

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO COMO MEDIADOR DE LA
RESPUESTA INFLAMATORIA A LA INHALACIÓN DE
HUMOS ASOCIADA O NO A QUEMADURA CUTÁNEA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Navarro de Hago

Bajo la dirección de los doctores

Francisco Xavier Santos Heredero

Carlos Alberto Rodríguez Arias

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2151-6

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**Papel del Óxido nítrico como mediador de la respuesta inflamatoria a
la inhalación de humos asociada o no a quemadura cutánea**

Tesis Doctoral

Madrid Mayo de 2001

Luis Navarro de Hago

DON FRANCISCO XAVIER SANTOS HEREDERO; PROFESOR ASOCIADO DEL
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Certifica: Que el trabajo titulado “ **Papel del Óxido nítrico como mediador de la respuesta inflamatoria a la inhalación de humos asociada o no a quemadura cutánea** “, ha sido realizado, bajo mi dirección, por el Licenciado en Veterinaria D. Luis Navarro de Hago y reúne a mi juicio, las condiciones de originalidad y contenido científico suficiente para optar al grado de Doctor.

Para que conste a efectos oportunos, firmo el presente en Madrid a 8 de Mayo de dos mil uno.

DON CARLOS ALBERTO RODRÍGUEZ ARIAS; COLABORADOR HONORÍFICO
DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Certifica: Que el trabajo titulado “ **Papel del Óxido nítrico como mediador de la respuesta inflamatoria a la inhalación de humos asociada o no a quemadura cutánea** “, ha sido realizado, en codirección, por el Licenciado en Veterinaria D. Luis Navarro de Hago y reúne a mi juicio, las condiciones de originalidad y contenido científico suficiente para optar al grado de Doctor.

Para que conste a efectos oportunos, firmo el presente en Madrid a 8 de Mayo de dos mil uno.

A mi mujer

***“Para el científico,
el ideal supremo consiste
en resolver el enigma del propio yo,
contribuyendo a esclarecer al mismo tiempo
el formidable misterio que nos rodea”***

Santiago Ramón y Cajal.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. D. Xavier Santos y D. Carlos Rodríguez, mis directores de tesis, por su confianza, comprensión, apoyo y por su orientación general del trabajo.

A la Dra. Dña. Mercedes Sánchez de la Muela, mi tutora de tesis y compañera Veterinaria, por su disponibilidad y amabilidad siempre que la he necesitado.

Al Profesor Dr. D. José Rodrigo García del CSIC y con destino en el Instituto Cajal, por sus consejos llenos de cariño y desinterés, por su sabiduría, entusiasmo y por hacerte ver fácil lo difícil.

Al Dr. D. Rodrigo Jiménez, del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital del Aire, por sus sabias orientaciones estadísticas y metodológicas.

A la Dra. Dña. Angeles Izquierdo, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Aire, por su inestimable ayuda en el estudio anatómico-patológico del material utilizado.

A la Dra. Dña. Elena Vara, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por su desinteresada ayuda, colaboración y meticulosidad en los análisis del óxido nítrico.

Al Dr. D. Marcos Zuñil, del Servicio de Neumología del Hospital del Aire por su apoyo, entusiasmo contagioso, colaboración y sobretodo por su amistad.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	2
II. FISIOPATOLOGÍA	
II.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA QUEMADURA	7
II.1.1. Alteraciones locales	7
II.1.2. Alteraciones generales	10
II.1.2.1. Fase de urgencia: choque hipovolémico.	10
II.1.2.2. Síndrome de inhalación	12
II.1.2.3. Fase endocrino-inmuno-metabólica o de presepsis.	13
II.1.2.4. Fase de sepsis	15
II.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA INHALACIÓN	17
II.2.1. Fisiología pulmonar	17
II.2.1.2. Vías aéreas superiores	17
II.2.1.3. Intersticio pulmonar	17
II.2.1.3.1. Componentes celulares móviles en el intersticio.	19
II.2.2. Fisiopatología de la inhalación de humos	24
II.3. ÓXIDO NÍTRICO.	31
II.3.1. Síntesis biológica del óxido nítrico.	33
II.3.2. Localización de dianas del óxido nítrico.	41
II.3.3. Células productoras de óxido nítrico.	43
II.3.4. Aspectos fisiológicos y clínicos del óxido nítrico.	45
II.3.4.1. Implicaciones Fisiológicas.	45
II.3.4.2. Implicaciones patológicas del óxido nítrico.	48
II.3.4.3. La influencia en la vía L-arginina como potencial terapéutico	54
II.3.4.4. Óxido Nítrico y fisiopatología vascular	55
II.4. FISIOPATOLOGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO	63
II.4.1. Radicales libres	64
II.4.1.2. Fuentes de radicales libres	67
II.4.2. Peroxidación Lipídica	69
II.4.3. Sistema respiratorio y estrés oxidativo.	71

III. HIPÓTESIS. OBJETIVOS	76
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	78
IV.1. Modelo animal.	79
IV.1.1. Anestesia	80
IV.2. Grupos y pasos a seguir en cada grupo.	80
IV. 3. Modelo de quemadura.	82
IV.4. Método de inhalación.	84
IV.5. Método de lavado broncoalveolar	85
IV.6. Método de cuantificación de NO en LBA	87
IV.7. Método de cuantificación de NO en suero sanguíneo	87
IV.7.1. Extracción de sangre.	87
IV.7.2. Determinación de óxido nítrico	88
IV.8. Método de procesamiento de las muestras pulmonares y valoración de las lesiones.	88
IV.9. Método estadístico	91
V. RESULTADOS	93
V.1. Valores de óxido nítrico en las fracciones del lavado broncoalveolar .	94
V.2. Valores de óxido nítrico en suero sanguíneo.	98
V.3. Correlación de los valores de NO en LBA y en suero sanguíneo en los distintos grupos de ratas	104
V.4. Resultados de histología pulmonar en los distintos grupos.	107
V.5. Resultados de la microscopía confocal en los distintos grupos.	111
VI. DISCUSIÓN	116
VI.1. Elección del modelo animal.	117
VI.2. Elección del modelo de quemadura.	118
VI.3. Elección del modelo de inhalación.	122
VI.4. Medición del Óxido Nítrico.	127
VI.5. Óxido nítrico y quemadura.	131
VI.6 Óxido nítrico e inhalación de humos.	136
VI.7 Óxido nítrico y macrófagos	138
VII. CONCLUSIONES	142
VIII. BIBLIOGRAFÍA	145

I. INTRODUCCIÓN

Hasta hace pocos años, el óxido nítrico (NO) era considerado un contaminante atmosférico más. En 1992, la revista Science nombró al NO “*molécula del año*”. Este reconocimiento pretendía resaltar la importancia fundamental que se concede actualmente al NO como mediador de una lista cada día más numerosa y variada de reacciones biológicas.

La historia empezó de forma inesperada en 1980 con la publicación de un artículo firmado por Furchgott y Zawadzki en Nature sobre la importancia de la célula endotelial en los mecanismos de relajación muscular de la pared arterial. Hasta ese momento, se consideraba que las células endoteliales carecían de función específica y constituían básicamente una barrera física sin otras funciones fisiológicas conocidas. Este trabajo cambió radicalmente esta concepción.

Furchgott y Zawadzki observaron que las células endoteliales eran imprescindibles para que se produjese la relajación de la fibra muscular lisa de la pared arterial inducida por *acetil colina*. Si las células endoteliales eran eliminadas de la preparación experimental mediante métodos físicos (fricción endovascular), la *acetil colina* no producía ningún tipo de relajación. La conclusión de éste trabajo

fue que las células endoteliales debían producir algún tipo de factor que actuase sobre la fibra muscular lisa arterial y la relajase. Este factor, cuya estructura química era desconocida, se denominó “*endotelial derived relaxing factor*” (EDRF).

A partir de este momento, diversos grupos de investigación comenzaron a invertir tiempo y recursos en la identificación de la estructura química del EDRF.

En 1987, siete años después de la publicación del trabajo original de Furchgott y Zawadzki, dos grupos de investigadores independientes publicaron de forma paralela y simultánea que el EDRF era en realidad el óxido nítrico.(NO).

A partir de éste descubrimiento, se produjo un auténtico “estallido” de publicaciones sobre el papel del NO en reacciones biológicas tan diversas e importantes como la regulación del tono vascular y bronquial, la transmisión del impulso nervioso, la agregación plaquetaria, la regulación de la contractilidad cardiaca, el control de la bioenergética mitocondrial, así como varias funciones del aparato genitourinario y del tracto digestivo, diversos aspectos inmunológicos y algunas reacciones citotóxicas. En conjunto, la evidencia existente hoy en día permite sugerir que algunas enfermedades humanas pueden estar relacionadas con defectos en la producción o mecanismos de acción del NO.

En conexión con estos temas es aconsejable reseñar, aunque sea brevemente, las apasionantes investigaciones de Salvador Moncada concernientes al denominado NO u óxido nítrico, quien consiguió demostrar que la génesis de éste compuesto, a partir de la arginina, por las células endoteliales vasculares, estaba involucrada en las propiedades del denominado EDRF. Posteriormente, su grupo de trabajo aclaró que el NO es una molécula endógena responsable de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble en tejidos varios, como el cerebro, glándula adrenal o las plaquetas. El NO es , asimismo, un factor citotóxico liberado por los macrófagos activos después de la agresión inmune. Estas dos propiedades, comunicación intercelular y citotoxicidad, están

subordinadas a la producción de NO cuantitativamente diferente por dos isoformas de la oxido nítrico sintasa (NOS). Una es constitutiva, citosólica, dependiente del calcio y la calmodulina y libera picomoles de NO en respuesta a estímulo a través de receptor. En la otra su expresión génica es inducible por estímulos inmunológicos; es citosólica, independiente del calcio, libera nanomoles de NO durante periodos sostenidos y su producción es inhibida por glucocorticoides. Ambas formas dependen del NADPH y de la tetrahidrobiopterina. El óxido nítrico es una molécula pequeña gaseosa con una elevada reactividad que se difunde en el músculo vascular liso donde activa la guanilato ciclasa soluble dando lugar al cGMP que es el responsable de la relajación muscular y la dilatación de los vasos sanguíneos. Las evidencias acumuladas desde el descubrimiento de la vía L-arginina indican la relevancia del NO en biología.

Una deficiencia en la formación de NO se ha implicado en la patogénesis de ciertas enfermedades, tales como la hipertensión esencial, la aterosclerosis, la angina y el vasoespasmo. En otros casos, una excesiva producción de NO puede ser inapropiada y estar implicada en la hipotensión, sepsis, accidentes isquémicos cerebrovasculares, depresión miocárdica y respuestas inflamatorias.

Las aplicaciones clínicas del NO en patología respiratoria pueden agruparse en dos grandes grupos: el primero consiste en aplicaciones de tipo diagnóstico, basadas en la monitorización de los valores de NO (o de alguno de los diferentes aspectos involucrados en su síntesis) en diferentes circunstancias clínicas. El segundo grupo de aplicaciones potenciales del NO está compuesto por aplicaciones de tipo terapéutico, consistentes en la administración de NO (o de algún agente inductor o bloqueante de la síntesis de NO) con potenciales fines terapéuticos.

El papel del NO ha sido explorado en circunstancias clínicas potencialmente relevantes en patología respiratoria. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con el ARDS (síndrome de distress respiratorio del adulto), asma

bronquial y EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), la información disponible en otras circunstancias es más escasa.

En 1995 Kharitonov y col. demostraron que los pacientes con bronquiectasias presentaban niveles elevados de NO en aire espirado, lo que posiblemente indicaba la presencia de un proceso inflamatorio en las vías aéreas. Se desconoce que valor pueda tener la monitorización de NO en estos pacientes como indicador de inflamación bronquial crónica.

El papel del NO en pacientes con hipertensión pulmonar primitiva fue estudiado por Gaid y Saleh en 1995. Estos autores observaron que la expresión de NOS estaba disminuida en las células endoteliales de estos enfermos. Ello sugiere que el NO puede jugar un papel relevante en la etiopatogenia de la hipertensión pulmonar primitiva y plantea nuevas alternativas terapéuticas que deberán ser desarrolladas en el futuro.

La importancia del NO también ha sido evaluada en condiciones de ejercicio. En general, los diversos estudios realizados sugieren que en sujetos sanos la concentración de NO en aire espirado aumenta con el esfuerzo físico. El comportamiento del NO espirado durante el ejercicio en pacientes con enfermedad respiratoria es desconocido.. Sin embargo, ésta es un área de investigación potencialmente relevante por los importantes efectos reguladores del tono vascular y bronquial que presenta el NO. Además, el NO ejerce importantes funciones reguladoras sobre el metabolismo oxidativo mitocondrial, por lo que su papel durante el ejercicio en pacientes respiratorios crónicos sometidos a programas de rehabilitación o tras trasplante pulmonar puede ser relevante.

El síndrome hepatopulmonar se caracteriza por la presencia de dilataciones vasculares intrapulmonares en pacientes con hepatopatía crónica que motivan la presencia de alteraciones más o menos severas del intercambio pulmonar de gases. Estas dilataciones vasculares pulmonares forman parte del

estado de vasodilatación generalizado propio del enfermo hepatópata. Se ha sugerido que la producción excesiva de NO en estos enfermos pudiera ser un mecanismo patogénico importante. De hecho, se ha publicado que la concentración de NO en aire espirado en pacientes con síndrome hepatopulmonar es superior a la observada en sujetos sanos.

Actualmente se considera que el óxido nítrico (NO) es una molécula fundamental en la regulación de numerosos procesos metabólicos, muchos de ellos de potencial relevancia clínica en patología respiratoria lo cual nos ha llevado a realizar este estudio sobre el papel que pueda desarrollar el NO en la lesión respiratoria aguda producida por inhalación de humos y en el posible agravamiento de ésta lesión al asociarse una quemadura dérmica.

II.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA QUEMADURA.

Las quemaduras son lesiones de origen térmico, químico o eléctrico. Algunos autores incluyen las lesiones producidas por las radiaciones ionizantes (radiodermatitis y radionecrosis). Frecuentemente se asocia el concepto de quemadura a la localización cutánea, pero aparte de la piel y las mucosas, otros muchos tejidos pueden ser afectados, tales como el adiposo, el muscular, el óseo, etc.

Es probable que la historia de las quemaduras sea tan antigua como la de la propia humanidad, ya que si bien dichas lesiones se multiplicarían a partir del momento en que el hombre aprendió a hacer fuego y a manipularlo, quizá tuvo antes la dramática experiencia de quemarse con motivo de incendios forestales producidos por el rayo e incluso de escaldarse con el agua caliente de los geiseres y la lava de los volcanes (Haynes B WJr, 1987).

En la fisiopatología de la quemadura hay que distinguir las alteraciones que se originan a nivel de la zona quemada o locales y las alteraciones generales.

II.1.1. Alteraciones locales

La acción del calor sobre la piel produce una serie de alteraciones en el mecanismo fisiológico que regula el intercambio de fluidos entre el espacio extracelular y el intravascular. Estas alteraciones varían no solo de acuerdo con la profundidad de la quemadura, sino también de acuerdo con la etiología y, dentro de una misma etiología, según la intensidad del agente nocivo y el tiempo de

actuación. El hallazgo histológico habitual que más llama la atención en una quemadura es la gran dilatación de los plexos capilares que, como es sabido, en condiciones fisiológicas, constituye uno de los elementos encargados de la regulación de la temperatura del organismo. Esta vasodilatación se acompaña de un intenso aumento de la permeabilidad capilar, que es la causa inmediata de la ruptura del equilibrio de presiones coloidosmóticas entre el plasma y el líquido extracelular.

Al aumentar la permeabilidad capilar se produce un paso rápido de fluido de la sangre al espacio extracelular que cuando alcanza un cierto volumen se manifiesta clínicamente como edema. Cuando la continuidad de la superficie de la piel se halla alterada, parte del fluido se vierte al exterior en forma de exudado y, por último, cuando se colecciona debajo de la epidermis se producen flictenas. Las pérdidas más cuantiosas tienen lugar en las primeras 8 horas, descendiendo luego gradualmente hasta que los capilares recobran su tono y permeabilidad normal hacia las 36-48 horas; a partir de entonces se produce el fenómeno inverso, es decir la absorción de los edemas, que suele durar hasta el sexto o séptimo día. La composición del líquido extravasado es muy similar a la del plasma. El contenido en cristaloides y electrolitos es casi igual al del plasma, mientras que el contenido en proteínas no suele rebasar el 80%, encontrándose en mayor proporción las albúminas, de bajo peso molecular, que las globulinas (Zawacki BE, 1987).

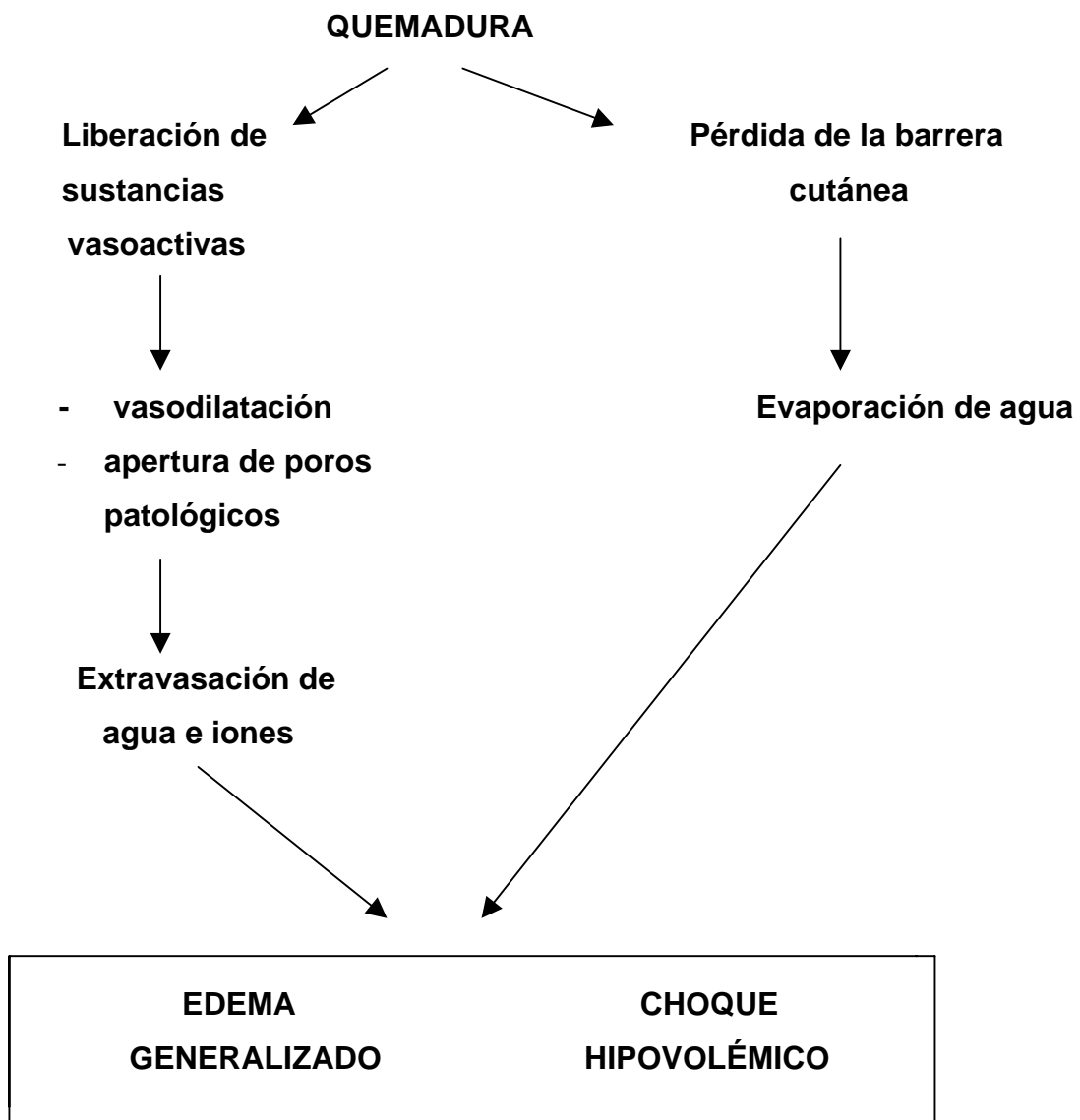


Figura II.1.1.a. Fisiopatología de la quemadura. Alteraciones locales.

II.1.2. Alteraciones generales

Las quemaduras cuando son extensas, pueden producir una serie de trastornos generales en el organismo que, en términos genéricos, guardan una relación bastante precisa entre la extensión y la gravedad.

Cuando una quemadura es de suficiente entidad en cuanto a su extensión y/o profundidad, se desencadena un cuadro clínico con suficiente entidad nosológica denominado “Enfermedad General del Quemado”. Aunque la quemadura sea una agresión local a la piel, se desencadenan una serie de reacciones del organismo que conforman un cuadro sistémico que afecta a prácticamente todos los órganos y sistemas de la economía. En este cuadro se solapan varios tipos de respuestas orgánicas, aunque para sistematizar su fisiopatología y tratamiento con fines didácticos se pueden diferenciar tres etapas:

- fase de choque hipovolémico
- fase metabólica o de presepsis
- fase de sepsis.

Además, en cualquiera de las fases anteriores pueden ocurrir múltiples complicaciones.

II.1.2.1. Fase de urgencia: choque hipovolémico.

Fisiopatología.

Inmediatamente después de producirse la quemadura se desencadena una reacción inflamatoria local en la que intervienen prácticamente todas las vías de la respuesta inflamatoria. Tal vez la liberación de histamina por los mastocitos tisulares sea una de las primeras reacciones inflamatorias, aunque de muy breve duración. A continuación se desencadenan las dos vías principales de respuesta

inflamatoria: la liberación de Radicales Libres de Oxígeno (RLO) y la cascada del ácido araquidónico. La primera de ellas tiene como resultante la producción de iones de oxígeno hiperreactivos, principalmente iones Superóxido (O_2^-). Parece que el principal efecto de algunos de estos RLO es la apertura de los llamados poros patológicos en la microcirculación. Por otra parte, la propia quemadura, así como otros mediadores químicos entre los que se encuentran algunos RLO, activan la Fosfolipasa A_2 que propicia la síntesis de ácido araquidónico. Éste puede metabolizarse por medio de dos vías: la mediada por la Ciclooxygenasa y la de la Lipooxygenasa. La primera de ellas conduce a la síntesis de Tromboxanos y Prostaglandinas de alta actividad vasoactiva. La vía de la Lipooxygenasa activa la producción de Leucotrienos, algunos de los cuales también tienen un marcado efecto sobre la microcirculación.

Tanto los Radicales Libres de Oxígeno, como algunas Prostaglandinas, Tromboxanos y Leucotrienos producidos por las diferentes vías mencionadas provocan una significativa vasodilatación y la masiva apertura de poros patológicos con la consiguiente salida de agua y iones al espacio extravascular. En los primeros momentos y sobre todo en las pequeñas quemaduras, este efecto se localiza en la zona de la lesión y los tejidos vecinos y es el responsable de las flictenas y aspecto edematoso de las mismas. Pero inmediatamente esos mediadores químicos liberados en el lugar de la quemadura pasan al torrente circulatorio y ejercen su acción en prácticamente la totalidad de la microcirculación del organismo. Así, se produce una masiva extravasación de agua y iones a los tejidos, los cuales se edematizan, lo que explica el aspecto edematoso generalizado de los quemados graves. La salida de agua y iones del espacio vascular provoca con una significativa disminución del volumen circulante es decir, a un verdadero choque hipovolémico. En las quemaduras extensas esta situación se agrava por la gran pérdida de agua por evaporación que se produce al destruirse la barrera cutánea.

