



Papel del anión superóxido en la fisiopatología de las enfermedades vasculares

G. Zalba*, G. San José*, M. U. Moreno* y J. Díez**

*División de Fisiopatología Cardiovascular. Facultad de Medicina. **Departamento de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona.

ASPECTOS BIOQUÍMICOS

El término estrés oxidativo hace referencia 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. Estas moléculas se producen en la totalidad de las células de los mamíferos, siendo diversas las fuentes intracelulares (tabla I). Las especies reactivas del oxígeno que parecen tener relevancia en la biología vascular incluyen el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peroxinitrito ($OONO^-$) y los hidroperóxidos lipídicos¹. Mientras que el H_2O_2 emerge principalmente de la dismutación intra- y extracelular del O_2^- por la superóxido dismutasa, el $OONO^-$ se forma por la reacción rápida del O_2^- con el óxido nítrico (NO) en el espacio extracelular. Por ello, la disponibilidad de O_2^- juega un papel fundamental en la fisiopatología del estrés oxidativo vascular¹.

En las células vasculares, las fuentes potenciales de O_2^- incluyen la cadena transportadora de electrones mitocondrial y las enzimas nicotinamida adenina dinucleótido/nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADH/NADPH) oxidasa, xantina oxidasa y sintasa endotelial de NO (eNOS)¹ (fig. 1). El sistema de la NADH/NADPH oxidasa es la fuente principal de O_2^- vascular y está constituido por oxidasas unidas a membrana que emplean NADH y NADPH como sustratos^{2,4}. Desde el punto de vista estructural, estas oxidasas constan de varias subunidades: gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox y rac, de los que las 2 primeras intervienen en la transferencia de un electrón del NAD(P)H al oxígeno por la oxidasa [originando O_2^- y NAD(P)⁺] y las 3 últimas actúan como

reguladores de la actividad de la enzima⁵. Este sistema enzimático está regulado por factores muy involucrados en la patogénesis de las enfermedades vasculares como citoquinas, hormonas vasoactivas y fuerzas físicas. Por ejemplo, se ha descrito que la exposición de células musculares lisas vasculares en cultivo a angiotensina II o a factor de necrosis tumoral α (TNF- α) aumenta la actividad de las NADH/NADPH oxidasas^{2,3}. Por otra parte, se ha descrito que el estímulo 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 vascular⁶⁻⁸.

El sistema enzimático de la heme oxygenasa está constituido por 2 isoformas cuya expresión se ha documentado en las células endoteliales y en las células de músculo liso vascular⁹. Ambas enzimas catalizan la degradación del grupo heme, con la consiguiente formación de monóxido de carbono que produce vasodilatación mediada por GMP cíclico¹⁰, y de biliverdina y bilirubina que atrapan e inactivan O_2^- ¹¹.

FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR DEL EXCESO DE O_2^-

Tanto el O_2^- como el NO son radicales altamente reactivos e inestables. Por lo tanto, no es sorprendente que reaccionen muy rápido a una velocidad estimada de $6,7 \times 10^9 \text{ mol s}^{-1}$ para formar como producto principal $OONO^-$ (fig. 1)¹². Esta reacción es aproximadamente tres veces más rápida que la dismutación de O_2^- por la superóxido dismutasa, lo que implica que el exceso de O_2^- en la pared vascular tiene como consecuencia principal la disminución de la disponibilidad de NO y el incremento de la de $OONO^-$ y como consecuencia secundaria la inducción de la producción de H_2O_2 .

El $OONO^-$ es un oxidante fuerte¹³ y a pH neutro puede protonarse para formar ácido peroxinitroso, que por ruptura homolítica puede producir radicales tipo hidroxilo y dióxido de nitrógeno que también son oxidantes fuertes^{14,15}. Las reacciones de oxidación inducidas por el $OONO^-$ tales como la modifi-

Correspondencia: Dr. Javier Díez
División de Fisiopatología Cardiovascular
C/ Irunlarrea, s/n
31008 Pamplona
E-mail: jadimar@unav.es

Tabla I. Fuentes celulares de especies reactivas del oxígeno

Fuente	Localización
Lipoxigenasas Ciclooxigenasas NADH/NADPH oxidasa	Membrana plasmática
Sistema de transporte de electrones Xantino-oxidasa	Mitocondria Citosol
Hemoglobina Catecolaminas Riboflavina Metales de transición (Fe ^{2+/3+} , Cu ^{1+/2+}) Oxidases	Peroxisoma
Flavoproteínas Oxidases y sistema de transporte de electrones Citocromos P-450 y b ₅	Retículo endoplásmico

cación de grupos hierro-sulfuro, dedos de zinc, proteínas con grupos tioles y lípidos –de membrana probablemente estén implicadas en procesos de daño celular local (fig. 1)^{14,16,17}. Por otra parte, aunque el OONO⁻ puede producir vasodilatación, este efecto ocurre a concentraciones mucho mayores que las concentraciones vasorrelajantes efectivas del NO¹⁸⁻²¹.

