John M, Klatt P, Böhme E, Mayer B: Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 281: 627-630, 1992.
- Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM: Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267: 24173-24176, 1992.
- Hobbs AJ, Fukuto JM, Ignarro LJ: Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10992-10996, 1994.
- Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL: Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6770-6774, 1996.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P y cols.: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (16): 9220-9225, 1998.
- Pritchard Jr KA, Groszek L, Smalley DM y cols.: Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 77: 510-518, 1995.
- Goldstein S, Czapski G: The reaction of NO⁻ with O₂ and HO₂⁻: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* 19: 505-510, 1995.
- Beckman JS, Crow JP: Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans* 21: 330-334, 1993.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624, 1990.
- Yang G, Candy TEG, Boaro M y cols.: Free radicals yield from the homolysis of peroxynitrous acid. *Free Radic Biol Med* 12: 327-330, 1992.
- Liu S, Beckman JS, Ku DD: Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1114-1121, 1994.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288: 841-847, 1991.
- Tarpey MM, Beckman JS, Ischiropoulos H, Gore JZ, Brock TA: Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. *FEBS Lett* 364: 314-318, 1995.
- Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S: Peroxynitrite induces both vasodilation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12383-12387, 1994.
- White CR, Brock TA, Chang LY y cols.: Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1044-1048, 1994.
- Mayer B, Schrammel A, Klatt P, Koesling D, Schmidt K: Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation. *J Biol Chem* 270: 17355-17360, 1995.
- Graves JE, Lewis SJ, Kooy NW: Peroxynitrite-mediated vasorelaxation: evidence against the formation of circulating S-nitrosothiols. *Am J Physiol* 274: H1001-H1008, 1998.

36. Freiman PC, Mitchell GG, Heistad DD, Armstrong ML, Harrison DG: Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ Res* 58: 783-789, 1986.
37. Jayakody TL, Senaratne MPJ, Thompson ABR, Kappagoda CT: Cholesterol feeding impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 1206-1209, 1985.
38. Golino P, Piscione F, Willerson JT y cols.: Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med* 324: 641-648, 1991.
39. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL y cols.: Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerosis coronary arteries. *N Engl J Med* 315: 1046-1051, 1986.
40. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H: Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest* 92: 652-662, 1993.
41. Moncada S, Higgs A: Mechanisms of disease: the L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993.
42. Busse R, Fleming I: Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 33: 181-194, 1996.
43. Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Díez J: Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* 56 (1): 57-64, 2000.
44. Kojda G, Harrison DG: Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43: 562-571, 1999.
45. Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J: The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovasc Res* 44: 47-59, 1999.
46. Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Díez J: Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35: 1055-1061, 2000.

N O T I C I A S	
E F R O L O G I A	<p>FRANCISCO MADUPELL CANALS PREMIO TOYP 2000 EN INNOVACIÓN MÉDICA</p> <p>Francisco Maduell Canals, Nefrólogo del Hospital General de Castellón, ha sido elegido uno de los diez jóvenes excelentes del mundo y ha recibido el prestigioso premio TOYP («The Outstanding Young Persons») que otorga The Junior Chamber International. Ha sido galardonado en la categoría de Innovación Médica.</p> <p>El programa se instituyó inicialmente, en el año 1938, en los EE.UU. por The United States Junior Chamber y desde entonces han sido TOYP's personajes tan famosos como Orson Welles, Howard Hugues, Nelson Rockefeller, John F. Kennedy, Henry Kissinger, Gerald Ford y más recientemente Bill Clinton. La Junior Chamber International instituyó los premios a nivel mundial en el 1982 con la participación de más de 120 países. El premio otorgado a Francisco Maduell representa el primero y único que ha conseguido un ciudadano español.</p>