La caída de la tensión arterial provocada por la hipovolemia estimula los barorreceptores simpáticos produciéndose un cierre de los esfínteres precapilares

en los tejidos no vitales para intentar mantener la circulación en órganos como el cerebro o el riñón. Así mismo, gracias al efecto ino y cronotrope positivo de la estimulación simpática, se desencadena un estado de alto gasto cardiaco para mantener las demandas tisulares. Pero si la situación de hipovolemia se mantiene este mecanismo de compensación vegetativa se vuelve insuficiente y el organismo intenta mantener la perfusión de los órganos imprescindibles por medio del estímulo del sistema renina-angiotensina y la producción de hormona antidiurética que favorecen la reabsorción renal de agua y sodio. Pero si no se instaure rápidamente el tratamiento adecuado para reponer la volemia perdida el choque se agrava y se puede producir la muerte del paciente.(Wilmore DW, 1987).

II.1.2.2. Síndrome de inhalación.

El 15% de los quemados críticos inhalan durante el accidente humos tóxicos o calientes producto de la combustión de los materiales incendiados. Los humos inhalados, producto de la combustión de la mayor parte de los materiales existentes en los recintos habitables, contienen gran cantidad de sustancias con alto poder tóxico. Por ejemplo, la combustión de los materiales sintéticos de pinturas, mobiliario, tapicerías, etc. Produce gases tan tóxicos como el ácido sulfhídrico o clorhídrico, capaces de provocar la muerte con gran rapidez. Por otra parte, en esa misma combustión se produce gran cantidad de aldehidos también de alta toxicidad. Todas estas sustancias ejercen sus efectos deletéreos al nivel del tracto respiratorio distal. Por su parte, el calor de los humos inhalados representa un efecto altamente irritativo sobre la vía aérea alta. La mezcla de los productos de la combustión desencadena un cuadro respiratorio grave caracterizado inicialmente por la presencia de atelectasias y que frecuentemente evoluciona hacia un edema pulmonar generalizado. Este último se ve agravado por el edema generalizado del paciente quemado en la fase inicial y se caracteriza por una destrucción del surfactante pulmonar, el engrosamiento de la interfase alveolo-capilar y en definitiva por un cuadro de distress respiratorio. Radiológicamente se caracteriza por un patrón algodonoso difuso bilateral. En el

marco del propio distress se pueden desarrollar también neumonías que agravan significativamente el cuadro. En general el conjunto de afecciones que pueden ocurrir dentro del llamado Síndrome de Inhalación condicionan una mortalidad que, dependiendo de las series, oscila entre el 45% y 75%.

Se debe sospechar la posibilidad de desarrollar un síndrome de inhalación en las horas siguientes en los siguientes casos:

- historia de quemaduras en recinto cerrado
- quemaduras en la cara
- presencia de vibrisas nasales, cejas o pestañas quemadas
- esputo carbonáceo
- ronquera.

En estos casos se instaurará oxigenoterapia humidificada con mascarilla, pero si el cuadro reviste suficiente gravedad no se dudará en intubar al paciente. El tratamiento del distress respiratorio consiste en ventilación asistida con presión positiva al final de la espiración (PEEP), corticoides y antibióticos.

II.1.2.3. Fase endocrino-inmuno-metabólica o de presepsis.

Fisiopatología

Aproximadamente a partir del tercer día tras la quemadura, comienzan a aparecer en la práctica totalidad del organismo las consecuencias de los graves desórdenes cardiovasculares de la fase de choque hipovolémico además de los efectos directos de la presencia de tejidos quemados en el cuerpo. Todo ello hace que aparezcan cuadros generalizados de tipo metabólico, endocrinológico e inmunológico.

Alteraciones metabólicas:

La continua evaporación de agua a través de las zonas quemadas y por tanto desprovistas de la barrera cutánea, el elevado gasto cardíaco mantenido

como un intento de compensación de la situación de choque hipovolémico, junto con las posibles infecciones que pueden aparecer, determinan un muy elevado consumo de calor. Los pacientes quemados pierden calor corporal en grandes cantidades, por lo que es preciso mantener una temperatura ambiental más elevada de lo normal. Para compensar esta pérdida de energía calórica el organismo entra en una situación hipermetabólica intentando obtener substratos energéticos en primer lugar de la grasa corporal y, cuando estos depósitos se consumen, de la masa muscular. Este es el motivo del espectacular adelgazamiento de los pacientes quemados. Como consecuencia, se llega a una situación de balance nitrogenado negativo.

Alteraciones endocrinológicas:

En los pacientes gravemente quemados se han descrito estados de hiperglucemia grave que puede precisar la administración de insulina. Así mismo, parece que alguna de las sustancias liberadas por la propia escara inhiben directamente la síntesis de hormonas tiroideas, lo que conduce a estados de hipotiroidismo. Por fin, en algunos varones quemados se han observado grados variables de feminización, la mayor parte de ellos reversibles.

Alteraciones inmunológicas:

En la escara de la quemadura y los tejidos subyacentes a la misma se producen continuamente gran cantidad de mediadores químicos con marcado efecto inmunosupresor. Las cininas, ciertos leucotrienos, prostanoïdes (prostaglandinas y tromboxanos) y radicales libres son algunos de los factores que interfieren con la movilidad, agregación, capacidad fagocitaria, etc. de linfocitos y macrófagos. Junto a estos factores inmunosupresores, el estrés, el estado hipermetabólico y las propias intervenciones quirúrgicas, determinan múltiples alteraciones inmunitarias como: una disminución del número y actividad de los linfocitos T, de la capacidad de migración linfocitaria y de la producción de

inmunoglobulinas, junto a un elevado consumo de complemento. Todo ello configura un verdadero cuadro de inmunodeficiencia adquirida.

II.1.2.4. Fase de sepsis

Fisiopatología

La infección es, aparte del Síndrome de Inhalación, la principal causa de muerte de los pacientes que ingresan en una Unidad de Quemados. Múltiples son los factores favorecedores de la infección en los quemados, a continuación se señalan algunos de ellos:

- pérdida de la barrera cutánea y de la flora bacteriana de la piel
- cuadro de inmunodeficiencia del quemado mediado por sustancias producidas en la escara y tejidos subescara
- presencia de tejidos necróticos (escara)
- presencia de catéteres, sondas, etc.

El origen de la infección puede ser:

- la propia flora intestinal, orofaríngea o urinaria
- la escara de la quemadura que se coloniza
- el punto de entrada de catéteres y sondas.

Como se puede observar el paciente quemado se suele autoinfectar a partir de su propia flora. Raramente la infección proviene del medio externo.

Clínicamente la infección en los quemados se clasifica en tres tipos, que pueden ser distintas fases de la evolución. En primer lugar, la infección no invasiva de la quemadura, es la más frecuente, se localiza en un área de la zona quemada y suele ser monomicrobiana. La infección queda reducida a la zona quemada y no invade zonas sanas. El área de quemadura infectada se vuelve

muy exudativa y suele haber picos febriles no elevados. Si los microorganismos se extienden a zonas de piel no quemada se habla de infección invasiva sin bacteriemia. Ahora el tejido se vuelve seco, costroso y necrótico, los picos febriles son más elevados y existe leucocitosis con desviación izquierda marcada. Si los gérmenes pasan a la sangre, generalmente por vía linfática, los hemocultivos se hacen positivos y se habla entonces de infección invasiva con bacteriemia. El cuadro clínico entonces se agrava y puede evolucionar al choque séptico.

En cuanto a la etiología de las infecciones, actualmente los gérmenes más frecuentemente aislados son las Enterobacterias y Estafilococo dorado seguidos de Gram-negativos como Pseudomona aeruginosa así como levaduras tipo Cándida.

II.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA INHALACIÓN.

II.2.1. FISIOLOGÍA PULMONAR

II.2.1.2. Vías aéreas superiores

La vía aérea está compuesta por una serie de conductos ramificados que partiendo de la laringe, llegan hasta los alveolos haciéndose progresivamente más finos y cortos. La traquea se bifurca en los bronquios principales, estos en los segmentales, hasta llegar a los bronquios terminales, conductos alveolares, sacos alveolares y alveolos.

Kawakami y col. 1989, realizan un estudio en ratas Wistar determinando que el diámetro del bronquio principal es de 2000 nanómetros, y el de los bronquios terminales varía de 100 a 1000 nanómetros. Los bronquios principales están recubiertos de un epitelio pseudoestratificado cuyo grosor es de 25 nanómetros, contiene principalmente células ciliadas (60%), células basales y células intermedias. Estas células basales que son poco frecuentes en el bronquio principal, no se observan en los bronquios terminales.

La pared de los bronquios terminales es muy fina y está recubierta por células epiteliales cuboides. Contiene aproximadamente un 40% de células ciliadas, células clara y células en cepillo.

II.2.1.3. Intersticio pulmonar

El intersticio pulmonar es una estructura compleja integrada por elementos celulares diversos y por un soporte extracelular. Se encuentra delimitado por las membranas basales del epitelio alveolar por una parte y por las del endotelio vascular por otra. El intersticio pulmonar da textura al llamado septum, pared o

tabique alveolar, nombre con que se designa al tejido conectivo, que ocupa los espacios interalveolares, y a los capilares alveolares que por el discurren.

El epitelio alveolar, que en algunas zonas es extremadamente fino, pero que siempre asienta sobre una membrana basal, tapiza toda la superficie interna del alveolo y se continua, con el epitelio cúbico bronquiolar. Deriva del endodermo y, en su constitución, se alternan dos tipos celulares: neumocitos tipos I y II.

El neumocito tipo I, pequeño, membranoso, escamoso y no vacuolado es el que recubre la mayor parte del área interna del alveolo. Su función es facilitar la transferencia gaseosa impidiendo el flujo de fluidos al interior del alveolo.

El neumocito tipo II, grande, granular o vacuolado, es unas dos veces más abundante que el I en el alveolo, y a diferencia de éste apenas tapiza superficie alguna. Es la célula responsable de la síntesis del surfactante o agente tensoactivo alveolar.. Sus vacuolas contienen gránulos osmiofílicos, de estructura lamelar, expresión del material fosfolipídico que constituye el surfactante. Se divide aproximadamente cada 25 días y puede diferenciarse hacia el tipo I, o ante determinadas agresiones proliferar sin diferenciarse y recubrir así , bajo la misma forma de neumocito tipo II, toda la superficie del alveolo (Kuhn C. 1978).

Los capilares interalveolares, no fenestrados, discurren por el intersticio en las zonas de intercambio gaseoso en íntima conexión con la membrana epitelial, con la que en algunas zonas llegan a fusionarse. La célula endotelial tiene capacidad para sintetizar algunas enzimas, como la angiotensina convertasa o el factor relajante endotelial y para permitir el paso de agua y de moléculas pequeñas.

La matriz extracelular conectiva en el intersticio pulmonar esta constituida por colágeno, fibras elásticas y proteoglicanos. El colágeno, con mucho, es el más abundante de esos componentes y representa más del 50% de toda esa masa de tejido conjuntivo. Hay también fibras elásticas que tienen dos componentes: el

primero, que es el elemento principal, que se llama elastina y alrededor del núcleo de elastina se encuentra lo que llamamos componentes microfibrílicos y los proteoglicanos, que representan la sustancia base de la pared alveolar (Weibel ER. 1991).

En el intersticio alveolar existe un continuo y constante balance entre formación y destrucción. Esta última es esencialmente enzimática y macrofágica. La primera depende sobre todo de la actividad de los fibroblastos, pero también de las células endoteliales y epitelios alveolares. Las funciones del intersticio son las siguientes:

- Mantiene la arquitectura de las vías aéreas e impide el colapso respiratorio en la inspiración.
- Proporciona los materiales de los que dependen la mayoría de las propiedades mecánicas del pulmón.
- Regula el trasiego de agua, solutos y células entre la sangre y el espacio alveolar.

II.2.1.3.1. Componentes celulares móviles en el intersticio.

Eosinófilos

El granulocito eosinófilo, observado por primera vez por Whorton Jones en preparaciones no teñidas de sangre periférica, fue denominado de esta manera por Paul Erlich en 1876 debido a la intensa tinción de sus gránulos por el colorante ácido eosina .

Los eosinófilos se producen en la médula ósea, son células de tamaño algo mayor que el neutrófilo, con núcleo bilobulado y citoplasma lleno de voluminosas granulaciones redondeadas, regulares de color anaranjado.

El ciclo vital se puede dividir en tres fases: medular, sanguínea e hística. Si bien estas células son elementos formes de la circulación periférica, estudios realizados indican que son células que residen en los tejidos de modo preferente. Por ello, los eosinófilos presentes en la circulación periférica representan sólo una pequeña fracción del número total de eosinófilos del organismo. En la sangre, tienen una vida media corta que varía de 8 a 18 horas. Posteriormente migran a los tejidos por diapedesis a nivel de las uniones intercelulares endoteliales. Por ello, cambios en la permeabilidad vascular pueden afectar en gran medida a la capacidad de los eosinófilos para infiltrar tejidos y contribuir a la patogenia de algunos síndromes clínicos.

Los constituyentes celulares principales de los eosinófilos son: Los receptores para inmunoglobulinas y complemento presentes en la superficie de la membrana celular, la presencia de proteína CLC (lisofosfolipasa) en la membrana celular, y una serie de proteínas catiónicas localizadas en los gránulos. También hay otros muchos enzimas, entre los que se encuentran los que son capaces de sintetizar el factor activador de plaquetas y de metabolizar el ácido araquidónico a leucotrieno C₄ (LTC₄).

Macrófagos alveolares

El macrófago alveolar (MA) es el principal responsable del sistema mononuclear fagocítico en el pulmón. Deriva de los precursores monocitarios de la médula ósea y además posee una demostrada capacidad proliferativa.

Los MA se encuentran localizados en la superficie del epitelio alveolar, siendo los principales responsables de la esterilidad del tracto respiratorio inferior (Cardozo C.1996).

Se han descrito al menos otros cuatro tipos de macrófagos en el aparato respiratorio: macrófago de las vías aéreas, macrófago intersticial, macrófago

pleural y macrófago intravascular. Entre todos ellos, el MA es el mejor estudiado debido a la facilidad con que son recuperados mediante el lavado broncoalveolar. Algunos autores proponen que todos los macrófagos recuperados mediante ésta técnica son MA. Sin embargo, los macrófagos de las vías aéreas también son recuperados en gran cantidad. (Brain JD. 1988).

a) Macrófago de las vías aéreas: Están presentes en los conductos grandes y pequeños de las vías aéreas. Estos macrófagos liberan mediadores que atraen a linfocitos, neutrófilos o mastocitos hacia dichas vías. Mediante la liberación de enzimas proteolíticos y radicales de oxígeno, modifican las propiedades del epitelio.

b) Macrófagos intersticiales: Se encuentran en contacto directo con la matriz y con otras células del tejido conectivo pulmonar. La liberación de mediadores o enzimas por estas células tiene un efecto más acusado que cuando son liberados en el espacio alveolar por los otros tipos de macrófagos. A pesar de presentar similitudes con los MA (fagocitosis, liberación de radicales libres de oxígeno y presencia de IgG), estas células presentan mayor capacidad para replicar y sintetizar ADN in vitro (Brain JD.1992).

c) Macrófago pleural: Estos macrófagos presentan mayor parecido a los macrófagos peritoneales que a los macrófagos alveolares.

d) Macrófago intravascular: Forman una compleja membrana por debajo de las células endoteliales (Brain JD.1992). Eliminan de la circulación partículas y bacterias.

e) Macrófago alveolar: Las principales funciones que desarrolla el MA son las siguientes: adherencia, quimiotaxis, fagocitosis, destrucción intracelular y citotoxicidad.

La adherencia es la capacidad que poseen algunas células (todas las del SMF) para unirse físicamente a otros elementos celulares.

El término quimiotaxis implica migración celular dirigida a favor de un gradiente de concentración químico. El mecanismo es complejo y no se conoce en su totalidad.

La fagocitosis se define como el conjunto de procesos que conducen a la ingestión de sustancias particuladas.

En la destrucción intracelular, las diferentes partículas ingeridas se destruyen en el interior de los fagolisosomas por dos mecanismos:

Por un lado, oxigenodependientes, donde la fagocitosis es uno de los estímulos principales del “estallido respiratorio” que da lugar a la formación de radicales libres de oxígeno que ejercen una acción tóxica sobre las partículas ingeridas. La producción de estos radicales de oxígeno depende tanto de factores endógenos como exógenos. En primer lugar, el sitio de residencia de los macrófagos, así se ha observado que los macrófagos peritoneales son capaces de liberar menos oxígeno que los MA. En segundo lugar, del estado de maduración. En tercer lugar, del estado de activación de los macrófagos. (Sabelle Y. 1990).

Por otro lado los oxígenoindependientes, donde además de la mieloperoxidasa, los lisosomas vierten al interior de la vacuola un gran contenido de enzimas catalíticas e inhibidoras, que actúan de forma coordinada con los mecanismos oxigenodependientes para la destrucción completa de los elementos fagocitados. (Esparza I.1989).

La citotoxicidad consiste en la propiedad que poseen los componentes del sistema mononuclear fagocítico para destruir células extrañas al organismo. Para realizar este tipo de funciones el macrófago es capaz de segregar una larga serie de productos.

Linfocitos

Son células pequeñas que cumplen un gran espectro de funciones, todas ellas necesarias para coordinar la respuesta inmune.

Los linfocitos que se encuentran en el pulmón se localizan en la zona paratraqueal, en los nódulos linfáticos hiliares, en el tejido intersticial del árbol bronquial como nódulos, agregados o células individuales y en la superficie epitelial desde la tráquea hasta el alveolo. Los nódulos linfáticos pulmonares drenan al espacio intersticial tanto bronquial como alveolar, teniendo una importante acción en la respuesta inmune primaria sobre los antígenos inhalados.

Neutrófilos

La médula ósea es el lugar de proliferación y maduración de los neutrófilos. En condiciones normales, el 90% aproximadamente se encuentran en médula ósea y un 2-3% en la circulación sanguínea y el resto en los tejidos. En la sangre estas células se hallan en dos compartimentos, un fondo común que se adhiere a las células endoteliales y otro fondo que circula libremente en la sangre. En respuestas a estímulos quimiotácticos originados en los tejidos aumenta la adhesividad de los neutrófilos y las células circulantes se aglomeran unas a otras y se adhieren al epitelio (Abramson SL. 1991). El neutrófilo es muy escaso en el intersticio pulmonar en condiciones de normalidad (no más del 1% de total celular). Por el contrario se encuentra en gran cantidad en los capilares pulmonares, en los que constituye un gran reservorio marginal adherido a los endotelios. Su salida al intersticio puede producirse masiva y rápidamente ante situaciones de inflamación aguda y por estímulos quimiotácticos diversos. Una vez en el, ya no puede volver a la circulación general. Ante estímulos de atracción de origen macrofágico o de otra índole (bacterias por ej.) puede llegar al alveolo,

si bien el paso del epitelio se produce más lentamente que el del endotelio. El neutrófilo, como célula terminal en el intersticio, no emigra por los bronquios ni por los linfáticos, sino que desaparece al ser fagocitado por el macrófago.

Junto con la fagocitosis hay una brusca elevación del consumo de oxígeno y una activación de la derivación del monofosfato de hexosa. Se activa la oxidasa del fosfato dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH) y a través de un sistema enzimático complejo, que contiene componentes del citosol y la membrana, se generan productos tóxicos del oxígeno. El peróxido de hidrógeno+cloruro+mieloperoxidasa de los neutrófilos constituyen un sistema particularmente tóxico que origina ácido hipocloroso, hipoclorito y cloro. Estos productos oxidan y halogenan a los microorganismos y a las células tumorales y su exceso puede lesionar los tejidos.

Estas células poseen dos tipos principales de gránulos: Los gránulos primarios, que son peroxidasa positivos (contienen mieloperoxidasa) y los secundarios o específicos, ricos en glucoproteínas, más numerosos y que se liberan fácilmente al exterior, y su movilización es importante para modular la inflamación.

II.2.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA INHALACIÓN DE HUMOS

La inhalación de humos se considera la principal causa de muerte como consecuencia de los accidentes por fuego (Zawacki BE y cols,1977). La inhalación de humos fue estudiada por primera vez tras el incendio ocurrido en la planta de cacahuetes en 1942 en Boston. Las investigaciones pusieron de manifiesto la escasa relación existente entre la letalidad de las complicaciones pulmonares tras la inhalación de humos y la superficie corporal quemada (Cope O y cols,1977).

La patogenia de las lesiones pulmonares secundarias a la inhalación tiene su origen en el edema que se forma tanto en la vía aérea como en el parénquima pulmonar, y a una marcada infiltración de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) como resultado de un aumento de la permeabilidad microvascular (Demling RH y cols,1990; Isago T y cols,1991; Raulf M y cols,1995; Bidani A y cols,1999) con un significativo incremento del flujo transvascular de proteínas , liberación de mediadores de la inflamación y radicales libres de oxígeno (Mikawa K y cols, 1995).

El edema que se forma en las primeras 12 horas es debido a la acción directa de los gases tóxicos y calientes, pero a partir de ese momento el edema del intersticio pulmonar parece estar mediado por diferentes agentes vasoactivos (Herndon DN y cols,1987).

El término genérico de gases y sustancias tóxicas se refiere a una serie de productos químicos que, suspendidas en el aire ambiente, son capaces de causar daño en el aparato respiratorio tras su inhalación (Smith LL y cols,1987).

Cuando la suspensión de estas sustancias, en el aire ambiente, es en su forma molecular, se denomina gas o vapor, la combustión de metales produce una suspensión de finas partículas sólidas que se conoce como humo.(Zikria BA y cols, 1975).

El lugar de depósito de los gases inhalados depende de su solubilidad en la capa acuosa de la mucosa respiratoria. Así, los gases que son altamente solubles en agua como el amoníaco y el dióxido de sulfuro, ejercen sus efectos en las vías respiratorias altas, y sólo alcanzan los espacios aéreos distales cuando son inhalados en grandes dosis. (Moritz AR y cols, 1945; Seaton A y cols, 1984).

En el caso de los humos, el lugar de depósito de las partículas inhaladas depende de su tamaño; las partículas grandes de 15-20 micras de diámetro se depositan en la nariz y en la garganta, las de diámetro entre 10 y 15 micras se

depositan en la traquea y los bronquios, y las menores de 5 micras pueden llegar a los alveolos (Hill IR, 1993). Otros factores que influyen en la lesión producida por la sustancia inhalada son la concentración del agente, su potencial irritante y la duración de la exposición. Las exposiciones previas al mismo agente, la actividad física durante la exposición y la edad también pueden modificar la respuesta del individuo a la inhalación (Gandevia B, 1970).

Las sustancias tóxicas inhaladas pueden producir distintos efectos, según sus mecanismos de actuación, entre los que se incluyen asfixia, toxicidad a distancia, broncoconstricción, daño tisular de las vías aéreas y afectación del parénquima pulmonar. (Zikria BA y cols, 1972).