De acuerdo con la noción de que las especies reactivas del oxígeno actúan como reguladores de vías intracelulares de señal y de factores de transcripción²², diversos hallazgos sugieren que el H₂O₂ es un mediador de los efectos estimulantes del crecimiento de las células musculares lisas vasculares por diversos agonistas vasoactivos (por ejemplo, angiotensina II)²³ y factores de crecimiento (por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas)²⁴ (fig. 1). De hecho, en células musculares lisas vasculares, la angiotensina II estimula la expresión de la isoforma extracelular de la superóxido dismutasa vascular, lo que propicia la formación de H₂O₂ y su crecimiento ulterior²⁵.

Por lo tanto, a partir de un exceso vascular de O₂⁻ (con la consiguiente disminución de la disponibilidad de NO y el aumento en la disponibilidad de OONO⁻) se comprometen las funciones endoteliales dependientes del NO (tanto la vasodilatadora, como la antiinflamatoria y la anticoagulante)²⁶, se estimula la hipertrofia del músculo vascular (con el consiguiente remodelado estructural y geométrico de la pared)²⁷ y se daña la integridad química de numerosos componentes de las células de la propia vasculatura (que por ello se tornan disfuncionantes)²⁸. Por todo ello, el estrés oxidativo (dependiente de un exceso de O₂⁻ se considera un componente esencial en la fisiopatología de las situaciones clínicas que se considerarán a continuación^{29,30}.

APLICACIÓN A SITUACIONES CLÍNICAS

Aterosclerosis

Diversas evidencias experimentales y clínicas sugieren que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad. Estudios efectuados *in vitro* han demostrado que en condiciones experimentales proateroscleróticas como la hipercolesterolemia y el tabaquismo, el O₂⁻ puede mediar alteraciones implicadas en la formación de la placa aterosclerótica, como la disfunción endotelial³¹, la oxidación de las LDL³², la sobreproducción de moléculas de adhesión y el reclutamiento de macrófagos³³, la producción local de factores quimiotácticos de los monocitos como el MCP-1³⁴. Además, el O₂⁻ también puede estar implicado en alteraciones como la apoptosis de las células vasculares³⁵ y la degradación de la matriz extracelular³⁶, que determinan la vulnerabilidad de la placa.

En modelos animales de hipercolesterolemia (conejos normales alimentados con dieta rica en grasas) o de aterosclerosis (conejos Watanabe alimentados con dieta rica en grasas) se ha comprobado que la producción vascular de O₂⁻ aumenta en paralelo con el incremento de los niveles de colesterol y con el desarrollo y la progresión de las lesiones ateroscleróticas³⁷⁻³⁹. En esos mismos estudios se ha demostrado, que aunque inicialmente la fuente del exceso de O₂⁻ es la NADH/NADPH oxidasa endotelial estimulada por la hipercolesterolemia, con la evolución del proceso el resto de las células vasculares contribuyen a la anomalía debido a la influencia sobre la enzima de factores como la angiotensina II y el TNF-α sobre la enzima.

En pacientes con aterosclerosis la administración de antioxidantes como el probucol y el ácido ascóric

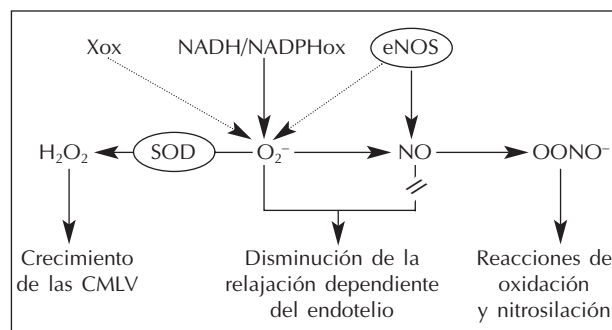


Fig. 1.—Formación y acciones potenciales del anión superóxido (O₂⁻) en la pared vascular. (Xox, xantina oxidasa; NADH/NADPHox, NADH/NADPH oxidasa; eNOS, sintasa endotelial de óxido nítrico; SOD, superóxido dismutasa; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; NO, óxido nítrico; OONO⁻, peroxinitrito; CMLV, células musculares lisas vasculares).

bico mejoran la relajación dependiente del endotelio, lo cual demuestra la implicación de las especies reactivas del oxígeno en la disfunción endotelial aterosclerótica⁴⁰. Recientemente, Guzik y cols.⁴¹ estudiaron la actividad de la NADH/NADPH oxidasa en la vena safena de pacientes con aterosclerosis coronaria y hallaron un incremento anormal de la misma que se asociaba con una menor relajación vascular mediada por NO y con factores de riesgo aterosclerótico como hipercolesterolemia y diabetes. Estos datos sugieren que el O_2^- puede estar implicado en la patogénia de la aterosclerosis humana.

De hecho, en estudios postmortem efectuados en pacientes con aterosclerosis coronaria se ha demostrado que la expresión de la subunidad p22phox de la NADH/NADPH oxidasa es significativamente mayor en las lesiones ateroscleróticas, especialmente en la región del hombro más vulnerable a la ruptura, que en los segmentos arteriales sanos^{42,43}. Además, recientemente se han descrito un polimorfismo C242T del gen de la subunidad p22phox, que se asocia a menor actividad de la oxidasa⁴⁴ y es menos frecuente en los pacientes con aterosclerosis coronaria⁴³. Aunque estos resultados no han sido confirmados por otros autores^{45,46}, el hecho de que se haya descrito otro polimorfismo del gen de la p22phox (A640G) más frecuente en los pacientes con aterosclerosis coronaria que en los sujetos sanos⁴⁶, sugiere que la susceptibilidad de los pacientes coronarios al estrés oxidativo mediado por la NADH/NADPH oxidasa puede estar genéticamente determinado.

Hipertensión arterial

Tanto en la hipertensión arterial esencial humana^{47,48}, como en distintos modelos animales de hipertensión, incluyendo el de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR)⁴⁹⁻⁵², se ha descrito una producción vascular exagerada de O_2^- . Hallazgos recientes demuestran que la expresión de la subunidad p22phox y la actividad de la NADH/NADPH oxidasa están aumentados en la aorta de las ratas SHR⁵⁰ (fig. 2). En el mismo estudio se comprobó que en la aorta de las ratas SHR tratadas crónicamente con el antagonista de los receptores AT_1 , irbesartán se normalizaban tanto la producción de O_2^- , como la expresión y la actividad enzimáticas⁵⁰ (fig. 2). Dado que esos efectos se observaban a dosis de irbesartán que no normalizaban la presión arterial en las ratas SHR tratadas, cabe sugerir que la angiotensina II desempeña un papel relevante en el estrés oxidativo vascular en este modelo de hipertensión. Confirmando esta posibilidad, Touyz y Schiffrin⁵³ han demostrado, que las células musculares lisas aisladas de arterias de resistencia de pa-

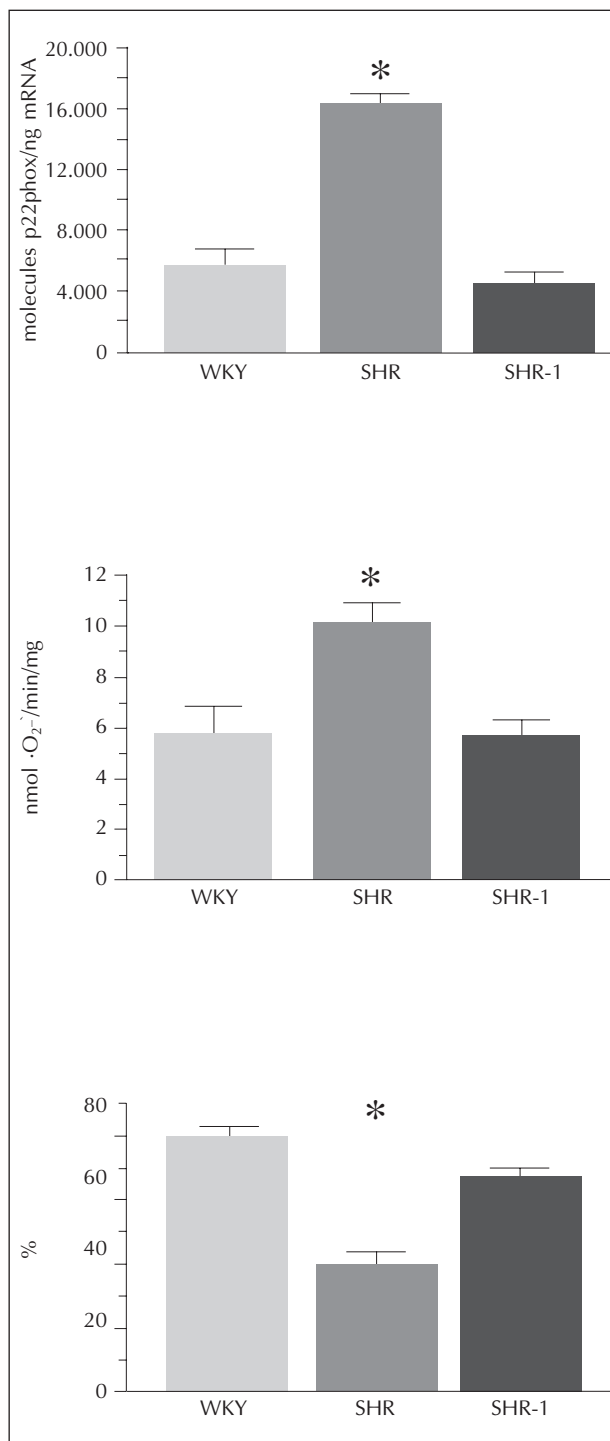


Fig. 2.—Expresión del RNA mensajero del gen de la p22phox (panel A), producción de anión superóxido por la NADPH oxidasa (panel B) y respuesta relajante máxima a la acetilcolina (panel C) en la aorta de ratas normotensas (WKY), ratas espontáneamente hipertensas no tratadas (SHR) y ratas SHR tratadas crónicamente con irbesartán (SHR-1). (* $p < 0,05$ con respecto a los otros dos grupos). [Adaptado de referencia 50].