Con el transcurso del tiempo estas lesiones van progresando, dando lugar a la formación de un material costroso, compuesto principalmente por fibrina (Herndon DN y cols, 1983).

El daño en el parénquima pulmonar es causado por la combustión incompleta de los productos; muchas de las sustancias presentes en la combustión del algodón son dañinas, pero las más importantes son aldehidos y óxidos de azufre y nitrógeno (Dyer RF y cols, 1976). La combustión del cloruro de polivinilo libera aproximadamente 75 compuestos potencialmente tóxicos, incluyendo ácido clorhídrico y monóxido de carbono (CO) (Dyer RF y cols, 1976; Einhorn IN, 1975).

El monóxido de carbono es un gas invisible y sin olor que posee una gran afinidad por la hemoglobina desplazando al oxígeno, dando lugar a una tremenda reducción en la capacidad de transporte de oxígeno (Emmons HW, 1974; Zikria BA y cols, 1972). El incremento en la permeabilidad en la membrana epitelial alveolar se puso de manifiesto en estudios realizados con conejos expuestos a CO (Fein A y cols, 1980; Nider A, 1971).

El CO interfiere mediante reacciones de oxidación-reducción en la actividad metabólica de distintos tipos de células como son las células tipo II alveolares, dando lugar a cambios histológicos (Rhodes ML, 1971).

La patología de las lesiones tanto de vías altas como de vías bajas es debido a la formación de edema. El estudio broncoscópico de dichas lesiones en las primeras 24 horas han mostrado una gradual edematización de la mucosa traqueobronquial (DiVicenti FC y cols, 1971; Head JM, 1980).

Las lesiones pueden ser de diversa consideración; benignas, una descamación superficial, hinchazón; hasta llegar a una completa disrupción del epitelio traqueobronquial, con focos de necrosis y la formación de pseudomembranas compuestas por moco, exudado de fibrina, leucocitos polimorfonucleares, y restos de bacterias. La submucosa traqueobronquial aparece con una severa congestión y edema con hemorragias ocasionales (Yang T y cols, 1994).

Las pseudomembranas no se forman en los bronquiolos, pero los cambios inflamatorios que ocurren en la fase aguda dan lugar al desarrollo de neumonía peribronquial. También aparece un gran número de PMN en la pared y luz traqueobronquial así como en estructuras peribronquiales. Tanto la vía aérea como el parénquima pulmonar lesionado van a mostrar distintos grados de congestión, edema intersticial y alveolar, infiltración de neutrófilos, ocasionalmente membrana hialina, y densa atelectasia.

Con el transcurso del tiempo estas lesiones van progresando, dando lugar a la formación de un material costroso, compuesto principalmente por fibrina (Herndon DN y cols, 1983).

Una vez formada, esta costra puede resultar letal al producir una completa obstrucción respiratoria. Las células polimorfonucleares están involucradas en el mecanismo responsable de la formación de este material. Estudios demuestran que los aldehídos presentes en el humo provocan lesiones en las células

epiteliales de las vías aéreas, del mismo modo pueden lesionar los macrófagos pulmonares y dar lugar a la liberación de factores quimiotácticos que atraen a las células polimorfonucleares (Demarest GB y cols, 1979).

El exudado traqueobronquial formado contiene una gran cantidad del eicosanoide tromboxano B₂, metabolito estable del potente vasoconstrictor tromboxano A₂ (Herndon DN y cols, 1983). De este modo, resulta improbable que sustancias como las prostaglandinas produzcan la vasodilatación observada en la circulación pulmonar. Estudios sobre el contenido proteico del exudado muestran una disminución en comparación con el observado en condiciones normales, y se asemeja más con un infiltrado de plasma. El examen de las diferentes partes del exudado revelan que sustancias con bajo peso molecular están presentes en mayor concentración que las de alto peso molecular, lo que indica cambios selectivos en la permeabilidad responsables de esta producción. Di Vicenti y cols. describieron la aparición de broncorrea y la formación cerosa. (Di Vicenti FC y cols, 1971). Stone y Martin (Stone SS y cols, 1969), Mathru y cols. (Mathru M y cols, 1983), y Venus y cols. (Venus A y cols, 1981) todos ellos evidenciaron la aparición de un material espumoso durante la intubación y traqueotomía en pacientes con lesión por inhalación.

Estudios en ovejas con lesión pulmonar por inhalación mostraron un aumento en la producción linfocitaria y agua extravascular en el pulmón (Herndon DN y cols, 1984; Traber DL y cols, 1983). El edema intersticial pulmonar se puede identificar a nivel microvascular por microscopía electrónica (Traber DL y cols, 1984). Este edema aparece aproximadamente a partir de las 12 horas post-lesión, en cambio el edema por una lesión directa aparece más rápidamente.

En animales de experimentación, se demostró la relación directa entre los cambios en la permeabilidad microvascular y las células polimorfonucleares Staub NC y cols, 1982, estudiaron los linfocitos pulmonares en lavados bronquiales, y encontraron que los neutrófilos estaban elevados en ambos fluidos cuando existía lesión por inhalación.

Los linfocitos pulmonares tienen dos orígenes: la región bronquial y la región microvascular pulmonar. Es evidente que ambas regiones se encuentran dañadas tras la inhalación, ya que los cambios anteriormente descritos se pueden originar en una de las regiones, o en ambas.

Stone y cols. describieron el curso típico en la evolución de las lesiones por inhalación: insuficiencia pulmonar aguda, edema pulmonar, y bronconeumonía. Los pacientes con menores lesiones podían no manifestar las dos primeras etapas (Stone HH y cols, 1969; McArdle CS y cols, 1975).

La insuficiencia pulmonar aguda tiene severos componentes. La falta de oxígeno como consecuencia de su consumición por el fuego, es la primera amenaza, seguidamente el envenenamiento por monóxido de carbono; la mayoría de las muertes que se producen en los primeros momentos son debidas a una de estas dos tipos de asfixia. Los efectos irritantes de las partículas y otros compuestos derivados de la combustión incompleta de productos llevan rápidamente a un broncoespasmo agudo, tos, y traqueobronquitis (DiVicenti FC y col, 1971). La atelectasia, se vió que aparecía en cuestión de segundos en lesiones experimentales, y probablemente debido a la desactivación del surfactante (Nieman GF y cols, 1980).

El progresivo hinchamiento de la vía aérea superior y de la laringe puede impedir la capacidad de ventilación, incluso en personas que no tengan daños en vías bajas o parénquima, pero este problema sucede transcurridos dos días post-lesión. La insuficiencia pulmonar aguda severa (no se puede resolver con intubación endotraqueal) es casi siempre fatal (Stone HH y cols, 1967).

El edema pulmonar aparece entre las 6 a 72 horas post-lesión; tiene una mortalidad entre el 60 % y 70% y ocurre en uno de cada cuatro pacientes con lesión por inhalación (Wroblewski DA y cols, 1979; Zawacki BE y cols, 1977).

La tercera etapa, es la bronconeumonía, puede ser solamente la manifestación de una lesión pulmonar menor, pero conlleva una mortalidad del 50% al 86%.

Los estudios actuales ponen de manifiesto que las bronconeumonías son complicaciones que surgen en el 60% de los casos de lesiones por inhalación (Achauer BM y cols, 1973; Fein A y cols, 1980).

La etiología bacteriológica es normalmente de especies gram negativas, especialmente *Pseudomonas*, excepto en aquellas neumonías que aparecen en los primeros días post-lesión, en las que predominan las *Staphilococcus* penicilin-resistentes.

Los futuros avances están apoyados en métodos para poder regular la respuesta fisiológica a la lesión por inhalación, que es, poder incrementar la permeabilidad microvascular y disminuir los efectos negativos de la respuesta inmune.

La importancia de estos avances está clara; las lesiones por inhalación tienen entre un 45% y un 78% de mortalidad y son responsables entre un 20% a un 84% de las muertes en los pacientes quemados.

II.3. ÓXIDO NÍTRICO.

El óxido nítrico (NO) es un radical gaseoso que se produce en la atmósfera cuando ocurren descargas eléctricas naturales o por la combustión de fósiles. Sin embargo, el NO ha ampliado su estatus desde el ser un tóxico contaminante medioambiental a ser una de las más pequeñas moléculas mensajeras conocidas con actividad biológica, presentando un amplio rango de acciones tanto fisiológicas como patofisiológicas. El NO es un arma de doble filo, que producido por las células en una magnitud aceptable y tiempo apropiados, actúa como molécula de señalización en procesos fisiológicos tan diversos como la defensa inmunitaria, la comunicación neuronal y la regulación vascular. Sin embargo, su síntesis excesiva y sin control lo implican como agente causante de las complicaciones que aparecen en diversos procesos patológicos debilitantes, entre los que se encuentran el shock vascular, el accidente cerebrovascular, la diabetes, la neurodegeneración, la artritis y la inflamación crónica, procesos patológicos que pueden incluso causar la muerte.

De modo general, las moléculas bioseñalizadoras convencionales actúan siempre tras su unión a moléculas receptoras específicas, pero en el caso del NO sus acciones biológicas se ponen de manifiesto a través de una amplia variedad de reacciones químicas. El NO es un radical libre gaseoso pequeño y relativamente estable que difunde con facilidad por la membrana celular (Subczynski y col., 1996) hacia el interior de la célula, donde reacciona con las moléculas diana. Las reacciones específicas, que tienen lugar casi en cualquier lugar del organismo, dependen de la concentración de NO presente y, a menudo, de las variaciones en la composición del medio intra- y extracelular.

Mitchell y col., (1916) sugirieron por primera vez que los mamíferos podían producir óxidos de nitrógeno, lo cual fue confirmado una década después por Tannenbaum y col., (1928), y más recientemente por Green y col., (1981a,b). Desde finales de los años setenta ya se conocía que el NO se encontraba entre los ligandos capaces de activar a la guanilato ciclasa y producir la relajación del

músculo liso vascular (Arnold y col., 1977; Craven y Derubertis, 1978; Gruetter y col., 1979). A mediados de los años ochenta, Iyengar y col., (1985) y Sthuer y Marletta., (1985) demostraron la liberación de nitritos por parte de macrófagos murinos. Poco después, Palmer y col., (1987) demostraron que la producción de nitritos dependía de la presencia de L-arginina, y que dicha producción podía ser inhibida por análogos de L-arginina.

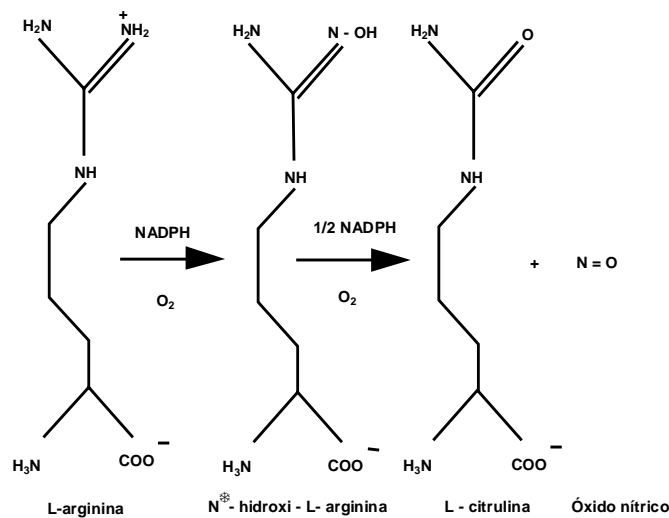


Figura II.3.1. Biosíntesis del óxido nítrico. El NO se forma en, al menos, dos pasos sucesivos. Ambos pasos requieren NADPH, O₂, Ca²⁺, y calmodulina, y son acelerados por tetrahidrobiopterina (Dawson y Dawson, 1994).

Por otro lado, a principios de la década de los ochenta, Furchgott y Zawadzki (1980) publicaron un artículo sobre la importancia de la célula endotelial en los mecanismos de relajación muscular de la pared arterial. Hasta ese momento, se consideraba que las células endoteliales carecían de función específica y constituían básicamente una barrera física sin otras funciones fisiológicas conocidas. Este trabajo cambió radicalmente esta concepción.

Furchgott y Zawadzki, observaron que las células endoteliales eran imprescindibles para que se produjese la relajación de la fibra muscular lisa de la pared arterial inducida por acetilcolina, si las células endoteliales eran eliminadas de la preparación experimental mediante métodos físicos (fricción endovascular), la acetilcolina no producía ningún tipo de relajación. La conclusión de este trabajo

fue que las células endoteliales debían producir algún tipo de factor que actuase sobre la fibra muscular lisa arterial y la relajase. Ese factor, cuya estructura química era desconocida, se denominó “*endothelial derived relaxing factor*” (EDRF). A partir de ese momento, diversos grupos de investigación comenzaron a invertir tiempo y recursos en la identificación de la estructura química del EDRF. En 1987, siete años después de la publicación del trabajo original de Furchgott y Zawadzki, dos grupos de investigadores: el grupo del Dr. Moncada (Palmer y col., 1987,1988), e Ignarro y col., (1987), demostraron que el EDRF era el NO, y que su producción dependía de la presencia de L-arginina. A partir de este descubrimiento, se produjo un auténtico estallido de publicaciones sobre el papel del NO en reacciones biológicas tan diversas e importantes como la regulación del tono vascular y bronquial (Kharitonov, 1996), la transmisión del impulso nervioso (Massaro, 1996; Maiese, 1995; Cooper, 1995), la agregación plaquetaria (Ryan, 1988; Van Bocksmeer, 1995), la regulación de la contracción cardíaca (Maekawa, 1994; Woditsch, 1992; Matheis,1992; Morita, 1994), el control de la bioenergética mitocondrial (Brown, 1995), así como varias funciones del aparato genitourinario y del tracto digestivo, diversos aspectos inmunológicos y algunas reacciones citotóxicas (Moncada, 1993; Loscalzo, 1995). A partir de entonces, el NO y las enzimas que lo sintetizan, denominadas NO-sintasas (ver a continuación), han sido localizadas en la mayoría de los sistemas y células. El conocimiento exponencial y acumulativo del NO y de sus implicaciones fisiológicas y patológicas dieron lugar a la calificación del NO como molécula del año en 1992 (Koshland, 1992).

II.3.1. Síntesis biológica del óxido nítrico.

El NO se forma como co-producto en la reacción de conversión de L-arginina a citrulina, mediante la hidroxilación de uno de los nitrógenos guanidinio de la L-arginina, con la conversión estequiométrica de NO a través de una vía de oxidación-reducción que consume cinco electrones (revisado en Griffith y Stuehr, 1995) (Fig.II.3.1). Esta reacción está catalizada por la enzima denominada *óxido nítrico sintasa* (NOS) (revisado en Griffith y Stuehr, 1995), de la cual se conocen

tres isoformas principales (Tabla II.3.1). Siguiendo los acuerdos logrados por la comisión internacional (Moncada y col., 1997), dos de estas isoformas son constitutivas en el sentido de que su activación no requiere síntesis proteica *de novo*, la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), siendo su activación dependiente de la elevación de la concentración de calcio intracelular; sin embargo ambas isoformas son inducibles bajo determinadas condiciones patológicas (Dawson y Dawson, 1994; Gath y col., 1997; Klimaschewski y col., 1996; Weiner y col., 1994). Otra isoforma es inducible bajo diferentes estímulos, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que puede ser expresada en la mayoría de las células nucleadas y cuya activación no requiere que aumenten los niveles de Ca^{2+} intracelular.

El hecho de que la iNOS se encuentre aparentemente presente en algunos tejidos animales en situaciones normales, como el pulmón fetal y adulto (Kobzik y col., 1993), placenta (Casado y col., 1997) y quizás en otros tejidos (Nathan y Xie, 1994), plantea la paradoja de la constitutividad de la iNOS. El tema tiene gran interés a la vista de los trabajos de Keilhoff y col., (1996) que señalan la aparición de la expresión de la iNOS en cerebros de rata durante el desarrollo embrionario. La expresión del mRNA de la iNOS tiene lugar en el estadio embrionario E10, manteniéndose hasta el estadio E14, momento en el que se inicia la expresión de la nNOS. Recientemente, Colasanti y col., (1995) han indicado que el NO suministrado en cultivos de microglia inhibe la expresión de la iNOS. Estos estudios plantean el hecho de que la iNOS podría estar presente en el tejido nervioso constitutivamente, aunque esta isoforma no se pone de manifiesto hasta que no se suprima o decrezca la producción de NO a través de la isoforma neuronal. Esta hipótesis está apoyada por unos recientes resultados que demuestran que la privación de oxígeno y glucosa a rodajas de cerebro anterior de rata provoca la expresión de la iNOS en diferentes tipos celulares nerviosos, descendiendo a su vez la expresión de la nNOS (Dr. I. Lizasoain, comunicación personal).

En la tabla II.3.2 se muestran las características principales de las dos categorías de óxido nítrico sintasas, constitutiva e inducible.

Tabla II.3.1. Clasificación de las óxido nítrico sintasas

Localización tisular principal	Regulación	Cofactores
Isoformas solubles		
Cerebro	Ca ²⁺ -calmodulina	NADPH, THB, FAD, FMN
células endoteliales	Ca ²⁺ -calmodulina	NADPH
neutrófilos	Ca ²⁺	NADPH, THB, FAD
macrófagos	No definido	NADPH, THB, FAD, FMN
Isoformas particuladas		
células endoteliales	Ca ²⁺ -calmodulina	NADPH, THB, FAD, FMN
macrófagos	No definido	NADPH

El primer esquema de purificación de la NO-sintasa se basó en la conversión de [³H]arginina a [³H]citrulina (Bredt y Snyder, 1990), aunque los primeros abordajes experimentales para su purificación se vieron dificultados por la pérdida de los cofactores necesarios. Estos mismos autores (Bredt y Snyder, 1990) demostraron que la actividad catalítica de la NO-sintasa era dependiente de calmodulina. De hecho, la unión del complejo calcio/calmodulina en presencia de oxígeno y de NADPH, activa el enzima para la conversión de L-arginina en NO con la formación estequiométrica de L-citrulina (Fig.II.3.1).

Tabla II.3.2. Características principales de las dos categorías de NO-sintasas: constitutiva e inducible.

	NO-sintasa constitutiva	NO-sintasa inducible
Producción	células endoteliales, plaquetas, mácula densa, neuronas	leucocitos, macrófagos, células de Kupffer, hepatocitos, células mesangiales, astrocitos, microglía
Unión a membrana	Si	No
Cálcio	Dependiente	Dependiente
Calmodulina	Dependiente	Independiente
Cofactores	Independiente	Dependiente
Liberación	vida corta, picomoles	sostenida, nanomoles
Activadores	Acetilcolina, bradikina, histamina, ADP/ATP, trombina, aminoácidos excitadores, estrés de flujo	endotoxinas, citoquinas
Inhibidores	Dimetilarginina	Glucocorticoides

El clonaje molecular del ADN complementario de las diferentes isoformas de la NO-sintasa (Bredt y col., 1991; Charles y col., 1993a,b; Geller y col., 1993; Janssens y col., 1992; Lamas y col., 1992; Lowenstein y col., 1992; Lyons y col., 1992; Nishida y col., 1992a,b; Nunokawa y col., 1993; Sherman y col., 1993;

Wood y col., 1993; Xie y col., 1992) ha clarificado en gran medida la correlación estructura-función de las enzimas encargadas de la síntesis de NO. Así, se han identificado secuencias consenso para sitios de unión de NADPH, FAD y FMN, deduciéndose que la porción C-terminal de las isoformas estudiadas presenta una homología moderada (aprox. 60%) con la P450 citocromo-NADPH reductasa, la otra única enzima de mamíferos conocida que contiene sitios de unión a FAD y a FMN (Fig.II.3.2). En general, para cada isoforma las secuencias están altamente conservadas entre las diferentes especies estudiadas (80-94% identidad), aunque la identidad global entre las secuencias de dos isoformas diferentes es moderada (50-60%) (Sessa, 1994). Las regiones de alta homología se asocian a los sitios de unión de los cofactores. Tras el descubrimiento del cofactor hemo (Klatt y col., 1992; McMillan y col., 1992; Stuehr e Ikeda-Sato, 1992; White y Marletta, 1992), se localizó su sitio de unión putativo en la región N-terminal (MacMillan y col., 1992; Renaud y col., 1993) (Fig. II.3.2).

En 1987, Hibbs y colaboradores demostraron que la muerte celular mediada por macrófagos, dependiente de L-arginina, era atenuada por diferentes análogos de la L-arginina. A partir de aquella observación inicial, el diseño, la síntesis y la elucidación del mecanismo de actuación de los inhibidores de la NO-sintasa ha sido ampliamente abordado. Así pues, en la actualidad se asume la existencia de fenómenos NO-mediados y/o NO-sintasa-dependientes si son atenuados por inhibidores selectivos de la óxido nítrico sintasa, siendo los inhibidores más típicos L-NMA, L-NNA o el L-NNA metil ester (L-NAME) (Fig.II.3.3).

Los controles de la efectividad en el uso de inhibidores de la NO-sintasa generalmente se limitan a demostrar que los fenómenos biológicos no se ven alterados por los D-enantiómeros (D-NMA, D-NNA), y que la inhibición por los L-enantiómeros se revierte con un exceso de L-arginina, ya que por lo general actúan como inhibidores competitivos, y en algunos casos irreversibles, de todas las isoformas (Moncada y Higgs, 1995). Existen otros compuestos más específicos, como el 7-nitroindazol que inhibe a la isoforma neuronal de la NO-

sintasa y que muestra actividad antinociceptiva, no interfiriendo en las acciones de la isoforma endotelial (Moore y col., 1993; Southan y Szabo, 1996). De modo general, en la Tabla II.3.3 se reflejan las propiedades físicas y las constantes cinéticas de cada una de las isoformas de la NO-sintasa.

Como ya ha sido comentado, al contrario que las moléculas de señalización convencionales que actúan previa unión a un receptor específico, el NO actúa a través de un rango amplio de reacciones químicas, de modo que controla actividades enzimáticas, canales iónicos, la transcripción génica, la respiración mitocondrial, y puede reaccionar con radicales derivados del oxígeno para producir otras sustancias altamente reactivas (Brown, 1995; Crow y Beckman, 1995; Garthwaite y Boulton, 1995; Gross y Wolin, 1995; Moncada y Higgs, 1995).

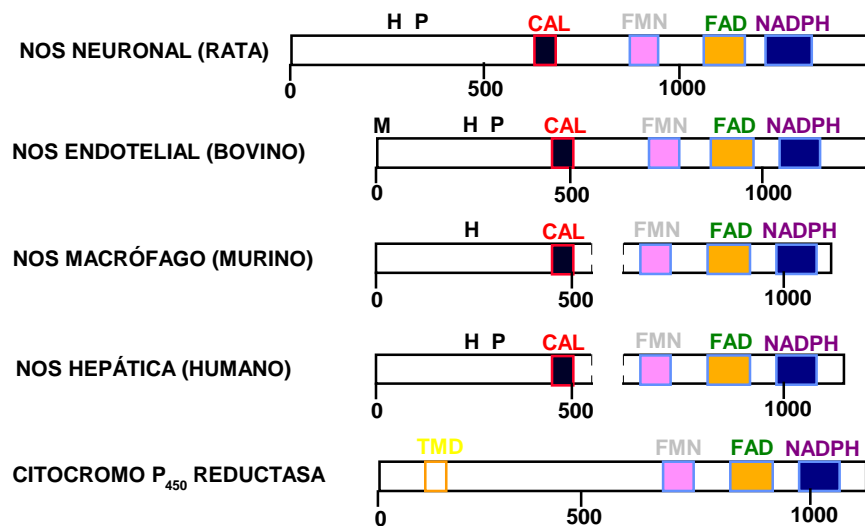


Figura II.3.2. Isoformas moleculares de la NO-sintasa. P: secuencia consenso para la fosforilación por la proteína quinasa dependiente de cAMP; CAL: sitio de unión a calmodulina; FMN: dominio de unión a mononucleótido de flavina; FAD: dominio de unión a flavina-adenina dinucleótidos; H: sitio de unión de grupos hemo; NADPH: dominio de unión para el NADPH; TMD: dominio transmembrana; M: sitio de miristoilación (Dawson y Dawson, 1994).