cientes con hipertensión arterial esencial, producen más O_2^- en respuesta a la angiotensina II que las células aisladas de vasos de sujetos normotensos.

Junto a los factores ambientales endógenos, los factores genéticos también pueden condicionar el estrés oxidativo en la hipertensión arterial. En este sentido, nuestro grupo ha descrito la existencia de polimorfismos en el promotor del gen de la subunidad p22phox de las ratas SHR que se asocian con una mayor expresión de la misma⁵⁴. La caracterización reciente del promotor del gen de la subunidad p22phox del humano⁵⁵ abre la posibilidad a hallazgos similares en pacientes con hipertensión arterial esencial. De hecho, se ha descrito que en los pacientes hipertensos esenciales entre el 20 y el 35% de la variación en la producción de H_2O_2 puede atribuirse a factores genéticos⁵⁶.

La disfunción endotelial caracterizada por una disminución de la capacidad vasorrelajante del endotelio es una alteración fisiopatológica relevante de la hipertensión arterial humana y experimental⁵⁷. Junto a otros posibles mecanismos (déficit cuantitativo o funcional de la eNOS y/o de la guanilato ciclase de las células musculares vasculares) se ha propuesto que el exceso de O_2^- puede estar directamente implicado en esa anomalía a través de una disminución en la disponibilidad de NO⁵⁸. De hecho, en la aorta de las ratas SHR se ha descrito que existe un desbalance entre el O_2^- y el NO, con un exceso relativo del primero con respecto al segundo⁵⁹. Además, las maniobras que disminuyen la producción⁵⁰ o la disponibilidad⁶⁰ de O_2^- se asocian a normalización de la vasorrelajación dependiente del endotelio en las ratas SHR (fig. 2). Algunos autores han llegado a sugerir que esta disfunción endotelial estaría implicada en el desarrollo de la propia hipertensión, pues facilitaría el efecto vasoconstrictor de agonistas como la angiotensina II⁶¹.

Diabetes

La concentración de productos de peroxidación lipídica está anormalmente elevada en el plasma de ratas con diabetes experimental⁶² y pacientes con diabetes tipo I y tipo II⁶³, lo que sugiere que en esta enfermedad hay un aumento del estrés oxidativo. El propio exceso de glucosa puede facilitar el estrés oxidativo a través de mecanismos mediadores como la autooxidación de la glucosa, la glicosilación de proteínas con formación de productos terminales de glicosilación avanzada (AGEs) y la vía del poliol⁶⁴. En último término, estos mecanismos conducen a un imbalance entre la producción exagerada de especies reactivas del oxígeno y la inactivación deficiente de las mismas.

No está totalmente aclarada cual sería la fuente responsable de la producción exagerada de especies

reactivas del oxígeno en la diabetes. En lo que al O_2^- concierne, se ha descrito que la actividad de la NADH/NADPH oxidasa está aumentada en la retina de ratas diabéticas⁶⁵ y en la vena safena de pacientes diabéticos con aterosclerosis coronaria⁴¹. Por otra parte, el hecho de que la administración de arginina⁶⁶ o de tetrahidrobiopterina⁶⁷, sustrato y cofactor respectivamente de la NOS, corrija la disfunción endotelial y mejoren la producción vascular de GMP cíclico en la diabetes experimental sugiere que la carencia de ambos compuestos facilitaría la disfunción de la eNOS que entonces produciría O_2^- . Finalmente, ciertos hallazgos sugieren que algunas proteínas glicosiladas localizadas en la pared vascular, como por ejemplo la hemoglobina glicosilada, podrían ser también una fuente no enzimática de O_2^- en la vasculatura diabética⁶⁸.

El estrés oxidativo puede estar implicado en alteraciones vasculares propias de la diabetes como la disfunción endotelial. En efecto, se ha descrito que la relajación dependiente del endotelio está disminuida en la pared vascular de animales⁶⁹ y humanos⁷⁰ diabéticos. Diversos hallazgos sugieren que un aumento en la generación de O_2^- contribuye a esta alteración. Así, el tratamiento con superóxido dismutasa normaliza la respuesta relajante endotelial a la acetilcolina en ratas diabéticas^{71,72}, mientras que el tratamiento con vitamina C restaura la respuesta relajante endotelial a la metacolina en diabéticos tipo I⁷³ y tipo II⁷⁴.