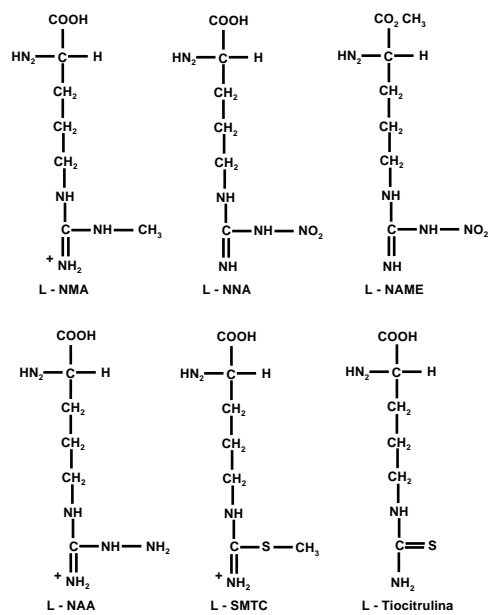


Figura II.3.3. Inhibidores de la NO-sintasa.

Tabla II.3.3. Propiedades físicas y constantes cinéticas de las isoformas de la NO-sintasa.

Propiedad física o constante cinética	NNOS	eNOS	INOS
Peso molecular de la subunidad (Daltons)	160.458 (rata)	133.286 (vaca)	130.556 (ratón)
	161.037 (humanos)	133.000 (humanos)	131.000 (rata) 131.000 (humanos)
Estructura cuaternaria	Equ. monómero/dímero	Desconocida	Dímero
EC ₅₀ ^{calmodulina}	10 nM (rata)	3,5 nM (vaca)	N/A
	70 nM (cerdo)	8 nM (humanos)	
EC ₅₀ ^{calcio}	200 nM (rata)	300 nM (vaca)	N/A
	400 nM (cerdo)	100 nM (humanos)	
V _{max} (mayor detectada)	960 nmol/min/mg (rata)	900 nmol/min/mg (vaca)	1313 nmol/min/mg (ratón) 1623 nmol/min/mg (ratón)
K _m ^{NADPH}	-	≤ 1 μM (humanos)	0,3 μM (ratón)
K _m ^{Arginina}	1,5 μM (rata)	5 μM (vaca)	19 μM (rata)
	3,3 μM (rata)	3 μM (vaca)	10 μM (ratón)
	1,2 μM (vaca)	1 μM (humanos)	2,3 μM (ratón)
K _m ^{NOH-ARG}	25 μM (cerdo)	-	6,6 μM (ratón) 13 μM (ratón)
K _m ^{NMA} (substrato)	-	-	3,1 μM (ratón)
K _i ^{NMA}	1,4 μM (rata)	0,9 μM (vaca)	6 μM (rata)
	0,2 μM (rata)	0,4 μM (humanos)	13 μM (ratón)
K _d ^{NNA}	15 nM (vaca)	39 nM (humanos)	K _i 4,4 μM (ratón)
	170 nM (cerdo)		

N/A: no aplicable

La técnica de la NADPH-d ha sido adaptada para microscopía electrónica (Hope y Vicent, 1989), de modo que la molécula que permitirá la visualización es el 2-[2'-benzotiazolil]-5-estiril-3-[4'ftalhidradidil]-cloruro de tetrazolio (BSPT) en lugar del nitroblue-tetrazolio (NBT). El BSPT es un compuesto no osmiofílico que al reducirse da lugar a formazán osmiofílico (Kalina y col., 1972), siendo por tanto de especial interés para la microscopía electrónica. La técnica del BSPT (Fig.II.3.4) fué desarrollada posteriormente por Wolf y col., (1992, 1993, 1994), y ha permitido la localización ultraestructural de la NO-sintasa en tejido nervioso bajo diferentes condiciones experimentales (Calka y col., 1994, 1996; Faber-Zuschratter y Wolf, 1994; Darius y col., 1995; Schmidt y col., 1995).

En las neuronas positivas para BSPT, el producto de reacción se encontró a nivel de las membranas del retículo endoplásmico y en la membrana nuclear. También se ha detectado depósito de BSPT-formazan en algunas zonas de la membrana externa mitocondrial y en membranas del aparato de Golgi (Wolf y col., 1992, 1993; Calka y col., 1994) (Fig.II.3.4). Aunque a nivel de microscopía óptica se han detectado otras muchas neuronas y células gliales no teñidas, tras la observación bajo microscopía electrónica se detectan algunas de estas otras neuronas y escasas células gliales con porciones membranosas marcadas aunque en mucho menor grado. Estas observaciones se contradicen en cierto modo con los resultados bioquímicos, ya que la nNOS tienen una localización citosólica (Förstermann y col., 1991b). Por otro lado, en preparaciones cerebelares se ha detectado que más del 60% del total de la NO-sintasa se encuentra en la fracción particulada y que, en base a los resultados obtenidos mediante el uso de técnicas de ultracentrifugación en gradiente de densidad, se encuentra asociada a la fracción de retículo endoplásmico (Hecker y col., 1994). Estos últimos resultados están en concordancia con los de Hiki y col., (1992), que también han detectado una NO-sintasa insoluble en el cerebro de rata. Así pues, se apunta a que el enzima puede estar, por lo general, unido a membranas endocelulares, pudiendo pasar a la fracción soluble durante el proceso de homogenización. Por otro lado, la iNOS detectada en células microgliales activadas o en macrófagos muestran un precipitado granular de BSPT-formazán en áreas citosólicas o en vacuolas, no habiéndose detectado acumulación alguna en las membranas endocelulares (Schmidt y col., 1995; Calka y col., 1996); esta particular forma de precipitación puede indicar que no exista una tendencia del BSPT-formazán a la dislocación y el ataque artefactual de estructuras lipofílicas. Puesto que el uso de BSPT a nivel de microscopía electrónica es mucho más sensible que la reacción NADPH-d a nivel de microscopía óptica, es importante el uso de un buen control, como lo son los ratones *knockout* (Darius y col., 1995).

La hibridación *in situ* ha sido la técnica de elección de diferentes autores para el estudio de la distribución de los mRNA de la NO-sintasa en secciones de tejidos. Así, se han detectado interneuronas conteniendo nNOS-mRNA, en paralelo a la detección de la proteína, en el bulbo olfatorio del ratón (Kishimoto y col., 1993). En un estudio cuantitativo de la señal de hibridación de la NO-sintasa en las raíces dorsales de los ganglios lumbares de ratas, tras la transección del nervio ciático (Verge y col., 1992), se detectó un incremento dramático en el número de neuronas nNOS-mRNA positivas, lo cual indica que las isoformas llamadas constitutivas pueden ser inducidas tras la exposición a un estímulo de lesión. El uso de ribosondas (Endoh y col., 1994) permitió la detección de niveles bajos de NOS-mRNA en neuronas de la región hipocampal CA1, una zona en la que otros autores no detectaron marcaje mediante el empleo de otras técnicas (Dawson y col., 1991; Vincent y Kimura, 1992). El tratamiento con LPS o citoquinas da lugar a una amplia expresión de la isoforma inducible (Kröncke y col., 1995), lo que ha sido demostrado en diferentes tejidos por hibridación *in situ*, como por ejemplo en músculo liso vascular y miocitos cardiacos (Luss y col., 1995), en células de la barrera sinovial, células endoteliales y condrocitos (Sakurai y col., 1995), y en células epiteliales de los senos paranasales de humanos (Lundberg y col., 1995).

II.3.2. Localización de dianas del óxido nítrico.

Como posteriormente se describirá, el NO activa la isoforma soluble de la guanilato ciclasa (Koesling y col., 1995; Wedel y col., 1995) para generar cGMP. Por lo tanto, los sitios de acción del NO podrían demostrarse inmunocitoquímicamente mediante el uso de anticuerpos, hoy en desarrollo, contra la guanilato ciclasa soluble (GS) o contra conjugados de cGMP y sus proteínas portadoras (de Vente y col., 1990), ya que se ha demostrado que se produce un incremento considerable de cGMP-inmunoreactividad en estructuras cerebelares en respuesta a la administración de donadores de NO (de Vente y Seteinbuch, 1992; Southam y col., 1992). La principal desventaja que presenta

este método es que más del 80% del cGMP se pierde durante el procesamiento de las muestras (de Vente y Seteinbuch, 1992).

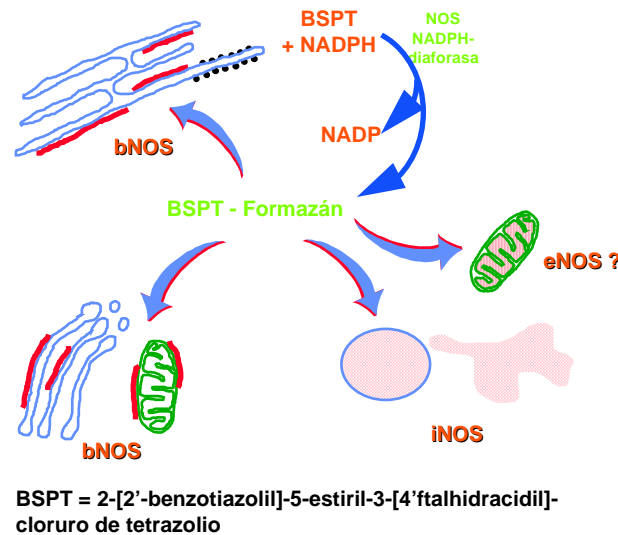


Figura II.3.4. Citoquímica de la actividad NADPH-d a nivel de microscopía electrónica. Los depósitos de BSPT-formazán debidos a la isoforma neuronal de la NO-sintasa se han encontrados asociados a distintas porciones de membranas endocelulares, principalmente en las membranas del retículo endoplásmico y en la membrana nuclear; ocasionalmente también se han detectado asociados a las membrana mitocondrial y a las del aparato de Golgi. La isoforma inducible de la NO-sintasa se localiza en el citosol o en vacuolas formando precipitados de formazan tipo granular, mientras que el producto de reacción de la isoforma endotelial parece ser que solo se localiza confinado en la matriz mitocondrial (Wolf, 1997).

Más recientemente, se han utilizado anticuerpos contra tirosina como marcadores de la formación de peroxinitritos. Los peroxinitritos se producen por la reacción del NO con aniones superóxido (Beckman y col., 1994; Kooy y col., 1995; Miller y col., 1995; Szabo y col., 1995), y estos anticuerpos detectan los residuos de nitrotirosina en las proteínas. La inmunotinción de nitrotirosinas se redujo considerablemente con el tratamiento de los animales con inhibidores de la NO-sintasa. También se detectó localización inmunocitoquímica entre nitrotirosinas e iNOS en un modelo de inflamación intestinal en el cobaya, donde los inmunomarcajes más intensos se detectaron en el epitelio y en neuronas de los ganglios mientéricos y submucosos (Miller y col., 1995). Con la producción comercial de anticuerpos antinitrotirosinas, la inmunocitoquímica de la nitrotirosilación

NO-dependiente se está convirtiendo en un campo más de estudio en la investigación del óxido nítrico.

II.3.3. Células productoras de óxido nítrico.

Las diferentes isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa pueden detectarse en casi todos los tejidos de mamíferos. La isoforma constitutiva neuronal (nNOS) fué purificada por primera vez a partir de cerebro de rata y de cerebelo porcino (Bredt y Snyder, 1990; Mayer y col., 1990). La nNOS puede localizarse en neuronas claramente reactivas que se distribuyen de modo relativamente constante en diferentes poblaciones neuronales del cerebro (Egberongbe y col., 1994; Rodrigo y col., 1994; Vincent, 1994), aunque también se han detectado pequeñas cantidades de nNOS en otras células del sistema nervioso, astrocitos y en células microgliales, por medio de la técnica histoquímica de BSPT-NADPH-d (Wolf y col., 1992, 1993, 1995; Darius y col., 1995; Calka y col., 1996) y, además, por otros métodos (Murphy y col., 1995; Gabbott y Bacon, 1996). En un principio, y en base a consideraciones teóricas, se pensó que el NO era transmisor trans-sináptico retrógrado (Garthwaite, 1991; Schuman y Madison, 1994), aunque los estudios a nivel de microscopía electrónica mediante el uso de BSPT revelaron que las áreas de marcaje NADPH-d eran principalmente presinápticas (41% en hipocampo y 38% en neocorteza) (Faber-Zuschratter y Wolf, 1994). Las terminaciones postsinápticas mostraron positividad NADPH-d solo de modo excepcional, localizándose en membranas.

Mediante el uso de técnicas inmunocitoquímicas, también se han detectado neuronas con un intenso marcaje nNOS-positivo en la médula espinal (Valtschanoff y col., 1992; Saito y col., 1994; Vizzard y col., 1994) y en el sistema nervioso periférico (ver aptdo. 2.3). Además, la nNOS ha sido localizada en tumores del SNC (Cobbs y col., 1995), músculo estriado somático y visceral (Kobzik y col., 1994; Grozdanovic y col., 1995), mastocitos (Bacci y col., 1994), células mucosas del colon (Torihashi y col., 1996), células productoras de somatostatina del estómago y del páncreas (Burrell y col., 1996), el epitelio de las

vías respiratorias del pulmón (Kobzik y col., 1993) y en el espermatozoide del cerdo (Atanassov y col., 1990), y del ratón y humano (Herrero y col., 1996, 1997). En riñón: la nNOS aparece de modo abundante en mácula densa, aunque también en otros elementos tubulares y vasculares renales (Liu y Barajas, 1993; Reid y Chiu, 1995).

La isoforma endotelial (eNOS) fue aislada, por primera vez, del endotelio de aorta bovina (Förstermann y col., 1991b; Pollock y col., 1991). Mediante el uso de anticuerpos específicos, la eNOS se ha detectado en las células endoteliales de diferentes arterias y venas de muchos tejidos (Pollock y col., 1993; Busconi y Michel, 1994; Fukuda y col., 1995; Miyawaki y col., 1995). Existen diferencias fenotípicas aparentes importantes entre las células endoteliales de vasos grandes y las de la microvasculatura y, además, entre las células endoteliales aisladas de diferentes tejidos y órganos (Balligand y col., 1995b). En las células endoteliales, además de la eNOS, también se han detectado la nNOS (Loesch y col., 1994; Thomsen y col., 1995) y la iNOS (Balligand y col., 1995b). Por otro lado, la inmunoreactividad eNOS ha sido detectada en las células epiteliales tubulares del riñón (Tracey y col., 1994); el mRNA de la eNOS se detecta con niveles elevados en los elementos vasculares del riñón de rata (Ujiie y col., 1994). La eNOS también ha sido detectada en los sincitiotroblastos de la placenta humana (Myatt y col., 1993), en miocitos cardiacos (Seki y col., 1996), células intersticiales del colon canino (Xue y col., 1994), y en neuronas del cerebro de rata, principalmente en las de formación hipocampal (Dinerman y col., 1994).

La iNOS fue aislada por primera vez de macrófagos murinos (Hevel y col., 1991; Stuehr y col., 1991) y en monocitos y macrófagos humanos (Riveros-Moreno y col., 1996), donde se expresa constitutivamente a niveles muy bajos, aunque puede inducirse de modo y localización general tras la exposición a citocinas inflamatorias (IL-1, TNF, IF- γ) o LPS (Gross y Wolin, 1995; Schoedon y col., 1995; Sparrow 1995; Shapiro y Hotchkiss, 1996). De igual modo y con caracter constitutivo, aunque también puede inducirse con LPS, la isoforma iNOS fue demostrada en las células sincitiales de la placenta de la rata (Casado y col.,

1997). Son muchos los tipos celulares que pueden expresar la iNOS bajo condiciones de inducción (Kröncke y col., 1995), habiéndose encontrado incluso en células endoteliales (Balligand y col., 1995), en neuronas (Minc-Golomb y col., 1996), y en microglía y astrocitos (Lee y col., 1993; Murphy y col., 1995; Schmidt y col., 1995; Chao y col., 1996). La iNOS puede inducirse en diferentes tipos celulares y tejidos bajo condiciones de inflamación, defensa inmune, carcinogénesis, enfermedades autoinmunes, o en procesos de rechazo en transplantes; en el riñón, la isoforma inducible está presente las células de músculo liso y células granulares de las arteriolas aferentes terminales (Tojo y col., 1994) y en los glomérulos, células mesangiales, y segmentos específicos de los túbulos (Mohaupt y col., 1994; Schultz y col., 1994). Recientemente, Moro y col., (1998) han demostrado que, en rodajas cerebrales sometidas a condiciones de isquemia, la iNOS puede expresarse en neuronas cerebrales, destacando su localización en las células piramidales de la corteza.

II.3.4. Aspectos fisiológicos y clínicos del óxido nítrico.

Existen toda una serie de excelentes revisiones sobre los mecanismos fisiológicos y patofisiológicos del óxido nítrico (Davies y col., 1995; Dawson y Dawson, 1994, 1996; Faraci y Brian, 1994; Garthwaite y Boulton, 1995; Gross y Wolin, 1995; Knowles, 1996; Moncada y col., 1991; Moncada y Higgs, 1993; Münzel y col., 1997; Peer y col., 1996; Reid y Chiu, 1995; Schuman y Madison, 1994; Szabó, 1996a,b,c; Umans y Levi, 1995; Wolf, 1997), y sobre sus posibles implicaciones clínico-terapéuticas (Böger y col., 1996; Bult, 1996; Cobb y Danner, 1996; Cooke, 1996; Cooke y Dzau, 1997; Karatinos y col., 1995; Kilbourn, 1996; Mizutani y Layon, 1996; Moncada y Higgs, 1995). A continuación solo describiremos brevemente los aspectos fisiológicos y clínicos del NO.

II.3.4.1. Implicaciones Fisiológicas.

A nivel del sistema nervioso central (SNC), el NO está implicado en la

liberación de neurotransmisores mediada por el receptor NMDA, interviene en la morfogénesis del sistema nervioso y en la plasticidad sináptica (Fig. II.3.5), e influye en la apoptosis y en el establecimiento de la organización columnar de la corteza durante el desarrollo (Dawson y col., 1994; Dawson y Snyder, 1994; Garthwaite y Boulton, 1995). También ha sido implicado en la regulación del flujo sanguíneo cerebral y en el acoplamiento flujo sanguíneo-metabolismo (Szabó, 1996b), como mediador del dolor (Meller y Gebhart, 1993) y en la tolerancia a la morfina (Kolesnikov y col., 1993). La inhibición del NO también se ha detectado que dificulta la capacidad de aprendizaje, la visión, el apetito, el comportamiento y el olfato (Davies y col., 1995). Por otro lado, existen diferentes trabajos que indican que el NO regula la liberación hormonal en el eje hipotalámico-pituitario (Garthwaite y Boulton, 1995).

El óxido nítrico derivado del endotelio está implicado en la regulación del tono de los vasos sanguíneos y en la interacción del endotelio con los diferentes elementos formes de la sangre. La estimulación de la liberación de NO se induce por muchos agonistas tanto receptor-dependientes como receptor independientes. La liberación basal se produce bajo el control de factores humorales, celulares y físicos (Moncada y col., 1991; Moncada y col., 1991; Moncada y Higgs, 1993). El NO así producido actúa de modo diferencial sobre los tejidos venosos y arteriales; se ha descrito que los tejidos venosos son los más afectados debido a la carencia de producción basal de NO por parte de las células endoteliales venosas, o dicho de otro modo, a la liberación basal de NO detectada en las arterias (Ignarro y col., 1989; Moncada y Higgs, 1993). Las células endoteliales funcionan como mecanosensores, transduciendo las fuerzas físicas producidas por el flujo sanguíneo a señales bioquímicas que median la respuesta de los vasos (Davies y Tripathi, 1993); las respuestas rápidas que se producen están mediadas, en parte, por cambios en la producción de NO (Fig.II.3.5). Así, un aumento en el flujo sanguíneo da lugar a una dilatación mediada por el NO (Macedo y Lutt 1996a). En las células de músculo liso de la arteria pulmonar, el NO actúa mediante la activación de los canales de potasio tanto dependientes de voltaje como en los dependientes de calcio, produciendo la relajación arterial (Zhao y col., 1997).

Además, Yuan y col., (1997) sugieren que entre los mecanismos implicados en la vasodilatación de la arteria pulmonar se encuentran la inhibición del aumento de calcio intracelular y el aumento en el secuestro de calcio en los reservorios intracelulares de las células de músculo liso de dicha arteria. Por otro lado, se ha propuesto que el NO producido por la células endoteliales no actúa sobre el músculo liso de los vasos de resistencia, sino que su mecanismo de actuación es de tipo presináptico sobre el sistema nervioso parasimpático de modo que suprime la liberación de norepinefrina descendiendo, por tanto, la vasoconstricción (Kvetnansky y col., 1997; Macedo y Lauth, 1994; 1996b).

El NO es uno más de los muchos tromboreguladores existentes, los cuales se definen como aquellas sustancias fisiológicas que modulan las fases tempranas de la formación de trombos sanguíneos. Así, el NO reduce la adhesión, la activación y el reclutamiento de las plaquetas hacia la superficie de las células endoteliales (Radomski y col., 1987a,b,c). Además, las plaquetas sintetizan NO, el cual regula la reactividad plaquetaria mediante un mecanismo *feedback* negativo (Radomski y col., 1990). El NO también está implicado en las interacciones de los leucocitos con la pared de los vasos, pudiendo inhibir la agregación de neutrófilos y la liberación de enzimas lisosomales producidos por estas células (Davies y col., 1995). Las implicaciones de la vía L-arginina-óxido nítrico en la fisiología renal han sido puestas de manifiesto recientemente, de modo que se ha constatado que el NO participa en la regulación hemodinámica y en la función excretora renal (Peer y col., 1996; Reid y Chiu, 1995) mediante la intervención de las tres isoformas de la NO-sintasa.

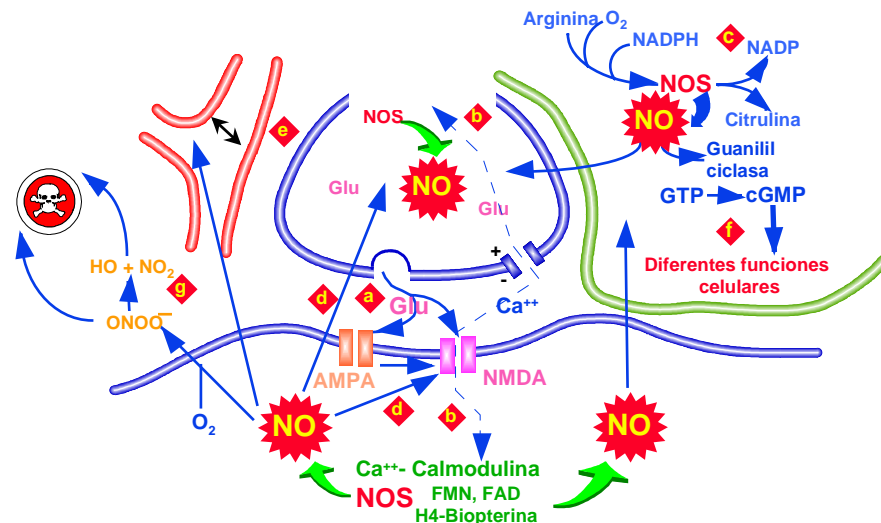


Figura II.3.5. Esquema de los efectos del NO en una sinapsis glutamérgica del sistema nervioso central. La actividad sináptica da lugar a un incremento pre- y postsináptico de los niveles de calcio via canales iónicos tanto dependientes de voltage como de transmisor (a). El calcio se une a la calmodulina y activa (b) a la isoforma neuronal de la NO-sintasa (NOS). El NO generado por la conversión de arginina a citrulina (c) modula la actividad sináptica (d), dilata a los vasos sanguíneos (e) e influye en otras muchas funciones celulares por la modificación de proteínas celulares, como por ejemplo la guanilato ciclasa (f). El NO también reacciona con radicales superóxido (O_2^-) dando lugar a peroxinitrito ($ONOO^-$) el cual, en el caso de sobreproducción patológica, puede dañar las células próximas, posiblemente iniciando una cascada citotóxica (Wolf, 1997).

Shochina y col. (1997) han examinado la localización ultraestructural de las isoformas endotelial e inducible de la NO-sintasa, y de endotelina-1 (ET-1), en las arterias coronaria y cerebral basilar de ratas con hipertensión renal, detectando un descenso en la proporción eNOS/ET-1 en la arteria coronaria, aunque no en la basilar, de los animales hipertensos, sugiriendo la intervención del sistema NO/ET (Shepherd y Vanhoutte, 1991; Rubanyil, 1993) en la circulación coronaria y cerebral durante la hipertensión renal.

Puesto que la principal fuente potencial de sobreproducción de óxido nítrico en las células de mamíferos es la iNOS, sus implicaciones funcionales serán reflejadas en el siguiente apartado.

II.3.4.2. Implicaciones patológicas del óxido nítrico.

A nivel del SNC, un aumento en la concentración del NO muestra actividad citotóxica, contribuyendo a la neurotoxicidad debida al glutamato tras la activación de los receptores NMDA en la isquemia cerebral (Szabó, 1996). Aunque en este

caso el exceso de NO es producido por la activación de la nNOS mediada por los receptores NMDA, la isoforma inducible puede ser expresada por las células gliales bajo condiciones de inflamación y en periodos isquémicos (Szabó, 1996; Moro y col., 1998), siendo esta isoforma inducible similar a la detectada en macrófagos estimulados (Riveros-Moreno y col., 1996).

Al contrario que la eNOS y la nNOS, la iNOS no está regulada por los niveles intracelulares de calcio de modo que, una vez inducida, se mantiene activada constantemente produciendo cantidades elevadas de NO (Gross y Wolin, 1995). El mecanismo de inducción de la iNOS implica la transcripción del mRNA y la biosíntesis de la proteína de novo, procesos que requieren varias horas. En la expresión de la iNOS están implicados el factor nuclear kappaB y la activación de tirosinas kinasas (Gross y Wolin, 1995). La activación prolongada de la iNOS puede requerir el restablecimiento de los niveles intracelulares de L-arginina (Schott y col., 1993), habiéndose constatado que los estímulos proinflamatorios que inducen a la iNOS también pueden estar asociados con la inducción de un sistema de transporte de membrana para la L-arginina (Schmidlin y Wieisnger, 1995).

De modo general, puede decirse que existen efectos indirectos patológicos de las elevadas concentraciones de NO, entre los que se incluye el efecto estimulador sobre las ciclooxigenasas, dando lugar al aumento en la producción de prostaglandinas (Szabó, 1996), reacción que puede estar relacionada con la interacción del NO con el centro hemo-hierro localizado en el sitio activo del enzima. Otras interacciones adicionales del NO con el centro hemo-hierro de otras enzimas incluyen la inhibición de NADH:ubiquinona reductasa, NADH:succinato oxidoreductasa, *cis*-aconitasa, y todos los grupos prostéticos Fe-S de las enzimas que los contengan; por lo general estos efectos requieren cantidades de NO muy altas y locales, cantidades que también pueden dar lugar a la autoribosilación de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, inactivando a esta enzima glicolítica (Szabó, 1996)

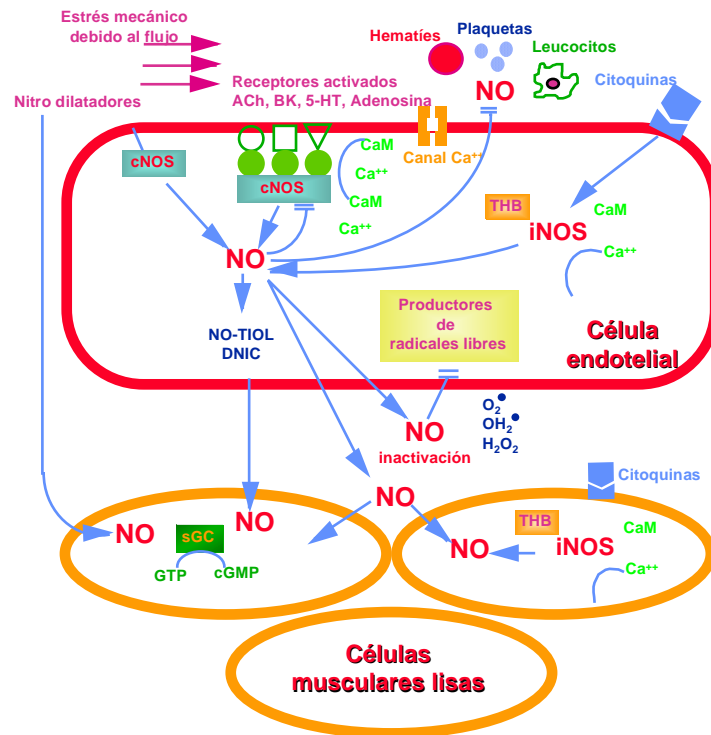


Figura 3.6. Óxido nítrico y función vascular. El NO se forma en la pared vascular tanto por la NO-sintasa constitutiva (cNOS) como por la NO-sintasa inducible (iNOS). La cNOS es activada por diferentes agonistas farmacológicos tales como la acetilcolina (ACh), la bradikinina (BK), la serotonina (5-HT) y adenosina, y por fuerzas mecánicas tales como el estrés por rozamiento y por flujo. Los agonistas farmacológicos actúan a través de proteínas G y efectores secundarios para incrementar las concentraciones de calcio intracelular. La difusión del NO procedente de las células endoteliales interfiere con la agregación de los hematíes y de las plaquetas, y la adhesión de leucocitos. El NO puede almacenarse intracelularmente como nitrosotiol (NO-TIOL) y dinotrosil hierro-cisteína (DNIC). El NO actúa sobre la guanilato ciclasa soluble (sGC) de las células musculares lisas para dar lugar a guanosina 3'-5'cíclica monofosfato (cGMP) e inducir la relajación. Los nitrodilatadores sistémicos proporcionan NO a las células endoteliales y musculares lisas. Las células endoteliales también producen varios radicales libres de oxígeno los cuales pueden ser bien capturados por el NO o bien inactivar al NO. En la sepsis y durante la respuesta inflamatoria sistémica tanto las células endoteliales como las musculares lisas pueden ser inducidas para sintetizar iNOS. CaM, calmodulina; THB, tetrahydrobiopterina; GTP, guanosina 5'-trifosfato.

Una vía citotóxica adicional es la relacionada con la generación de rupturas en hebras simples de ADN mediadas por el NO, o más bien por el peroxinitrito, con la activación subsecuente del enzima de reparación ADP ribosiltransferasa (PARS), lo que desencadena el mecanismo denominado 'la hipótesis suicida mediada por PARS' (Zhang y col., 1994, Zhang y Steiner, 1995).

En la actualidad, el dogma de que el NO presenta propiedades tóxicas *per se* está cambiando hacia la idea de que el daño relacionado con el NO puede

deberse a la generación de peroxinitrito, un oxidante tóxico que se forma in vivo a partir del NO y del superóxido de modo rápido y con difusión limitada (Crow y Beckman, 1995; Squadrito y Pryor, 1995). El peroxinitrito y/o el NO pueden conducir a la necrosis o a la apoptosis celular (Bonfoco y col., 1995; Brüne y col., 1995, 1996; Estevez y col., 1995; Mitrovic y col., 1995; Nicotera y col., 1995), de modo que parece ser que la exposición sostenida o los niveles bajos de NO o peroxinitrito pueden causar apoptosis, mientras que la exposición repentina a concentraciones elevadas de una de estas dos moléculas puede dar lugar a la muerte celular por necrosis (Bonfoco y col., 1995; Nicotera y col., 1997a,b).

Entre las implicaciones patológicas del NO en el SNC (revisado en Szabó, 1996) se encuentran el accidente cerebrovascular y los episodios epilépticos, patologías en donde los estudios aún son en cierto modo contradictorios, la inflamación aguda del SNC debidas a infecciones virales o bacterianas, donde se detecta la inducción de la iNOS con posibles implicaciones defensivas, y los desórdenes neurodegenerativos crónicos y autoinmunes, tales como la esclerosis múltiple desmielinizante crónica, la enfermedad de Alzheimer y el SIDA, enfermedades en las que el NO y el peroxinitrito pueden jugar un papel tóxico.

La vía L-arginina-óxido nítrico también está implicada en otros mecanismos patofisiológicos, como lo son las enfermedades vasculares y la arteriosclerosis (Böger y col., 1996; Bult, 1996; Umans y Levi, 1995). Puesto que se requiere una liberación basal de NO para la homeostasis de la presión sanguínea en mamíferos (Moncada y col., 1991; Moncada y Higgs, 1993), la inhibición del NO aumenta la presión arterial sistémica y los activadores del NO la disminuyen. En los episodios de hipertensión aguda inducida en modelos animales, la relajación dependiente de endotelio se pierde, probablemente debido a la presencia de radicales libres de oxígeno, pues puede ser restablecida por la administración de quelantes de radicales libres (Nakazono y col., 1991). En modelos animales de hipertensión crónica y en pacientes con hipertensión, la relajación derivada de endotelio y mediada por agonistas se reduce, así como la liberación basal de NO (Luscher y Vanhoutte, 1988). En humanos, la severidad de la elevación de la

presión sanguínea está inversamente relacionada con la magnitud de la disfunción en la relajación mediada por endotelio (Rubanyi, 1991). Las implicaciones patológicas unidas a la síntesis de NO en la aterogénesis han sido revisadas recientemente (Böger y col., 1996; Bult, 1996; Cooke y Tsao, 1997).

La disfunción endotelial se considera como un elemento intrínseco en la patogénesis de las angiopatías diabéticas, habiéndose sugerido que existe una alteración en la relajación dependiente de endotelio en los pacientes diabéticos (Rubanyi, 1991; Ruderman y Haudenschild, 1984). La presencia de concentraciones elevadas de glucosa en sangre pueden dar lugar a la glicosilación de proteínas celulares y productos finales de glicosilación que, a su vez, pueden inhibir al NO directamente y alterar la señal de transducción de las vías que estimulan la síntesis de NO (Bucala y col., 1991).

La inactivación del NO mediada por hemoglobina ha sido implicada en los espasmos vasculares cerebrales tanto en la hipoperfusión cerebral como en procesos que pueden ocurrir tras una hemorragia subaracnoidea (Faraci y Brian, 1994). Aunque el aumento en el flujo sanguíneo cerebral que ocurre tras la hipoxia no está mediado por el NO (Faraci y Brian, 1994), el NO parece ser el responsable de la vasodilatación asociada con la hipercapnia (Iadecola, 1993). En la isquemia cerebral, la concentración de NO aumenta a los pocos minutos, disminuyendo gradualmente a continuación (Dalkara y Moskowitz, 1994); en la reperfusión, los niveles de NO se elevan de nuevo (Malinski y col., 1993). En general, la relación entre los procesos de isquemia-reperfusión y la vía L-arginina-NO han sido revisados recientemente (Clemens y col., 1997; Nonami, 1997).

El NO también está implicado en la hiperplasia de la capa íntima arterial que se produce en los tratamientos angioplásticos, los cuales se llevan a cabo cuando aparecen lesiones arteriales oclusivas (Shimokawa y col., 1987, 1989), de modo que el endotelio regenerado muestra un descenso en la capacidad de vasodilatación mediada por endotelio, que a su vez resulta de la pérdida de la síntesis y liberación de NO derivado de endotelio.

Uno de los mecanismos de actuación del NO en situaciones patológicas que ha sido más estudiado es su implicación en los procesos de inflamación aguda y crónica, en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y en la sepsis (Nussler y Billiar, 1993; Cobb y Danner, 1996). Los monocitos sanguíneos periféricos, los macrófagos alveolares, las células de Kupffer y los neutrófilos, son capaces de producir NO una vez estimulados (Nathan, 1992; Riveros-Moreno y col., 1996). El NO así producido, proveniente de la combinación de las células productoras citadas incluyendo el endotelio, intensifica la respuesta de vasodilatación, la formación del edema, y la modulación de las terminaciones sensitivas cruciales en la respuesta inflamatoria. Los efectos que se detectan pueden ser prevenidos con el tratamiento con glucocorticoides, que inhiben la inducción de la iNOS, y mediante el uso de inhibidores de la NO-sintasa.

La endotoxina bacteriana, LPS, induce a la iNOS e incrementa la síntesis de NO en las células del músculo liso venoso, en cardiomiocitos y en endocardio, conduciendo a la disfunción cardíaca (Morris y Billiar, 1994). En el shock endotóxico, el aumento en la producción de NO parece estar relacionado con los niveles de hipotensión (Brady y Poole-Wilson, 1993). El shock séptico es una cascada de eventos mediados por citoquinas que da lugar a una hipoperfusión y a la disfunción de los órganos. Cuando se produce un fallo sistémico multiorgánico, se manifiesta una disfunción hepatocelular que parece ser el resultado de la producción de NO inducida por citoquinas, a través de la iNOS, las cuales son principalmente liberadas por los macrófagos y células de Kupffer (Morris y Billiar, 1994). Los macrófagos sintetizan NO, y las elevadas concentraciones del NO son las responsables de la citotoxicidad atribuida a este tipo celular frente a las células tumorales y a las bacterias (Hibbs y col., 1988; Nathan y Hibbs, 1991). Los mecanismos de citotoxicidad del NO son la interacción con los sitios de unión a hierro de las enzimas del ciclo respiratorio y de las vías de síntesis de ADN (Moncada y col., 1991; Moncada y Higgs, 1993). Además, hay que tener en cuenta que la expresión prolongada de la iNOS en macrófagos infiltrados puede tener implicaciones patológicas en el infarto de miocardio (Dudeck y col., 1994;

Curtis y Pabla, 1997) y en la diabetes mellitus tipo I (Kolb H y Kolb-Bachofen V, 1992a; Kröncke y col., 1993; Pierce y col., 1997; Wu, 1995). Por último, en la actualidad se sugiere que la inmunidad no específica está asociada con la inducción de la iNOS (Hoffman y col., 1990; Kolb y Kolb-Bachofen, 1992b; Morris y Billiar, 1994).

En la figura II.3.7 se muestran de modo esquemático las implicaciones patofisiológicas del NO.

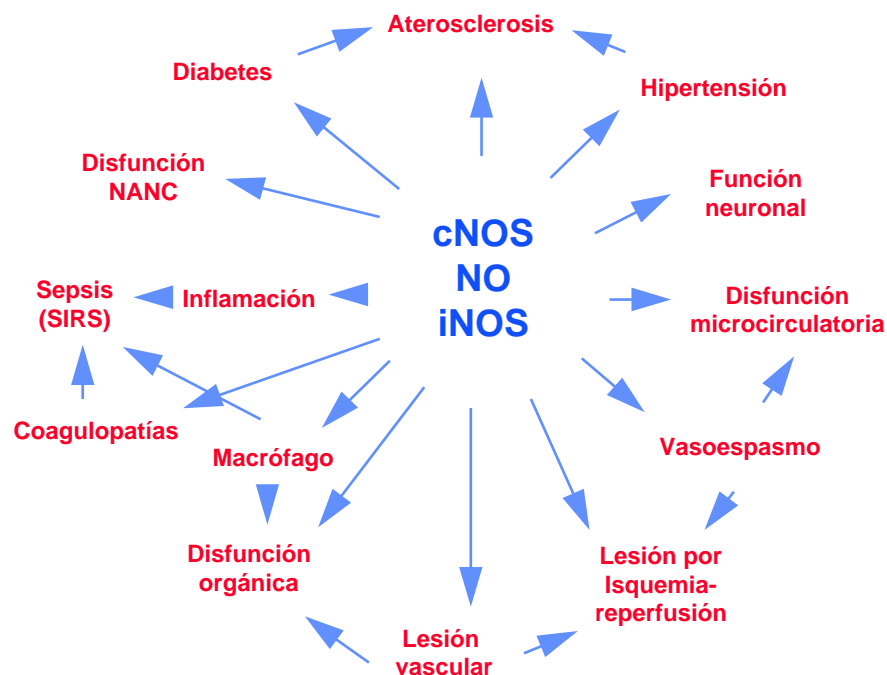


Figura II.3.7. Óxido nítrico y patologías. El NO juega un papel central en la patofisiología de las principales enfermedades cardiovasculares tales como la arterioesclerosis, la hipertensión y la diabetes, y existen muchas alteraciones clínicas que pueden estar relacionadas con la disfunción del NO, tanto por un aumento en su formación como por un descenso de la misma. cNOS, NO-sintasa constitutiva; iNOS, NO-sintasa inducible; NANC, no-adrenérgico no-colinérgico; SIRS, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Wolf, 1997).

II.3.4.3. La influencia en la vía L-arginina-NO como potencial terapéutico.

Como se ha descrito en el apartado anterior, en diferentes condiciones clínicas está implicada la producción reducida del NO. En todas aquellas situaciones en las que la generación de NO se encuentra negativamente

afectada, puede ser interesante mimetizar o intensificar su producción fisiológica. Esto puede realizarse por diferentes vías, incluyendo la administración directa de NO, el uso de compuestos donantes de NO, la estimulación de receptores ligados a la vía L-arginina-NO, el aumento de la acción del NO endógeno, o la administración de substratos adicionales para su síntesis (Moncada y Higgs, 1995). Por otro lado, la inhibición de la síntesis de NO puede ser beneficiosa, pues su sobreproducción, bien por sobreactividad de las isoformas constitutivas, bien por la inducción de la iNOS, se ha constatado en diferentes procesos patológicos. Para ello, se están utilizando inhibidores de la NOS, la inhibición de la inducción de la isoforma Ca^{2+} independiente, o la inhibición de las isoformas constitutivas (Moncada y Higgs, 1995). Por lo general, los intentos iniciales de manipular la vía L-arginina-NO están demostrando el potencial terapéutico de algunas de las intervenciones (Böger y col., 1996; Bult, 1996; Cobb y Danner, 1996; Cooke y Tsao, 1997; Karatinos y col., 1995; Kilbourn, 1996; Mizutani y Layon, 1996; Moncada y Higgs, 1995), por lo que no es de extrañar que en un futuro próximo se desarrollen medicamentos seguros y efectivos para el tratamiento de estas patologías. El principal reto se encuentra en la distinción entre las funciones fisiológicas y protectoras del NO, que deben mantenerse o intensificarse, y las patológicas, que deben eliminarse, de modo que no se produzcan efectos secundarios adversos.

II.3.4.4. Óxido Nítrico y fisiopatología vascular

Actualmente, con el descubrimiento de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), productora del óxido nítrico (NO), como potente agente vasodilatador, entre otras funciones, se crea la posibilidad de poder abordar con éxito una importante investigación que tenga como finalidad conocer el papel que el NO juega en la fisiopatología vascular.

La eNOS está expresada principalmente en las células endoteliales de los vasos, mientras que la nNOS está expresada en el SNC y SNP. (Knowles y cols.1990).

Medidas bioquímicas han demostrado que esta enzima (nNOS) está presente en altas concentraciones en el cerebelo, hipocampo, hipotálamo y cerebro medio.(Forstermann y cols.1990).

La isoforma iNOS ha sido purificada en el citosol de los macrófagos. También ha sido localizada en células cebadas, neutrófilos, hepatocitos, células musculares lisas de la pared de los vasos, en células tumorales y células endoteliales y recientemente en neuronas y células gliales del SNC. (Moro y cols.1998).

Se conoce bastante bien, tanto en el SNC como en el SNP en estudios invivo e invitro que el NO no sólo participa directamente en diversos mecanismos funcionales y protectores, sino también en numerosos procesos neurotóxicos (Sancesario y cols.1994)..

Como agente neuroprotector, al NO se le atribuyen diferentes acciones fisiológicas:

- Estimulación de la guanilatociclasa soluble para formar GMPc en la célula diana, produciendo la relajación de la pared vascular y con ello la vasodilatación y mejora del flujo sanguíneo. (Garthwaite,1998.Moncada y cols,1991. Ignarro y Murad, 1995)
- Bloqueo del incremento de calcio intracelular, mediado por el estímulo del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). (Zhang.1995).
- Inactivación mediante nitrosilación de dicho receptor.
- Por sus propiedades antioxidantes. (Hogg y cols.1993).

Como efecto neuroprotector inmediato, hemos de tener en cuenta el incremento del NO producido por las células endoteliales a partir de la eNOS justo en el momento de iniciarse la hipoxia/isquemia, en un intento de evitar el daño isquémico mediante una vasodilatación de urgencia.

De igual modo, también se conoce la participación beneficiosa y activa de la nNOS en procesos relacionados con la neurotransmisión y/o neuromodulación, en la plasticidad neuronal después de distintos tipos de injuria acontecidos en la médula espinal y en episodios de hipoxia cerebral sufrida por fetos a término en el momento del parto. (Rodrigo y cols.1998).

Como agente neurotóxico, al NO se le implica directamente en mecanismos citotóxicos e independientes de GMPc, tales como:

- Formación de radicales libres
- Nitrosilación de ácidos nucleicos
- Roturas del ADN
- Inactivación de enzimas ferrosulfurados. (Gross y Wolin, 1995).

En este sentido, la hipótesis más interesante relacionada con el efecto neurotóxico del NO es la formación de peroxinitritos (ONOO-) como consecuencia de su interacción con el anión superóxido. El peroxinitrito puede nitrar, directamente o a través de otras especies reactivas de nitrógeno (residuos de tirosina en proteínas) lo cual impide las interacciones funcionales de estos residuos y pone en peligro la vida de la célula. (Lipton y cols,1993).

En la patogenia de los procesos hipóxico-isquémicos interviene la liberación de aminoácidos excitadores (AAE), particularmente la liberación de GLUTAMATO que actúa sobre los receptores NMDA, provocando un aumento del Ca²⁺ en las células diana. (Onley y cols.1991).