Finalmente, diversas evidencias sugieren que el estrés oxidativo mediado por el exceso de O_2^- puede estar implicado tanto en el origen (apoptosis de las células β del páncreas en la diabetes tipo I o resistencia periférica a la acción de la insulina en la diabetes tipo II)^{75,76}, como en las complicaciones (miocardiopatía y neuropatía)^{77,78} de la diabetes.

Insuficiencia cardíaca

Diversos estudios clínicos han descrito un aumento del estrés oxidativo en la insuficiencia cardíaca que es más marcado a más severo es el deterioro funcional del corazón⁷⁹⁻⁸⁴. El estrés oxidativo de la insuficiencia cardíaca es el resultado de un exceso de O_2^- , debido fundamentalmente a una disminución de la actividad de la superóxido dismutasa y otras enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión peroxidasa^{85,86}.

El estrés oxidativo mediado por el O_2^- y sus derivados $OONO^-$ y H_2O_2 puede desempeñar un papel muy importante en la evolución de los pacientes con insuficiencia cardíaca, pues puede contribuir al deterioro del corazón indirectamente, comprometiendo la perfusión del miocardio y/o incrementando las re-

sistencias periféricas, y directamente, disminuyendo la cuantía y/o la actividad del miocardio contráctil.

En efecto, el exceso de O_2^- puede estar implicado en la disminución de la vasorrelajación dependiente del endotelio de la circulación coronaria⁸⁷ y de la circulación sistémica⁸⁸ que presentan los pacientes con insuficiencia cardíaca. Por otra parte, *in vitro* se ha comprobado que tanto el O_2^- ^{89,90}, como el H_2O_2 ⁹⁰, inducen la muerte por apoptosis de los cardiomiocitos. Finalmente, en experimentos efectuados con cardiomiocitos aislados se ha demostrado que el O_2^- inhibe rápida e irreversiblemente el desarrollo de la fuerza contráctil inducida por el Ca^{2+} ⁹¹ y que el $OONO^-$ altera el flujo de Ca^{2+} y daña el aparato contráctil⁹².

Insuficiencia renal

Es bien conocido que la incidencia de complicaciones cardiovasculares ateroscleróticas en los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) es elevada y muy superior a la de la población general, tanto en Europa⁹³, como en USA⁹⁴. Así se ha demostrado en los pacientes antes de iniciar el programa de diálisis⁹⁵ y una vez iniciado este^{95,96}.

Estudiando los factores de riesgo cardiovascular en los pacientes con IRC se ha observado que junto a los factores tradicionales, estos pacientes presentan factores intrínsecamente ligados al estado urémico y factores relacionados con el procedimiento de depuración extrarrenal, bien sea la hemodiálisis⁹⁷ o la diálisis peritoneal⁹⁸ (tabla II). Los tres grupos de factores estarían implicados en el desarrollo de disfunción endotelial⁹⁹ y en la inducción de una reacción inflamatoria sistémica, con especial afectación de la vasculatura¹⁰⁰. En su conjunto las observaciones precedentes apoyan el concepto de que la IRC es, fundamentalmente, un estado vasculopático¹⁰¹.

Uno de los factores de riesgo de aterosclerosis propio de la IRC es el estrés oxidativo¹⁰². En efecto, los pacientes con IRC presentan elevadas concentraciones circulantes de marcadores de estrés oxidativo, incluyendo productos de peroxidación lipídica¹⁰³⁻¹⁰⁵ y productos de oxidación avanzada de proteínas^{106,107}. Diversas evidencias sugieren que el estrés oxidativo urémico es el resultado de una generación exagerada de especies reactivas del oxígeno combinada con una capacidad antioxidante deficitaria.

La estimulación de la NADH/NADPH oxidasa vascular por las LDL oxidadas¹⁰⁸ y la estimulación de la NADH/NADPH oxidasa fagocítica por las LDL oxidadas¹⁰⁹ y por las membranas de diálisis de cuprofán¹¹⁰, son dos mecanismos implicados en la generación exagerada de O_2^- en los pacientes con IRC. De hecho, se

Tabla II. Factores de riesgo cardiovascular en la insuficiencia renal crónica

Factores tradicionales

Hipertensión
Hiperlipidemia
Tabaquismo
Diabetes

Factores ligados al estado urémico

Estrés oxidativo
Propensión de las LDL a la oxidación
Hiperhomocisteinemia
Sobrecarga hemodinámica
Acidosis metabólica
Infecciones virales
Toxinas urémicas
Anemia / Hipertrofia ventricular izquierda

Factores relacionados con la diálisis

Biocompatibilidad de las membranas
Exposición a componentes bacterianos del dializado
Infecciones

han observado niveles anormalmente elevados de O_2^- en la sangre de los pacientes en programa de hemodiálisis¹¹¹. Por otra parte, en los pacientes con IRC se han descrito déficits de antioxidantes como el glutatión¹¹² y la vitamina C¹¹³. Aunque los niveles de vitamina E son normales en la IRC, estudios *in vitro* han demostrado que su acción antioxidante es ineficaz¹¹⁴. Finalmente, los datos existentes sobre otros antioxidantes, como la superóxido dismutasa, resultan más controvertidos, probablemente dependiendo de la veracidad de la IRC de los pacientes estudiados¹¹⁵.