“La conexión entre la liberación de AAE y la activación de la vía L-arginina-NO por el aumento del Ca²⁺ intracelular, que activa la nNOS, es la clave que justifica la hipótesis de que el incremento excesivo de formación de NO podría ser responsable de la neurotoxicidad.”

Durante la hipoxia-isquemia y por diferentes mecanismos, se produce un aumento en la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO):

$O_2^{\cdot-}$	Anion superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
OH^{\cdot}	Radical hidroxilo
RO^{\cdot}	Radical alcoxilo
ROO^{\cdot}	Radical peroxilo

- En situaciones de déficit de O_2 , el anión superóxido es producido por la microglía activada, el ácido araquidónico es liberado desde la membrana celular por la fosfolipasa A2 y se producen colateralmente hidroperóxidos lipídicos y radicales libres.
- También en estas circunstancias se da lugar a la entrada de Ca^{2+} , como consecuencia de la despolarización de las membranas, pudiéndose convertir la xantina deshidrogenasa en oxidasa, para utilizar oxígeno como receptor de electrones y liberar también el superóxido. (Halliwell.1992)
- Como otra fuente de ERO se ha descrito a la propia NOS, que en concentraciones subóptimas de L-arginina puede producir $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (anión superóxido y peróxido de hidrógeno). (Knowles y Moncada.1994)
- Por último, se admite que la disminución de la actividad de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial que se produce tras la isquemia puede llevar a la liberación de ERO. (Stone.1994).

Para todos estos procesos es necesaria la presencia de oxígeno, lo cual nos lleva a pensar que estos fenómenos se producirían si el oxígeno está disponible, a partir del período de reperfusión/reoxigenación con un tejido dañado. tras lo visto anteriormente es lógico pensar que el aumento de producción de NO Y $O_2^{\cdot-}$ durante la hipoxia-isquemia conlleva a un gran incremento en la formación de ONOO⁻.

Este anión se combina con tioles y ciertas moléculas con grupos -OH (glucosa, serina, etc) para formar moléculas que donan NO. este mecanismo se puede considerar un proceso de detoxificación activa ya que las moléculas formadas tienen propiedades citoprotectoras. por eso puede decirse que en aquellas condiciones en las que se produce un agotamiento de dichas defensas,

como es el caso del stress oxidativo causado por la producción excesiva y/o prolongada de sustancias oxidantes (incluido el propio ONOO-), las células quedan expuestas al efecto pernicioso combinado de estas especies reactivas. (moro y cols,1994).

Existen evidencias que nos sugieren que es el ONOO- el responsable de los efectos neurotóxicos del NO. (Lipton y cols.1993). Sin embargo se desconocen los mecanismos por los cuales esta molécula produce la muerte neuronal. Se propuso que su efecto podría estar relacionado con la inhibición de la cadena mitocondrial,(Bolaños y cols.1995). Sin embargo se ha demostrado recientemente que el ONOO- no afecta a la función mitocondrial, ya que es eficazmente detoxificado. Por ello, es importante estudiar los mecanismos por los cuales el ONOO- produce neurotoxicidad, lo cual permitirá además diseñar estrategias neuroprotectoras, ya no solo aumentando las defensas antioxidantes sino también pudiendo actuar a otros niveles de las secuencias fisiopatológicas.

La formación de nitrotirosina ha sido demostrada en algunos desórdenes inflamatorios, lesiones arteroescleróticas y enfermedades neurodegenerativas. Aunque la nitración de proteínas ha sido usada como índice de la producción de ONOO-, también puede darse en algunos mecanismos independientes del ONOO-. (Eiserich y cols.1998).

La nitración de proteínas puede alterar la conformación y estructura de las proteínas, su actividad catalítica y la susceptibilidad para su digestión. Se ha demostrado que la nitración de los anillos de tirosina de las proteínas puede disminuir la efectividad de las proteínas como sustrato de las tirosinquinasas. Por ello, a través de la expresión de nitrotirosina de las proteínas se puede valorar el efecto tóxico del NO.

Esto es un proceso irreversible, aunque se ha descrito recientemente una actividad desnitrasa en algunos tejidos. (Kamisaki y cols.1998).

Una vez que se produce la lesión suceden los siguientes acontecimientos:

1. Un aumento de la actividad y expresión de la eNOS a los pocos minutos de producirse la lesión, en un intento urgente de regular por medio de una vasodilatación eficaz el flujo sanguíneo cerebral. (Zhang y cols.1994)
2. Un aumento de la actividad y expresión de la isoforma nNOS que producirá un incremento de NO, contribuyendo a medio plazo al daño isquémico en el cerebro.(Rodrigo y cols,1998).
3. Un aumento en la actividad y expresión de la isoforma iNOS, que tiene lugar después de varias horas de iniciarse el estímulo hipóxico, con la producción de niveles incontrolados de NO, contribuyendo de manera decidida al progreso de la patología. (Moro y cols,1998).

Existe un gran número de modelos experimentales en los que se ha podido observar que existe una relación directa entre la carencia de O₂ y el aumento de las isoformas nNOS e iNOS, así como la formación de nitrotirosina.

Los radicales libres y particularmente el NO juegan un papel trascendental en el daño celular y tisular que tiene lugar tras procesos patológicos de diferente índole. Sin embargo aunque el estrés oxidativo originado por radicales libres (entre ellos el propio NO), se incrementa en situaciones patológicas como las comentadas, la presencia de estas especies reactivas en las células es consustancial con el desarrollo de sus actividades vitales, particularmente las derivadas del metabolismo oxidativo que las células deben realizar de forma continua en las mitocondrias para generar la energía que necesitan para vivir. (Braekman y cols,1999)

Si además se consideran otras fuentes externas, que también pueden generar radicales libres, se ha estimado que las células reciben diariamente de forma espontánea unos 10.000 impactos oxidativos que dañan moléculas tan

importantes como los lípidos de las membranas, las proteínas enzimáticas y el material genético que las constituyen. (Floyd y Carney, 1992).

Finalmente, las células dañadas irreversiblemente acaban programando su propia muerte, bien a través de mecanismos de necrosis (que normalmente ocurre durante una patología) o bien a través de mecanismos de apoptosis que es la forma fisiológica que tienen los seres vivos para eliminar células inservibles o transformadas).

Entre los radicales libres causantes de daño oxidativo caben destacar el anión superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el propio óxido nítrico (NO) y por supuesto el peroxinitrito ($ONOO^-$).

En todos los mecanismos de muerte celular desencadenados por radicales libres, el Ca^{2+} juega un papel central, ya que un aumento de sus niveles citosólicos lleva a la activación no sólo de la nNOS y eNOS como ya hemos dicho, sino también de otras enzimas como las fosfolipasas, endonucleasas y proteasas, que son responsables de la ejecución del programa de muerte celular.

En cualquier caso, las células presentan sistemas enzimáticos altamente específicos para inactivar las especies reactivas de oxígeno y reparar los daños que hayan podido causar a las células. Estos sistemas han sido denominados genéricamente como defensas antiestrés oxidativo y caben destacar las siguientes enzimas:

- Superóxido dismutasa (SOD)
- Glutation peroxidasa (GSP)
- Glutation reductasa (GOR)
- Glutation transferasa (GST)
- Catalasa (Yu,1994).

Los genes que codifican estas enzimas, así como los genes implicados en regular su expresión o modificar su función han sido denominados gerontogenes por la relación que guardan con el proceso de envejecimiento. Así por ejemplo, se sabe que los animales más longevos dentro de su especie, presentan versiones extraordinariamente eficaces de la SOD y otros enzimas detoxificantes y que por el contrario, determinadas patologías asociadas al envejecimiento precoz y patológico presentan déficit de estos sistemas. (Liu y cols, 1998).

En la actualidad es cada vez más frecuente asignar a los radicales libres una misión primordial en el mecanismo de toxicidad de diversos compuestos químicos. Los radicales libres, incluyendo las especies activas de oxígeno, se producen tanto en las condiciones fisiológicas normales como en las patológicas. En consecuencia las células desarrollan una serie de sistemas de defensa frente a su acción perniciosa. Cuando la generación de especies activas de oxígeno y radicales libres sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes defensivos, se induce una situación de estrés oxidativo que, en mayor o menor grado, puede llegar a producir lesiones celulares reversibles e irreversibles.

II.4. FISIOPATOLOGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Se suele admitir que los primeros experimentos controlados que demostraron el efecto tóxico del oxígeno sobre los organismos animales fueron realizados por Paul Bert a finales del siglo XIX. Sin embargo, Carl Wilhem Sheel ya describe por primera vez los efectos negativos del oxígeno sobre los seres vivos en 1877. Esto ocurría sólo dos años después de que Sheele y Joseph Priestley descubrieran a la vez e independientemente esta molécula. Desde el siglo XIX y durante los primeros seis decenios del siglo XX se han ido acumulando datos descriptivos sobre la letalidad y las consecuencias patológicas de la exposición animal a altas presiones parciales de oxígeno.

En los mamíferos y en el hombre existen tres órganos especialmente sensibles in vivo. Si se trata a muchos mamíferos con oxígeno puro a tensiones normobáricas se produce la muerte en períodos tan cortos como 72 horas por daño al tejido pulmonar, uno de los expuestos a tensiones de oxígeno más altas en el organismo, acompañado en las etapas finales de edema y hemorragia. (efecto Lorraine-Smith).

La utilización de concentraciones menores de oxígeno (incluso inferiores al 50%) a presión normal, puede causar ceguera irreversible en niños prematuros por daño a la retina. Si se suministra oxígeno puro, pero a presiones hiperbáricas (a más de 2-3 atmósferas), aparece una toxicidad aguda sobre el sistema nervioso (efecto Paul Bert) que se manifiesta con estados convulsivos que recuerdan a la epilepsia y que pueden dar lugar a la muerte según la dosis de exposición empleada. Hoy sabemos que el tejido nervioso es altamente sensible al oxígeno y su mayor resistencia in vivo en relación al pulmón se debe a su menor grado de hiperoxia tisular resultante de la saturación de la hemoglobina a presiones parciales del orden de sólo 100 mm de Hg.

A pesar de la gran acumulación de descripciones sobre los efectos nocivos del oxígeno a muchos niveles de observación, durante mucho tiempo se careció

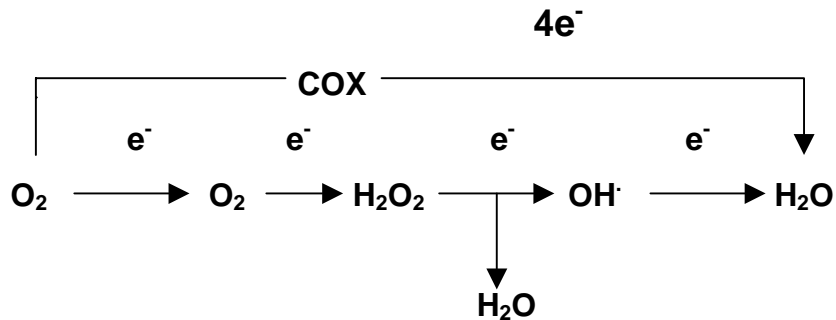
de teorías que pudiesen explicar su toxicidad. El primer mecanismo general propuesto consistió en suponer que el oxígeno inactivaba enzimas que presentaban grupos tiólicos esenciales en su forma reducida, -SH. Aunque este mecanismo se ha demostrado experimentalmente para algunas enzimas como la nitrogenasa bacteriana, la glutamato descarboxilasa, o la enzima glucolítica gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (Tjioe G,1972), está claro hoy en día que no puede explicar más que una pequeña parte de los procesos celulares alterados por el oxígeno. No deja de ser interesante, sin embargo, que uno de los principales sistemas protectores frente a este tipo de inactivación sea el tripéptido glutation, una sustancia importante en la defensa frente a los radicales libres.

II.4.1. Radicales libres

Hoy sabemos que la mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que la utilización del oxígeno por las células da lugar a la generación de radicales libres. Un radical libre es una molécula o átomo que posee un electrón desapareado en su orbital más externo. La teoría de la toxicidad del oxígeno por radicales libres fue propuesta por primera vez por la investigadora argentina Rebeca Gershman en 1954 como consecuencia de sus experimentos con O_2 hiperbárico y de las observaciones previas Ozorio de Almeida sobre la similitud de las alteraciones histológicas producidas por el oxígeno hiperbárico y por las radiaciones, ya que se sabía que estas últimas dañan en gran medida a través de la generación de radicales libres. Rebeca Gershman tuvo la habilidad de unir a estas observaciones el concepto clásico expuesto por Michaelis en 1940 “toda oxidación o reducción sólo puede producirse en pasos de oxidaciones o reducciones de carácter univalente”. Este concepto fue desechado debido en gran medida a la oposición y autoridad de Otto Warburg, quien defendía el carácter tetravalente de las oxidaciones biológicas como el que hoy sabemos que se da a nivel de la citocromo oxidasa mitocondrial. La teoría no recibió un impulso definitivo hasta el descubrimiento de la superóxido dismutasa en 1969 por Joe McCord e Irwing Fridovich, lo que ponía de manifiesto

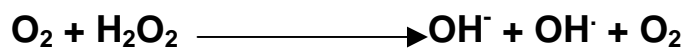
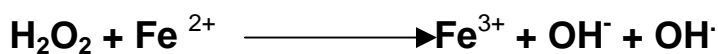
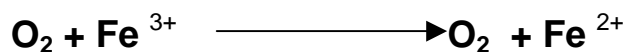
la existencia y relevancia de un radical libre (el superóxido) en las células aerobias.

O₂, VÍA UNIVALENTE



La vía univalente de reducción del oxígeno da lugar a tres formas “incompletamente reducidas” del oxígeno entre éste y el agua, el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que no es un radical pero puede generarlos y el radical hidroxilo (OH^\cdot). El radical superóxido, contrariamente a puntos de vista previos, carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas. Sin embargo, en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, la combinación del oxígeno y el peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton o Haber-Weiss da lugar a OH^\cdot .

HABER-WEISS, FENTON



El verdadero papel del O_2^- en esta reacción es el de actuar como reductor del hierro. Como se observa, el O_2^- necesita al H_2O_2 para poder producir la especie oxidante (OH^\cdot), mientras que el H_2O_2 no necesita al O_2^- para poder hacerlo. Esto, junto con la presencia del H_2O_2 en las células a concentraciones muy superiores a las del O_2^- , se convierte al peróxido de hidrógeno en una especie con gran capacidad para generar daño oxidativo a pesar de no ser un radical libre. El OH^\cdot es considerado hoy el principal indicador del ataque a todo tipo de macromoléculas, aunque existen otros iniciadores propuestos. Esta sustancia sin carga neta es una de las especies más reactivas presentes en el organismo. Su electrón desapareado puede reaccionar inespecíficamente con casi cualquier tipo de molécula a 2 o 3 diámetros moleculares de su lugar de formación. La alta reactividad del OH^\cdot impide su difusión a largas distancias a través de la célula, papel que le correspondería al H_2O_2 . Este último sería, por tanto, también responsable de la propagación del daño oxidativo entre fracciones subcelulares. Se ha demostrado generación O_2^- y H_2O_2 por parte de enzimas y mediante la autooxidación de moléculas biológicas en casi todas las fracciones celulares incluyendo la citosólica, mitocondrial, peroxisómica, microsómica así como en las membranas plasmática y nuclear. La presencia simultánea de estas dos sustancias (o solo de H_2O_2) puede generar OH^\cdot en la mayoría de los rincones celulares. La necesidad de la presencia de metales de transición en la reacción de Fenton convierte al hierro y al cobre (los más abundantes en los sistemas biológicos) en agentes esenciales como catalizadores del daño oxidativo.

Por otra parte, si al oxígeno basal (forma triplete), que es un biradical con espines paralelos, se le suministra energía suficiente, uno de sus dos electrones desapareados sufre una inversión de espín quedando ambos antiparalelos, lo que le confiere una gran reactividad (oxígeno singlete). Las reacciones oxidativas en las que interviene el oxígeno singlete se manifiestan y son cuantificables por la emisión espontánea de quimioluminiscencia de baja intensidad en todo tipo de células. La mayoría de los autores han dejado de considerar al singlete como iniciador biológico del daño oxidativo.

II.4.1.2. Fuentes de radicales libres

En los tejidos sanos la fuente principal de radicales libres son las mitocondrias. Esto se debe a que estos orgánulos son responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular y a que los radicales libres en los sistemas biológicos proceden siempre, en último término, del metabolismo del oxígeno por la vía univalente. De los cuatro complejos responsables del transporte electrónico en la cadena respiratoria, se ha observado producción de radicales libres en mitocondrias aisladas en el complejo I (Turrens JF, 1980) y en el complejo III (Boveris A, 1976). En el caso del complejo I, los candidatos más probables como generadores de radicales libres parecen ser los centros hierro-sulfurados (Herrero A, 1997), mientras que en el caso del complejo III se ha debatido intensamente sobre si podrían corresponder a la semiquinona (Boveris A, 1976) o al citocromo b (Nohl H, 1986). Entre las posibles consecuencias de esta producción mitocondrial de radicales libres se encuentran enfermedades como el Parkinson o el mismo proceso de envejecimiento, durante el cual se sabe que el daño oxidativo al ADN mitocondrial es mucho más acusado que en el núcleo y parece acumularse exponencialmente con la edad.

Cuantitativamente, la segunda fuente principal de radicales libres son los fagocitos del sistema inmune. Al encontrarse con un agente infeccioso, las células polimorfonucleares y los macrófagos experimentan un aumento muy acusado de su consumo de oxígeno llamado "estallido respiratorio". Dicho consumo ocurre principalmente en la membrana plasmática donde un complejo enzimático, la NADPH oxidasa, se activa y produce radicales de oxígeno a partir de oxígeno basal y electrones derivados de la vía de las pentosas ((Bellavite P, 1988)(Morel F, 1991). Estos radicales libres contribuyen de forma muy acusada a la destrucción o inactivación del agente infeccioso de modo directo, o por combinación con halógenos como el cloro para generar agentes extremadamente reactivos como el hipoclorito o las monocloramidas.

Aunque la producción de radicales libres por los fagocitos es útil para el organismo, en muchos procesos patológicos se produce infiltración secundaria de éstas células del sistema inmune en los órganos afectados. De este modo, se ha propuesto que el daño oxidativo durante la hiperoxia, el síndrome de isquemia-reperusión, el ejercicio, la endotoxina en el choque séptico, la esclerosis múltiple, el humo del tabaco, las fibras de asbestos u otros procesos puede deberse, en parte, a la producción excesiva de radicales libres por las células fagocíticas. Los radicales libres también están implicados en la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo que es esencial para su fagocitosis por macrófagos que los convierte en células espumosas. Dichas células intervienen en la formación de la placa arterioesclerótica en las paredes de los vasos sanguíneos, un proceso básico que estimula la aparición de enfermedades cardiovasculares.

Muchos de los procesos anteriores relacionan a los radicales libres con procesos dañinos para el organismo. De todos modos, cuando sus niveles se controlan adecuadamente, los radicales libres también intervienen en procesos útiles para el organismo. Dichos usos útiles incluyen procesos muy variados como la defensa frente a la infección, la detoxificación de xenobióticos, la reducción de ribonucleósidos, la carboxilación del glutámico, la señalización celular por óxido nítrico, la detección de la pO₂ en el cuerpo carotídeo, la modulación de segundos mensajeros como el GMP cíclico, las acciones de prostaglandinas y leucotrienos, la agregación plaquetaria, la coagulación sanguínea, el potencial de membrana etc.(Sevanian A y cols, 1990)(Henry y cols, 1975).

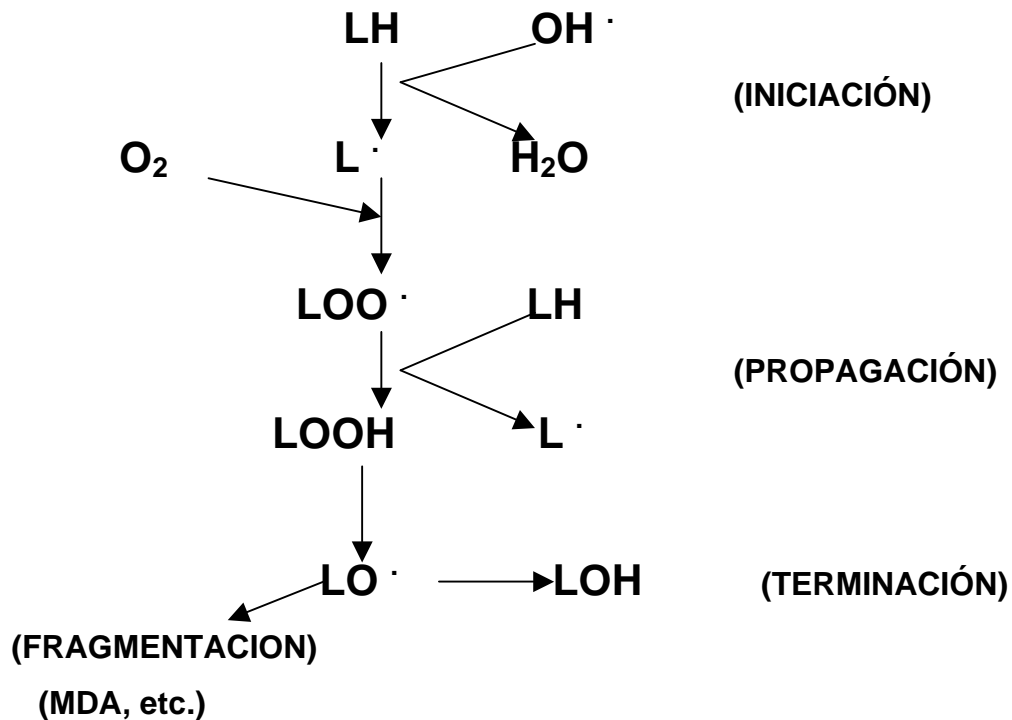
Hasta ahora se sabe que el NO interviene principalmente en dos procesos biológicos diferentes que son la comunicación intercelular y la actividad citotóxica, pero todavía existen controversias sobre los efectos biológicos, beneficiosos o perjudiciales que provoca. Así se cree que el NO posee cierto papel como *scavenger* (“barrendero”), atribuyéndosele por ello un efecto citoprotector. Sin embargo, bajo condiciones apropiadas, el NO puede formar un potente compuesto oxidante llamado peroxinitrito, con una vida media inferior a un segundo, que se descompone y genera RLO muy reactivos.

Tanto el peroxinitrito como los productos obtenidos tras su degradación, son capaces de producir peroxidación lipídica, nitrosilación de moléculas de tirosina que regulan la función enzimática y las señales de los segundos mensajeros, inactivación de canales de sodio e interacción con numerosos metales de transición.

II.4.2. Peroxidación Lipídica

Todo proceso de peroxidación de macromoléculas ocurre en tres etapas bien definidas: iniciación, propagación y terminación. En el caso más conocido y quizás más importante desde el punto de vista de la toxicidad aguda – la peroxidación lipídica – la iniciación consiste en la extracción de un electrón de un carbono contiguo a un doble enlace por parte de un iniciador como el $\text{OH}\cdot$ (Fig.3). De entre todas las macromoléculas presentes en los tejidos animales, los ácidos grasos poliinsaturados son las más sensibles al ataque por radicales libres debido a la posesión de dobles enlaces. Se forma así un radical alquil ($\text{L}\cdot$) que se convierte en peroxil ($\text{LOO}\cdot$) por acción del oxígeno y que en varias reacciones, como su reducción a hidroperóxido (LOOH), puede dar lugar a la propagación de la peroxidación al generar otro radical alquil ($\text{L}\cdot$) en el ácido graso contiguo en la membrana. La propagación explica el carácter de reacción en cadena de la peroxidación lipídica, mediante la cual una sola iniciación puede dañar un gran número de moléculas. La reacción se termina por la reacción de radicales (por ejemplo de tipo alquil) contiguos, dando lugar a puentes cruzados (L-L), o mediante la fragmentación del ácido graso en gran número de productos como el malondialdehído (el marcador más ampliamente utilizado), el 4-hidroxinoenal o alcanos que aparecen en el aire espirado (base del único método de medida no invasivo). Aunque estos procesos se han estudiado fundamentalmente con ácidos grasos insaturados y sus ésteres, parecen darse procesos análogos con otros lípidos como los esteroides. Los productos de los lípidos autooxidados son normalmente muy complejos porque se pueden formar muchas sustancias distintas con solo unas pocas reacciones básicas de propagación.

PEROXIDACION LIPÍDICA



Además, los productos de la autooxidación, los hidroperóxidos y los peróxidos cíclicos, son a su vez especies muy reactivas, lo que da lugar a la formación de productos secundarios. Parte de las investigaciones más recientes están enfocadas a aclarar la peroxidación en sistemas agregados como las LDL. En estos modelos se sabe que tanto el tamaño de partícula como la presencia de tocoferoles pueden tener una importancia capital para la cinética de la autooxidación (Porter NA y cols, 1995).

El hierro es un estimulador de la peroxidación lipídica, pudiendo participar en las reacciones de iniciación o propagación. De acuerdo con esto, la desferroxiamina es un potente inhibidor de la peroxidación lipídica estimulada por hierro. La peroxidación lipídica inducida por hierro se estimula mediante bajas concentraciones de un reductor como el ascorbato (peroxidación no enzimática), o tiene lugar con la participación de NADPH como reductor y de cadenas de transporte electrónico como la microsomal (peroxidación enzimática). La

peroxidación lipídica puede también ser estimulada por el oxígeno singlete, el ozono, o radicales halógenos. Se suelen utilizar muchas técnicas para estimar la peroxidación lipídica, como el consumo de oxígeno, la valoración de peróxidos mediante yodo o enzimas, valorando dienos conjugados, la producción de hidrocarburos volátiles en el aire espirado, la pérdida de ácidos grasos insaturados, la producción de quimioluminiscencia, la acumulación de pigmentos fluorescentes, la valoración de aldehidos o malonaldehido mediante el test del ácido tiobarbitúrico. Todos estos métodos son perfectamente válidos en modelos de peroxidación estimulada in vitro, pero tienen problemas de interferencia con sustancias no relacionadas con la peroxidación lipídica cuando se aplican a materiales biológicos in vivo. Recientemente se ha puesto en marcha la que parece ser la única técnica disponible con suficiente sensibilidad y especificidad para estudios in vivo: la medida de hidroperóxidos de fosfolípidos por detección quimioluminiscente post-columna tras separación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento-HPLC. (Miyazawa T y cols.1994)

II.4.3. Sistema respiratorio y estrés oxidativo.

La principal función del pulmón es el intercambio gaseoso. Este intercambio de oxígeno y anhídrido carbónico con la sangre se realiza por difusión simple. Este proceso se perfecciona porque el área alveolar es grande, por la proximidad íntima de los capilares de las membranas alveolares y pulmonares, y además por la carencia de fluidos en el espacio alveolar. Se piensa que esta sequedad relativa del espacio alveolar puede ser debida a la baja permeabilidad del epitelio alveolar ante la presencia de proteínas del plasma y a la habilidad de las células del epitelio alveolar para transportar los iones de sodio activamente del espacio alveolar a los espacios laterales.

La exposición prolongada de animales a concentraciones altas de gases oxidantes daña y perjudica la superficie pulmonar y el epitelio alveolar, produciéndose cantidades aumentadas de proteínas en el espacio alveolar,

atelectasia pulmonar, hipoxemia arterial, y finalmente, muerte por fracaso respiratorio.

Estas lesiones se han atribuido principalmente al aumento del espacio intracelular y a la producción extracelular de especies reactivas de oxígeno, que incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). De hecho, en la exposición in-vitro de células alveolares tipo II a varios de estos oxidantes se produce una disminución en la actividad de la acetil colina y una reducción de la actividad de la aciltransferasa del glicerol-3-fosfato, que contiene una enzima sulfhidril que cataliza una de las primeras reacciones de la biosíntesis de fosfolípidos.

La contribución exacta y precisa de estas especies reactivas de oxígeno en el animal in-vivo en el desarrollo de la lesión epitelial alveolar hoy día todavía no está perfectamente aclarada y es discutible. Mientras que el anión superóxido (O_2^-) puede ser directamente tóxico ante determinados blancos biológicos, se ha propuesto que la toxicidad in-vivo puede ser debida a su participación como agente reductor en la producción del muy reactivo radical hidroxilo ($\cdot OH$) por la reacción de Haber-Weiss, catalizada por el hierro.

El radical libre NO. provoca la relajación del endotelio vascular. Se sintetiza enzimáticamente a través de las oxido nítrico sintasas NADPH dependientes a partir de la oxidación de la L-arginina. El NO. Provoca la relajación del músculo liso activando la guanilato ciclasa soluble e inhibe la agregación plaquetaria y adherencia al endotelio, aumentando el GMPc.

Debido a las propiedades vasorelajantes del NO y su rápida inactivación en la sangre por su reacción con la hemoglobina, la inhalación de NO se ha defendido como un medio para reducir la hipertensión pulmonar y mejorar la ventilación/perfusión en una gran variedad de situaciones clínicas.

Frente a este valor terapéutico, hay evidencia que en condiciones patológicas en las que se produce un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno por las células pulmonares, la inhalación o superproducción de NO puede dañar las células alveolares y el agente de superficie pulmonar (surfactante).

Dado que el NO es un radical libre, puede sufrir una reacción radical-radical con el anión superóxido (O_2^-) para dar lugar a peroxinitrito ($ONOO^-$), que es un potente agente oxidante que inicia la conocida peroxidación lipídica de las membranas biológicas, la hidroxilación y nitración de residuos de aminoácidos aromáticos y la oxidación del grupo sulfhidrilo de las proteínas. Además el $ONOO^-$ se puede descomponer para dar lugar a dióxido de nitrógeno (NO_2^-) y otras especies reactivas reaccionando con el radical hidroxilo (OH^-) sin la necesidad de la presencia de ningún metal para la catálisis

El estímulo siguiente por las citocinas y lipopolisacáridos hace que los macrófagos alveolares y las células epiteliales produzcan grandes cantidades de NO y O_2^- en períodos prolongados, actuando como focos de producción de $ONOO^-$. Por otro lado, algunos estudios nos hacen pensar que el NO pueda disminuir el oxidante en una lesión pulmonar, reduciendo por lo tanto la inflamación pulmonar, induciendo enzimas antioxidantes y disminuyendo la peroxidación lipídica de las membranas biológicas

La regulación de la síntesis de NO es responsabilidad de mecanismos moleculares complejos y aún desconocidos en su totalidad por lo que el conocimiento de donde acaban las funciones beneficiosas del NO y cuando comienzan las funciones perjudiciales es todavía un tema no aclarado.

El descubrimiento del óxido nítrico ha modificado la comprensión del papel de las especies oxidantes y de la tensión oxidante en el pulmón.

La identificación y regulación de los genes responsables de las oxido nítrico sintasas (NOS) nos ayudarán a entender la amplia gama de manifestaciones funcionales derivadas del NO como modulador en la perfusión y en la citotoxicidad. La reacción del NO con el anión superóxido (O_2^-) es fundamental para entender el papel del NO en la tensión oxidante e inflamación pulmonar.

El NO juega un papel dual en la modificación de la lesión oxidativa, actúa como un antioxidante, inhibiendo el O_2^- (anión superóxido) mediante la peroxidación lipídica, recogiendo en el papel de basurero al alcoxilo y el radical peróxido. Sin embargo, también puede promover la lesión oxidativa de las proteínas reaccionando rápidamente con el O_2^- para formar una especie oxidante muy potente como es el peroxinitrito ($ONOO^-$).

Estos resultados, clarifican, en parte, una bibliografía confusa sobre la reactividad del NO durante la tensión oxidativa pulmonar proporcionando la evidencia que la molécula descrita tiene un papel importante y determinante.

Hay controversia acerca de si el NO se produce por las células humanas. Una evidencia es la consistente en la presencia de nitrotirosina en los pulmones de niños afectados de enfermedades inflamatorias pulmonares. La nitrotirosina es un producto de interacción de $ONOO^-$ con los residuos de tirosina de determinadas proteínas.

Estas observaciones confirman que ambos (NO y $ONOO^-$) se producen por las células del pulmón humano in vivo durante la inflamación.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El estado actual de la investigación en relación al papel del Óxido Nítrico como mediador químico en la respuesta inflamatoria aguda que se produce como consecuencia de una quemadura cutánea y/o la inhalación de humos no nos permite establecer si el óxido nítrico juega algún papel en el desarrollo de esta respuesta inflamatoria.

En virtud a este hecho enunciado, se plantea la siguiente **HIPÓTESIS:**

Dado que:

El Óxido Nítrico puede ser un mediador químico de la respuesta a la inhalación de humos y a la quemadura cutánea, sus niveles en fluidos corporales deben variar tras esas agresiones y más significativamente cuando se asocian ambas. El óxido nítrico es un radical libre y como tal, es posible que juegue un importante papel en la modulación de estos procesos inflamatorios siendo posible que se produzca una modificación de los valores medibles de éste en la respuesta frente a tales agresiones.

Una vez planteada la hipótesis de trabajo, los **OBJETIVOS** perseguidos para comprobarla son los siguientes:

- Diseñar y validar un modelo experimental de inhalación espontánea de humos en la rata.
- Analizar los valores séricos de NO tras quemadura experimental, inhalación de humos y asociación de ambas.
- Analizar los valores de NO en lavado broncoalveolar tras quemadura experimental, inhalación de humos y asociación de ambas.
- Analizar las lesiones histológicas pulmonares tras quemadura experimental, inhalación de humos y asociación de ambas.

- Estudiar la posible correlación entre las variaciones de los niveles de NO y las lesiones histológicas.

IV. MATERIAL Y METODOS.

IV.1. Modelo animal.

Para la totalidad del trabajo se ha empleado como modelo animal de experimentación la rata raza Wistar, macho, de peso comprendido entre 200 y 250 gramos. Los mencionados animales han sido estabulados, antes de ser intervenidos quirúrgicamente, en jaulas con cinco ratas cada una. Una vez realizada la intervención quirúrgica, y hasta el momento del sacrificio, eran conservadas en jaulas individuales debidamente etiquetadas.

Todos los procesos de manejo de los animales se han llevado a cabo en la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario del Aire. Dicha Unidad cumple lo dispuesto por la Directiva 86/609 del Consejo de las Comunidades Europeas de 24 de Noviembre de 1986, "relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos". En concreto, se cumplen las indicaciones reflejadas en el Anexo II de dicha Directiva en lo que respecta a Instalaciones, Condiciones ambientales y Cuidados de los animales.

Por otra parte, durante el trabajo realizado con los animales se han garantizado las condiciones dispuestas por el Real Decreto 223/1988 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, de 14 de Marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Tal como dispone dicho Decreto, se ha intentado obtener los resultados perseguidos con el menor número de animales y produciendo a los mismos el mínimo grado de dolor, sufrimiento, estrés o lesión prolongados.

Tanto antes de la manipulación experimental, como durante el tiempo de seguimiento posterior, a los animales se les permitió beber y comer libremente. El agua fue administrada por medio de biberones a los que tenían libre acceso. Por

su parte el alimento consistió en una dieta de mantenimiento administrada en forma de pienso en gránulos de 15mm (referencia A04, Panlab, s.l, Barcelona-Madrid, España)

IV.1.1. Anestesia

Una vez elegido el animal a emplear, se le somete a anestesia general. La técnica anestésica empleada consiste en la administración intraperitoneal en el cuadrante ínfero-externo de la pared abdominal de una mezcla de Ketamina (50mg/ml) y Medetomidina (1mg/ml) en la dosis de 0,3 ml de Ketamina y 0,1ml de Medetomidina por cada 200g de peso del animal. Normalmente una sola dosis es suficiente para mantener anestesiado al animal durante todo el proceso, pero si éste muestra signos de pérdida de la narcosis se pueden administrar dosis suplementarias. (Waynforth HB y Flecknell PA, 1994).

IV.2. Grupos y pasos a seguir en cada grupo.

Grupo CONTROL: 20 animales.

- 1º. Anestesia y canulación venosa.
- 2º Extracción de sangre 0 min.
- 3º Extracción de sangre a los 30 min.
- 4º Extracción de sangre a los 120 min. Y a continuación:
- 5º Lavado broncoalveolar. A continuación:
- 6º Extracción de pulmones para su procesamiento

Grupo QUEMADURA: 20 animales

- 1º Anestesia y canulación venosa.
- 2º Quemadura. Siguiendo el modelo de quemadura.
- 3º Extracción de sangre inmediatamente después. (Suero 0 min.)
- 4º Extracción de sangre a los 30 minutos de la lesión.
- 5º. Extracción de sangre a los 120 minutos de la lesión. A continuación:
- 6º. Lavado broncoalveolar. A continuación:
- 7º. Extracción de pulmones.

Grupo INHALACIÓN: 20 animales.

- 1º Anestesia y canulación venosa.
- 2º Inhalación de humo. Siguiendo el método de inhalación.
- 3º Extracción de sangre inmediatamente después. (Suero 0 min.)
- 4º Extracción de sangre a los 30 minutos de la lesión.
- 5º. Extracción de sangre a los 120 minutos de la lesión. A continuación:
- 6º. Lavado broncoalveolar. A continuación:
- 7º. Extracción de pulmones.

Grupo INHALACIÓN+QUEMADURA: 20 animales.

- 1º Anestesia y canulación venosa.
- 2º Inhalación de humo e inmediatamente después, quemadura.
- 3º Extracción de sangre inmediatamente después. (Suero 0 min.)
- 4º Extracción de sangre a los 30 minutos de la lesión.
- 5º. Extracción de sangre a los 120 minutos de la lesión. A continuación:
- 6º. Lavado broncoalveolar. A continuación:
- 7º. Extracción de pulmones.

Grupo QUEMADURA+INHALACIÓN: 20 animales.

1º. Anestesia y canulación venosa.

2º Quemadura e inmediatamente después, inhalación de humo.

3º Extracción de sangre inmediatamente después. (Suero 0 min.)

4º Extracción de sangre a los 30 minutos de la lesión.

5º. Extracción de sangre a los 120 minutos de la lesión. A continuación:

6º. Lavado broncoalveolar. A continuación:

7º. Extracción de pulmones.

IV. 3. Modelo de quemadura.

El modelo de quemadura elegido es la escaldadura por sus ventajas en la reproducción y control de datos, superior a otros modelos de quemaduras.

La lesión térmica se realiza en la zona dorsal del animal como a continuación se describe: Una vez anestesiado el animal, utilizando una rasuradora eléctrica se expone una superficie cutánea del dorso equivalente al 30% de superficie corporal total (SCQ); la rata se coloca dorsalmente en una celda de malla metálica modulable (fig.IV.1). Esta técnica es una modificación de la descrita por Walter en 1968 (Walter HL y cols, 1968). Una vez que el animal es inmovilizado con seguridad en la celda de metal, el área dorsal rasurada es sumergida durante 12 segundos en agua a 70°C.

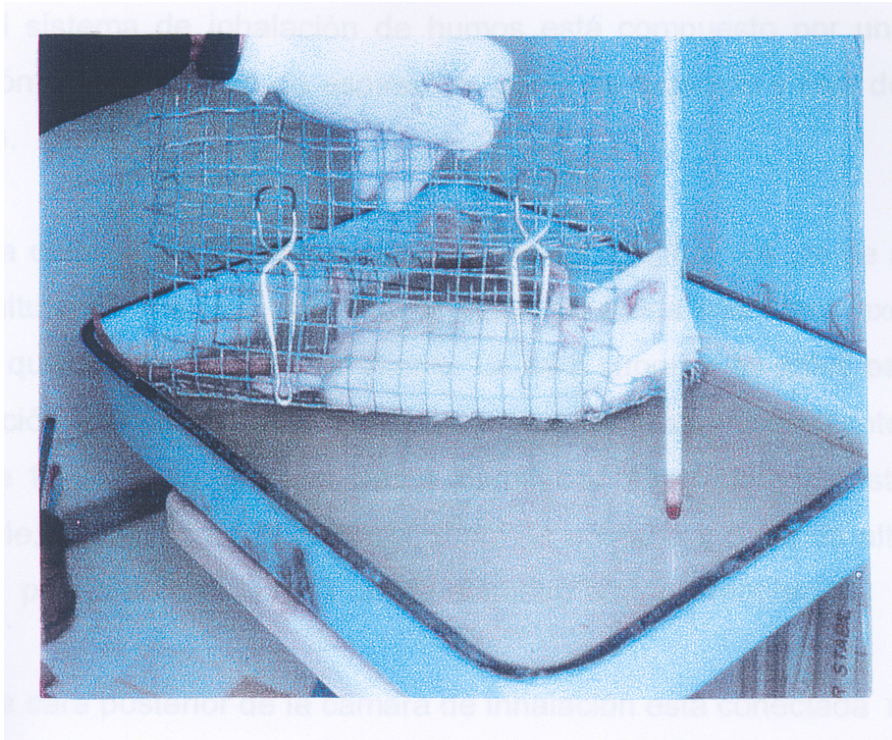


Fig. IV.1. Modelo de quemadura.

Este modelo produce una quemadura dérmica profunda en la superficie cutánea expuesta. Histológicamente, la piel quemada con esta técnica muestra los signos clásicos de necrosis epidérmica, un infiltrado perivascular difuso, y un importante nivel de degeneración del colágeno en la dermis papilar. Este tipo de lesión térmica causa en una fase inicial una masiva extravasación de líquidos que puede causar la muerte del animal por un choque hipovolémico en las primeras 6-8 horas si los líquidos perdidos no son reemplazados. Por este motivo es necesario administrar un régimen de fluidoterapia de soporte, el cual consiste en administrar 1,0 ml de NaCl (0,9%) intraperitoneal inmediatamente después de la quemadura (Zapata-Sirvent RL y cols., 1993).

IV.4. Método de inhalación.

El sistema de inhalación de humos está compuesto por una cámara de inhalación, un dispositivo de aspiración, goma de aspirado y caja de combustión (fig.IV.2).

La cámara de inhalación tiene 29 cm de longitud, 24 cm de anchura y 15 cm de altura. El material utilizado es vidrio en todas sus caras excepto la cara anterior que es una plancha de hierro. La cara superior es móvil para facilitar la introducción del animal. La cara anterior está conectada mediante un tubo de cobre de 11 cm de largo por 2 cm de diámetro a la caja de combustión, de acero inoxidable, tiene 25 cm de longitud, 9 cm de anchura y 6 cm de altura. La parte superior posee un orificio de 1 cm de diámetro para su ventilación.

La cara posterior de la cámara de inhalación está conectada mediante una goma de caucho de 30 cm de largo al dispositivo de aspirado, que realiza un vacío de 25 cm de agua, suficiente para introducir el humo de la combustión dentro de la cámara.

La inhalación es espontánea, sin intubación. El animal anestesiado, según la técnica descrita anteriormente, se introduce dentro de la cámara. El dispositivo de vacío deberá estar en funcionamiento pero con la llave de aspirado cerrada. En la caja de combustión se introducen 5 g de polivinilo. Para facilitar su combustión, el polivinilo se coloca sobre un lecho de calor compuesto de algodón y alcohol que se lleva a combustión durante 60 segundos. Transcurrido este tiempo se abre la llave de aspiración y se cerrará de nuevo a los 30 segundos. El tiempo de inhalación es de 5 minutos contabilizados desde el momento en el que se abre la llave del dispositivo de aspirado. Tras finalizar los 5 minutos se procede a extraer al animal de la cámara.



Fig. IV.2. Método de inhalación.

IV.5. Método de lavado broncoalveolar. (fig.IV.3).

El método empleado ha sido el lavado broncoalveolar (LBA) mediante traqueotomía. Éste se realiza siempre a los 120 minutos de la lesión, bien sea quemadura, inhalación o quemadura más inhalación. Se coloca la rata en decúbito supino y se realiza una incisión en la línea media desde la mandíbula hasta la parte superior del tórax incidiendo la piel previa eliminación del pelo con una rasuradora eléctrica (Primat[®] AKKU, Moser Alemania). Este proceso expone el tejido conectivo, que debe ser disecado instilando solución salina fisiológica. A continuación se profundiza en la incisión descubriéndose la capa muscular y las glándulas salivares, las cuales se retiran para localizar y aislar la traquea. Ésta se procura mantener siempre húmeda mediante una gasa impregnada en solución salina. Se realiza un corte limpio entre dos cartílagos, y se inserta un catéter intravenoso (16 Gx2") que se tendrá afianzado mediante una sutura de seda quirúrgica de 2/0, previamente sumergida en solución salina durante 5

minutos. Durante todo el proceso se deben cuidar al máximo los riesgos de contaminación, tomando para ello las debidas medidas de asepsia.

La adaptación de la cánula se ha procurado que sea perfecta para evitar la posible pérdida de líquido de lavado. A través de ésta se instila muy lentamente con una jeringa de plástico una solución salina isotónica estéril a temperatura ambiente en fracciones sucesivas de 3 ml, hasta introducir un total de 9 ml. Treinta segundos después de cada instilación el líquido introducido es recogido, para ello la rata se gira 180°, colocándola en posición vertical. Se obtienen dos tipos de muestras:

- a) el tubo 0 que es solución salina procedente de la primera instilación.
- b) los tubos 1 y 2 que contienen solución salina procedente de la segunda y tercera instilación.

A continuación se cuantifica el volumen total recogido en el tubo 0 y en el tubo 1 + 2 (el tubo 1 y el tubo 2 lo unimos obteniendo el tubo 1 + 2). Entre un lavado y otro no transcurre un tiempo superior a 6 segundos. Los tubos utilizados son de plástico estéril (poliestireno), para reducir al mínimo la pérdida de macrófagos por adherencia a las paredes. Estos tubos se disponen inmediatamente en hielo y se traslada a la mayor brevedad posible al laboratorio para su procesamiento.