Conclusiones y perspectivas

Cada vez hay más datos, procedentes de experimentos animales e investigaciones clínicas, que indican que diversas enfermedades vasculares se asocian con una producción aumentada de O_2^- vascular, lo que compromete la disponibilidad del beneficioso NO endotelial y potencia la disponibilidad del dañino $OONO^-$. Los mecanismos mediante los cuales las células vasculares producen un exceso de O_2^- se están empezando a caracterizar y, probablemente, serán un objetivo para futuras estrategias terapéuticas. Mientras llega ese momento es preciso que el diagnóstico del estrés oxidativo se optimice metodológicamente y que se introduzca en el estudio clínico de los pacientes vasculares.

El campo del estrés oxidativo constituye un ejemplo paradigmático de lo que ha de ser la integración de la investigación molecular con la medicina clínica. Para que esa integración sea posible es preciso

aprovechar las oportunidades que ofrecen metodologías recientemente desarrolladas y de gran potencial como la genómica y la proteómica. Así, por ejemplo, la investigación genómica ya ha permitido identificar una familia de genes que participan en la defensa frente al estrés oxidativo y que podrían emplearse para conferir resistencia frente al mismo¹¹⁶. Por su parte, la investigación proteómica está caracterizando aquellas proteínas que sufren modificaciones secundarias al estrés oxidativo y que, secundariamente, determinan la disfunción y la degeneración de la célula, por lo que constituirían moléculas diana de intervenciones destinadas a la protección celular¹¹⁷.

BIBLIOGRAFÍA

- 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: 57-64, 2000.
- 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: 810-818, 1998.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501, 2000.
- Hishikawa K, Lascher 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: C421-C427, 1997.
- Zhang F, Kaide J-I, Rodríguez-Mulero F, Abraham NG, Nasjletti A: Vasoregulatory function of the heme-heme oxygenase-carbon monoxide system. *Am J Hypertens* 14: 62S-72S, 2001.
- Maines MD: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554, 1997.
- Duckers HR: Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nature Med* 7: 692-698, 2000.
- 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.
- 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.
- White CR, Brock TA, Chang L-Y y cols.: Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1044-1048, 1994.
- 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 P, 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.
- Kunsch C, Medford RM: Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85: 753-766, 1999.
- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M y cols.: Role of NADH/NADPH oxidase-driven H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 32: 488-495, 1998.
- Simon AR, Rai U, Fanburg BL, Cochran BH: Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol* 275: C1640-C1652, 1998.
- Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG: Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res* 85: 23-28, 1999.
- Cai H, Harrison DG: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840-844, 2000.
- Irani K: Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 87: 179-183, 2000.
- Ronson RS, Nakamura M, Vinten-Johansen J: The cardiovascular effects and implications of peroxynitrite. *Cardiovasc Res* 44: 47-59, 1999.
- Kojda G, Harrison D: Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43: 562-571, 1999.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T: Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18: 655-673, 2000.
- Raij L, DeMaster EG, Jaimes EA: Cigarette smoke-induced endothelium dysfunction: role of superoxide anion. *J Hypertens* 19: 891-897, 2001.
- Aviram M, Rosenblat M, Etzioni A, Levy R: Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism* 45: 1069-1079, 1996.
- Marui N, Offerman M, Swerlick R y cols.: Vascular cell-adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene-transcription and expression are regulated through an antioxidant sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 92: 1866-1874, 1993.
- Chen XL, Tummala PE, Olibrych MT, Alexander RW, Medford RM: Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83: 952-959, 1998.
- Li PF, Dietz R, Von Harsdorf R: Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett* 404: 249-252, 1997.
- Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS: Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases *in vitro*. *J Clin Invest* 98: 2572-2579, 1996.

37. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91: 2546-2551, 1993.
38. Miller FJ Jr, Guterman DD, Ríos CD, Heistad DD, Davidson BL: Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 82: 1298-1305, 1998.
39. Wamholtz A, Nickenig G, Schulz E y cols.: Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99: 2027-2033, 1999.
40. Anderson U, Mereith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P: The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasodilation. *N Engl J Med* 332: 488-493, 1995.
41. Guzik TJ, West NW, Black E y cols.: Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase. Association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 86: e85-e90, 2000.
42. Azumi H, Inoue N, Takeshita S y cols.: expression of NADH/NADPH oxidase p22^{phox} in human coronary arteries. *Circulation* 100: 1494-1498, 1999.
43. Yokoyama M, Inoue N, Kawashima S: Role of the vascular NADH/NADPH oxidase system in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 902: 241-247, 2000.
44. Guzik TJ, West NE, Black E y cols.: Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22^{phox} gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 102: 1744-1747, 2000.
45. Li A, Prasad A, Mincemoyer R y cols.: Relationship of the C242T p22^{phox} gene polymorphism to angiographic coronary artery disease and endothelial function. *Am J Med Genet* 86: 57-61, 1999.
46. Gardemann A, Mages P, Latz N, Tillmanns H, Haberbosch W: The p22^{phox} A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis* 145: 315-323, 1999.
47. Kumar KW, Das UN: Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Rad Res Commun* 19: 59-66, 1993.
48. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW: Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 16: 291-303, 1998.
49. Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW: *In vivo* evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 25: 1083-1089, 1995.
50. Zalba G, Beaumont FJ, San José G y cols.: Vascular NAD11/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35: 1055-1061, 2000.
51. Wu R, Millette E, Wu L, De Champlain J: Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 19: 741-748, 2001.
52. Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF: Superoxide excess in hypertension and aging. A common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 37 [part 2]: 529-534, 2001.
53. Touyz RM, Schiffrin EL: Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 19: 1245-1254, 2001.
54. Zalba G, San José G, Beaumont FJ, Fortuño MA, Fortuño A, Díez J: Polymorphisms and promoter overactivity of the p22^{phox} gene in vascular smooth muscle cells from SHR. *Circ Res* 88: 217-222, 2001.
55. Zalba G, Moreno MU, San José G, Díez J: Identificación y análisis de los elementos implicados en la regulación y actividad promotora del gen humano de la subunidad p22^{phox}. *Investigación Cardiovascular* 4: 66-77, 2001.
56. Lacy F, Kailasam. MT, O'Connor DT y cols.: Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension. Role of heredity, gender, and ethnicity. *Hypertension* 36: 878-884, 2000.
57. Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens* 14 (Supl. 5): S83-S93, 1999.
58. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF: Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion. *Hypertension* 34: 539-545, 1999.
59. Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Díez J: Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats? *Nephrol Dial Transplant* 16 (Supl. 1): 2-5, 2001.
60. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato, Inoue M: Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10045-1148, 1991.
61. Romero JC, Reckelhoff JF: Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 34 [part 2]: 943-949, 1999.
62. Dohi T, Kawamura K, Morita K, Okamoto H, Tsujimoto A: Alterations of the plasma selenium concentrations and the activities of tissue peroxide metabolism enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm Metab Res* 20: 671-675, 1988.
63. Gallou G, Ruelland A, Legras B y cols.: Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin Chem Acta* 214: 227-234, 1993.
64. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J: Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 26: 163-176, 2000.
65. Ellis EA, Grant MB, Murray F y cols.: Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. *Free Radic Biol Med* 24: 111-120, 1998.
66. Pieper GM, Peltier BA: Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 25: 397-403, 1995.
67. Pieper CM: Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. *J Cardiovasc Pharmacol* 29: 8-15, 1997.
68. Angulo J, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C, Marín J, Rodríguez-Mañas L: Impairment of endothelium-dependent relaxation by increasing percentages of glycosylated human hemoglobin: possible mechanisms involved. *Hypertension* 28: 583-592, 1996.
69. Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y, Kanno M: Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 132: 75-78, 1986.
70. Pieper CM: Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes. Protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension* 31: 1047-1060, 1998.
71. Langerstroer P, Pieper GM: Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 263: H257-H265, 1992.
72. Pieper GM, Langerstroer P, Siebeneich W: Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc Res* 34: 145-156, 1997.
73. Timimi FK, Ting HH, Haley EA, Roddy M-A, Ganz P, Creager MA: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 31: 552-557, 1998.
74. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 97: 22-28, 1996.
75. Delaney CA, Tyrberg B, Bouwens L y cols.: Sensitivity of human pancreatic islets to peroxynitrite-induced cell dysfunction and death. *FEBS Lett* 394: 300-306, 1996.

76. Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M, D'Onofrio F: Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 57: 650-656, 1993.
77. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Thomas TP, Hill M, Khaper N, Singal PK: Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition* 11: 551-554, 1995.
78. Hounsom L, Corder R, Patel J, Tomlinson DR: Oxidative stress participates in the breakdown of neuronal phenotype in experimental diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44: 424-428, 2001.
79. McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ: Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* 14: 1493-1498, 1993.
80. Ghatak A, Brar MJ, Agarwal A y cols.: Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. *Int J Cardiol* 57: 119-127, 1996.
81. Díaz-Vélez CP, García-Castineiras S, Mendoza-Ramos E, Hernández-López E: Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 131: 146-152, 1996.
82. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ y cols.: Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 31: 1352-1356, 1998.
83. Yucel D, Aydogdu S, Cehreli S y cols.: Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathy heart failure. *Clin Chem* 44: 148-154, 1998.
84. Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T: Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 135: 115-120, 1998.
85. Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M: Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 65: 245-248, 1991.
86. Chen L, Zang Y, Bai B y cols.: Electron spin resonance determination and superoxide dismutase activity in polymorphonuclear leucocytes in congestive heart failure. *Can J Cardiol* 8: 756-760, 1992.
87. Treasure CB, Vita JA, Cox DA y cols.: Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 81: 772-779, 1990.
88. Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM: Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* 84: 1589-1596, 1991.
89. Li PF, Dietz R, Von Harsdorf R: Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta 1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett* 448: 206-210, 1999.
90. Von Harsdorf R, Li PF, Dietz R: Signaling pathways in reactive oxygen species induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 99: 2934-2941, 1999.
91. Miller DJ, MacFarlane NG: Intracellular effects of free radicals and reactive oxygen species in cardiac muscle. *J Hum Hypertens* 9: 465-473, 1995.
92. Ishida H, Ichimori K, Hirota Y, Fukahori M, Nakazawa H: Peroxynitrite-induced cardiac myocyte injury. *Free Radic Biol Med* 20: 343-350, 1996.
93. Jungers P, Khoa TN, Joly D, Choukroun G, Witko-Sarsat V, Massy ZA: Atherosclerotic complications in chronic renal failure: epidemiology and predictive factors. *Adv Nephrol Nester Hosp* 30: 177-199, 2000.
94. Levin A, Foley RN: Cardiovascular disease in chronic renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 36 (Supl. 3): S24-S30, 2000.
95. Jungers P, Massy ZA, Nguyen-Khoa T y cols.: Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant* 12: 2597-2602, 1997.
96. Jungers P, Massy ZA, Nguyen-Khoa T y cols.: Incidence of atherosclerotic arterial occlusive accidents in predialysis and dialysis patients: a multicentric study in the Ile de France district. *Nephrol Dial Transplant* 14: 898-902, 1999.
97. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G y cols.: Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 58: 353-362, 2000.
98. Prichard S: Major and minor risk factors for cardiovascular disease in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 19 (Supl. 2): S133-S137, 1999.
99. Morris ST, Jardine AG: The vascular endothelium in chronic renal failure. *J Nephrol* 13: 96-105, 2001.
100. Arici M, Walls J: End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int* 59: 407-414, 2001.
101. Luke RG: Chronic renal failure - A vasculopathic state. *N Engl J Med* 339: 841-843, 1998.
102. Kitiyakara Q, Gonin J, Massy Z, Wilcox CS: Non-traditional cardiovascular disease risk factors in end-stage renal disease: oxidative stress and hyperhomocysteinemia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9: 477-487, 2000.
103. Richard MJ, Arnaud J, Jurkovic C y cols.: Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 57: 10-15, 1991.
104. Paul JL, Sall ND, Soni T y cols.: Lipid peroxidation abnormalities in hemodialyzed patients with chronic renal failure. *Nephron* 64: 106-109, 1993.
105. Roob JM, Rabold T, Hayn M y cols.: *Ex vivo* low-density lipoprotein oxidizability and *in vivo* lipid peroxidation in patients on CAPD. *Kidney Int* 59 (Supl. 78): S128-S136, 2001.
106. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C y cols.: Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 49: 1304-1313, 1996.
107. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T y cols.: Advanced oxidation protein products as native mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161: 2524-2532, 1998.
108. Drüeke TB, Nguyen-Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Laccour B, Descamps-Latscha B: Role of oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerosis of uremia. *Kidney Int* 59 (Supl. 78): S114-S119, 2001.
109. Galle J, Heinloth A, Wanner C, Heermeier K: Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress. *Kidney Int* 59 (Supl. 78): S-120-S123, 2001.
110. Nguyen AT, Lethias C, Zingraff J, Herbelin A, Naret C, Descamps-Latscha B: Hemodialysis membrane-induced activation of phagocyte oxidative metabolism detected *in vivo* and *in vitro* within microamounts of whole blood. *Kidney Int* 28: 158-167, 1985.
111. Chen MF, Chang CL, Liou SY: Increase in resting levels of superoxide anion in the whole blood of uremic patients on chronic hemodialysis. *Blood Purif* 16: 290-300, 1998.
112. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M y cols.: Glutathione antioxidant system as a marker of uremia progression and oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 21: 845-863, 1996.
113. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS: Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidant in patients with chronic renal failure. *Clin Chem* 41: 1135-1138, 1995.
114. Hazeli U, Stocker R: Alpha-tocopherol does not inhibit hypo-chlorite-induced oxidation of apolipoprotein B-100 of low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 414: 541-544, 1997.
115. Mimic-Oka J, Simic T, Ekmescic V, Dragicvic P: Erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in different stages of chronic renal failure. *Clin Nephrol* 44: 44-48, 1995.
116. Volkert MR, Elliott NA, Housman DE: Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14530-14535, 2000.
117. Toda T: Current status and perspectives of proteomics in aging research. *Exp Gerontol* 35: 803-810, 2000.