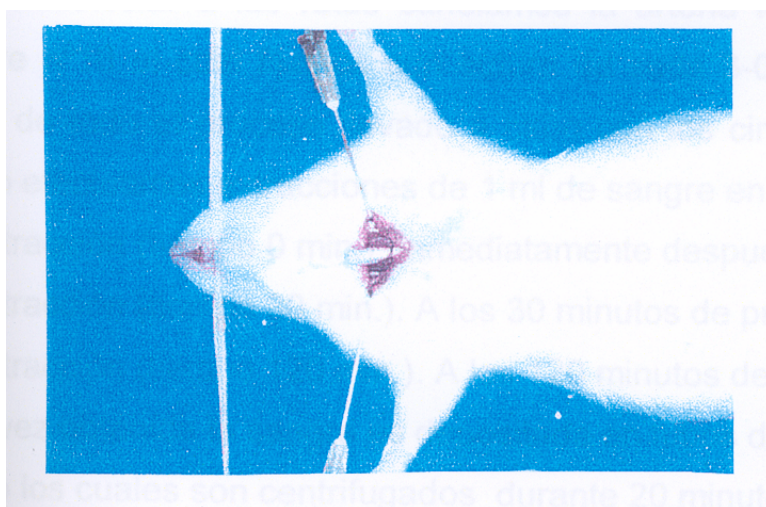


Fig IV.3. Lavado broncoalveolar

IV.6. Método de cuantificación de NO en LBA

Las dos fracciones del líquido de lavado Fo y F1+2, recogidas en dos tubos separados son procesadas de la siguiente forma para determinar la cantidad de óxido nítrico en nanomoles/ml:

Se determina como contenido de nitrito más nitrato ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) mediante la reacción de Griess (Green L.C., y cols. 1982). Para ello, las muestras se desproteinizan por adición de ácido sulfosalicílico, y se incuban durante 30 minutos a 4°C. Tras centrifugación durante 20 minutos a 12.000 x g, se separa el sobrenadante, que se incuba en presencia de nitrato-reductasa para la reducción de nitrato a nitrito (Drapier J.C., Hibbs J. 1988). A continuación se añade el reactivo de Griess a todas las muestras, y se mide su absorbancia a 546 nm, utilizando una solución de NaNO_2 como estándar.

IV.7. Método de cuantificación de NO en suero sanguíneo

IV.7.1. Extracción de sangre.

La extracción de sangre para la obtención de suero sanguíneo y la posterior determinación de óxido nítrico se realiza de la siguiente manera:

Tras anestesiar a las ratas canulamos la arteria femoral con un venocath de calibre nº18 el cual fijamos con sutura de seda 3-0 al tejido subcutáneo y a lo largo de todo el proceso llevado a cabo con los cinco grupos de 20 ratas cada grupo efectuamos extracciones de 1 ml de sangre en los siguientes tiempos:

1ª extracción (tiempo 0 min.). Inmediatamente después de producida la lesión.

2ª extracción (tiempo 30 min.). A los 30 minutos de producida la lesión.

3ª extracción (tiempo 120 min.). A los 120 minutos de producida la lesión.

Una vez obtenida la sangre es depositada en tubos de vacío con gel separador de suero los cuales son centrifugados durante 20 minutos a 1200xg. A continuación se separa el suero el cual conservamos en congelación a -80°C hasta su procesamiento.

IV.7.2. Determinación de óxido nítrico

Para determinar óxido nítrico en estas fracciones de suero obtenidas se emplea el procedimiento expuesto en el punto IV.6

IV.8. Método de procesamiento de las muestras pulmonares y valoración de las lesiones

Tras finalizar el lavado broncoalveolar, se procede a la apertura de la cavidad torácica. Para ello se realiza una incisión transversal en el abdomen al nivel o por debajo del apéndice xifoides, la cual debe de coincidir internamente con la inserción del diafragma en la arcada costal.

Después de llevar a cabo una ligera tracción del apéndice xifoides, que pone al descubierto las vísceras abdominales y diafragma, se procede a seccionar la inserción de éste a la arcada costal. Rápidamente se practican dos incisiones laterales del peto torácico, con tracción del mismo hacia arriba y en dirección a la cabeza del animal. De esta manera quedan al descubierto los pulmones los cuales se extraen y se toman dos tipos de muestras de los distintos lóbulos pulmonares. Unas de ellas se conservan en botes de biopsia con una solución de formol al 10% para realizar el estudio anatomopatológico y otras se introducen en una solución de PBS, conservándose en refrigeración para posteriormente realizar microscopía confocal. Tanto unas muestras como otras son representativas y equivalentes.

Procesamiento de las muestras pulmonares para anatomía patológica

Las muestras obtenidas de los pulmones y que habían sido conservadas en formol, son incluidas en bloques de parafina realizándose cortes de 5 micras de grosor. A continuación se procede a la tinción con la técnica de hematoxilina-eosina y una vez obtenidas las preparaciones son estudiadas con microscopía óptica.

Tinción hematoxilina-eosina:

1º. Xilol. 2 minutos.	9º. Eosina. 1 minuto.
2º. Xilol. 1 minuto	10º. Alcohol 96º. 30 segundos.
3º. Alcohol 99º. 30 segundos.	11º. Alcohol 96º. 30 segundos.
4º. Alcohol 96º. 30 segundos.	12º. Alcohol 99º. 30 segundos.
5º. Hematoxilina. 3 minutos.	13º. Alcohol 99º. 30 segundos.
6º. Agua. 30 segundos.	14º. Xilol. 1 minuto.
7º. Agua. 30 segundos.	15º. Xilol. 1 minuto.
8º. Agua. 30 segundos.	

Una vez teñidas y montadas, las muestras fueron observadas con microscopio óptico por un patólogo, estableciendo la presencia o ausencia de las siguientes variables en los distintos grupos de ratas:

- Edema peribronquial en grandes vías.
- Edema perivascular en grandes vías.
- Inflamación peribronquial.
- Congestión en parénquima distal.
- Edema en parénquima distal.
- Atelectasia en parénquima distal.
- Enfisema en parénquima distal.

Procesamiento de las muestras pulmonares para microscopía con focal:

Los muestras pulmonares sumergidas en PBS para su conservación fueron procesadas de la siguiente forma: Primero fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 4 horas. Después se lavaron 4 veces en PBS y se obtuvieron distintas muestras de, aproximadamente, 500 micras. Los fragmentos se tiñeron con IP (para detectar los ácidos nucleicos de las células, es decir, como tinción basal del tejido) y con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) para detectar células con gran cantidad de proteínas y las proteínas de la lámina basal. Una vez teñidos los cortes, se visualizaron en un microscopio confocal MRC 1024 (Bio-Rad, Hemsptead, UK), equipado con dos láseres (Ar y He-Ne). Se adquirieron imágenes de las dos fluorescencias en el eje Z y se procedió, posteriormente, a su procesamiento mediante el programa Laserssharp (Bio-Rad).

Microscopía Confocal.- La característica esencial de un sistema de imagen confocal es que la zona de iluminación y la de detección están siempre confinadas en un mismo punto del espécimen en cualquier momento. Si el punto es tan pequeño que sus límites están impuestos por la difracción, la resolución conseguida en este caso es mayor que la obtenida en un sistema convencional. La resolución lateral puede acercarse al máximo teórico incrementando 1.3 veces la resolución convencional. Sin embargo, la propiedad fundamental y distintiva de la imagen confocal es que sólo lo que está enfocado es detectado. Las áreas de la muestra fuera de foco aparecen negras, y no contribuyen a la formación de la imagen.

IV.9. Método estadístico

Se elaboró una ficha de recogida de datos para cada animal que incluía las siguientes variables:

GRUPO DE RATAS:

Número de caso:

VALORES DE ÓXIDO NÍTRICO OBTENIDOS (nmoles/ml)

- **Lavado broncoalveolar**

Fracción Fo:

Fracción F1+2:

- **Suero sanguíneo**

0 minutos:

30 minutos:

120 minutos:

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Edema peribronquial en grandes vías

Edema perivascular en grandes vías

Inflamación peribronquial

Congestión en parénquima distal

Edema en parénquima distal

Enfisema en parénquima distal

Atelectasia en parénquima distal.

MICROSCOPIA CONFOCAL

El análisis descriptivo se ha realizado utilizando los estadísticos básicos de centralización y dispersión en las variables cuantitativas y la distribución de frecuencias para las variables cualitativas.

En la comparación de medias se ha utilizado la prueba de Student-Fisher en el caso de variables independientes binarias y el Análisis de la Varianza si se trataba de variables con más de dos categorías realizando igualmente las pruebas post hoc necesarias para la comparación entre las diferentes medias. En aquellas situaciones en que las variables no se ajustaban a la distribución normal según la prueba de Kolmogoroff Smirnov se han utilizado las pruebas no paramétricas adecuadas.

Para estudiar la asociación entre dos variables cuantitativas se han calculado los coeficientes de correlación de Pearson o la Tau de Kendall según las características de las variables analizadas.

En todos los análisis estadísticos se han considerado significativos valores de $p < 0,05$. El procesamiento estadístico de los datos se ha realizado mediante el programa informático SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 7.5 para Windows.

V.1. Valores de óxido nítrico en las fracciones del lavado broncoalveolar .

En las siguientes tablas se representan los valores medios de NO (nanomoles/ml.) obtenidos en el lavado broncoalveolar en los distintos grupos de ratas.

	C	Q	I	I + Q	Q + I
Nº RATAS	20	20	20	20	20
MEDIA (x)	35,50	50,85	73,31	26,34	7,99
DESVIACIÓN TÍPICA (Φ)	15,07	23,40	36,54	19,68	3,49

C: grupo control.

Q: grupo quemadura.

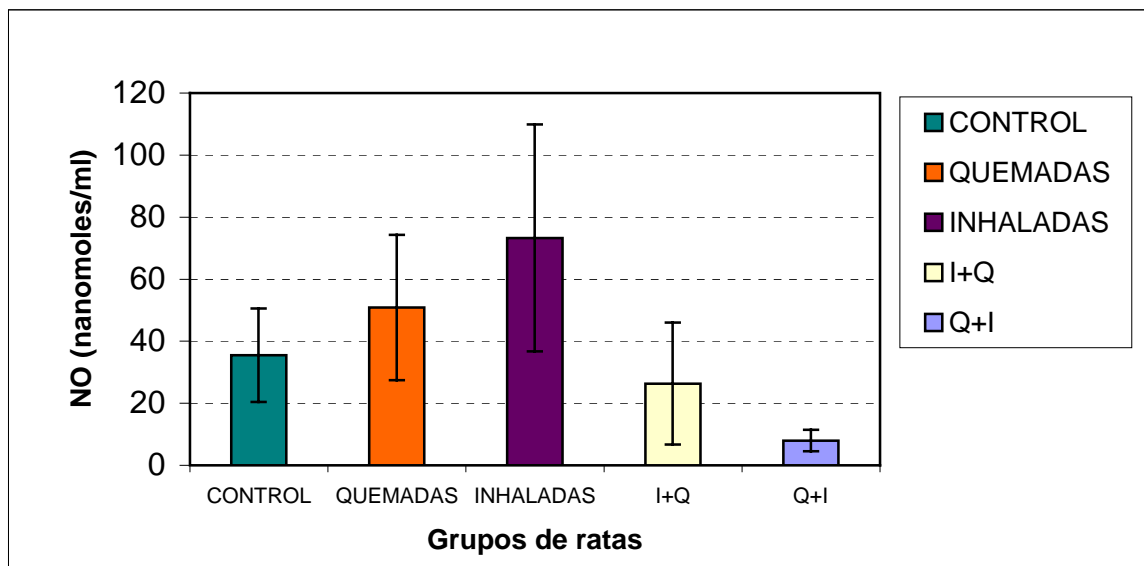
I: grupo inhalación.

I+Q: grupo inhalación-quemadura.

Q+I: grupo quemadura-inhalación.

Tabla V.1. Valores medios de NO (nmoles/ml) en fracción Fo en LBA en los distintos grupos de ratas.

Se puede observar cómo la media de los valores de NO es mayor en el grupo quemadura y aún más en el grupo de ratas inhaladas, siendo menor en el grupo inhalación-quemadura y aún menor en el grupo de ratas quemadas e inhaladas.



Gráfica V.1. Comparación de los valores de NO (nmoles/ml) en la fracción Fo del LBA en los distintos grupos de ratas.

Con referencia al grupo control el valor de NO es mayor de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el grupo de ratas inhaladas. Un valor menor de NO estadísticamente significativo ($p < 0,05$) se produce en el grupo de ratas quemadas e inhaladas.

Con respecto al grupo de ratas quemadas obtenemos un valor de NO menor y de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los grupos de ratas inhaladas-quemadas y quemadas-inhaladas.

Con relación al grupo de ratas inhaladas el valor medio de NO es menor de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los grupos de ratas control, inhaladas-quemadas y quemadas-inhaladas.

Al comparar la media del valor de NO del grupo de ratas inhaladas-quemadas con los otros grupos hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación a todos los grupos excepto con el grupo control.

Finalmente, comparando el valor medio de NO en el grupo de ratas quemadas e inhaladas con los otros grupos, hay diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con relación a todos los grupos.

	C	Q	I	I + Q	Q + I
Nº RATAS	20	20	20	20	20
MEDIA (\bar{x})	45,29	33,90	41,22	22,23	6,83
DESVIACIÓN TÍPICA (Φ)	16,60	13,01	14,34	9,42	2,32

C: grupo control

Q: grupo quemadura

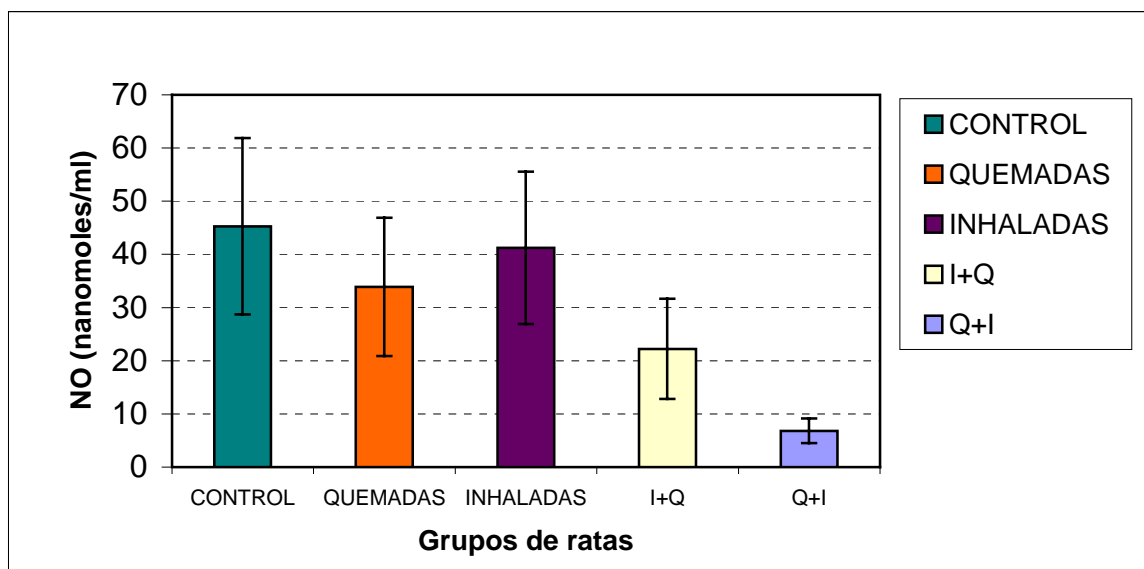
I: grupo inhalación

I+Q: grupo inhalación-quemadura

Q+I: grupo quemadura-inhalación.

Tabla V.2. Valores medios de NO (nmoles/ml) en la fracción F1+2 en el LBA en los distintos grupos de ratas.

En la tabla V.2 se puede observar como la media de los valores de NO en la fracción F1+2 del LBA es menor en todos los grupos con relación al grupo control.



Gráfica V.2. Comparación de los valores de NO (nmoles/ml) en la fracción F1+2 del LBA en los distintos grupos de ratas.

El grupo de ratas quemadas y los grupos de ratas inhaladas-quemadas y quemadas-inhaladas presentan valores de NO menores que el grupo control existiendo diferencia estadísticamente significativa.

Con respecto al grupo de ratas quemadas, hay también un valor medio de NO menor estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en los grupos de ratas inhaladas-quemadas y quemadas-inhaladas.

El valor medio del NO en el grupo de ratas inhaladas es mayor de forma estadísticamente significativa con relación a los grupos de ratas inhaladas-quemadas y quemadas-inhaladas.

Finalmente, el valor medio de NO en los grupos de ratas inhaladas-quemadas y quemadas-inhaladas es menor y estadísticamente significativo

($p < 0,05$) en relación al resto de grupos, salvo en el caso del grupo de ratas inhaladas-quemadas en el que el valor del NO es superior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al valor medio del NO en el grupo de ratas quemadas e inhaladas.

V.2. Valores de óxido nítrico en suero sanguíneo.

En las siguientes tablas se representan los valores medios de NO (nanomoles/ml), obtenidos en suero sanguíneo en los distintos grupos de ratas y en los distintos tiempos de obtención.

	C	Q	I	I + Q	Q + I
Nº RATAS	20	20	20	20	20
MEDIA (\bar{x})	54,70	39,96	163,79	108,34	9,42
DESVIACIÓN TÍPICA (Φ)	18,12	17,49	82,09	29,24	7,07

C: grupo control.

Q: grupo quemadura.

I: grupo inhalación.

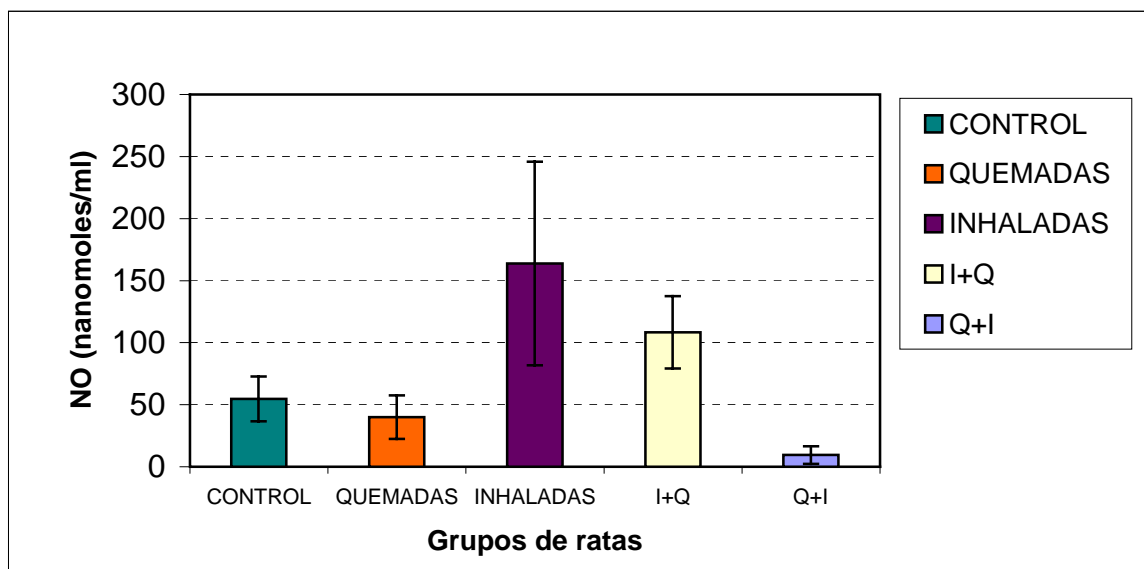
I+Q: grupo inhalación-quemadura.

Q+I: grupo quemadura-inhalación.

Tabla V.3. Valores medios de NO (nmoles/ml) en suero sanguíneo de ratas en condiciones basales.

El valor medio de NO en el suero sanguíneo de los grupos de ratas en condiciones basales (extracción de sangre inmediata una vez producida la lesión)

es mayor en los grupos de ratas inhaladas e inhaladas-quemadas y menor en los grupos de ratas quemadas y quemadas -inhaladas.



Gráfica V.3. Comparación de los valores de NO (nmoles/ml) en el suero sanguíneo inmediatamente después de haber sido producida la lesión en los distintos grupos de ratas.

El valor medio del NO en los grupos de ratas inhaladas e inhaladas-quemadas es mayor de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con relación al grupo control y el valor de la media de NO es menor de forma estadísticamente significativa en el grupo de ratas quemadas-inhaladas con respecto al control.

El valor del NO en el grupo de ratas quemadas es inferior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con relación a los grupos de ratas inhaladas e inhaladas-quemadas y mayor de forma estadísticamente significativa al valor de la media del NO en el grupo de ratas quemadas-inhaladas.

En el grupo de ratas inhaladas el valor medio del NO es superior con una $p < 0,05$ con respecto a todos los demás grupos excepto con relación al grupo de ratas inhaladas-quemadas.

Con el grupo de ratas inhaladas-quemadas sucede lo mismo excepto con relación al grupo de ratas inhaladas.

Finalmente, el valor de la media de NO en el grupo de ratas quemadas-inhaladas es inferior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al valor del NO en el resto de grupos.

	C	Q	I	I + Q	Q + I
Nº RATAS	20	20	20	20	20
MEDIA (\bar{x})	54,70	51,59	277,84	107,03	12,44
DESVIACIÓN TÍPICA (Φ)	18,12	19,23	213,16	32,34	7,25

C: grupo control.

Q: grupo quemadura.

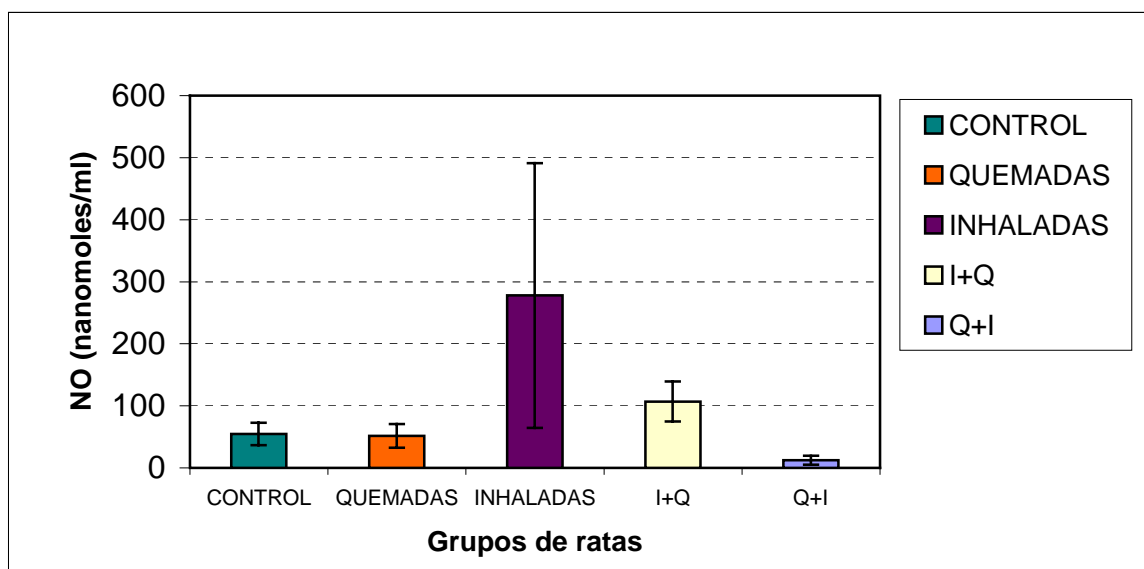
I: grupo inhalación

I+Q: grupo inhalación-quemadura.

Q+I: grupo quemadura-inhalación.

Tabla V.4. Valores medios de NO (nmoles/ml) en suero sanguíneo de ratas a los treinta minutos de producida la lesión.

En la tabla podemos ver que el valor del NO es mayor en los grupos de ratas inhaladas e inhaladas-quemadas, siendo inferior en los otros dos grupos con respecto al valor del NO en el grupo control.



Gráfica V.4. Comparación de los valores de NO (nmoles/ml) en el suero sanguíneo a los 30 minutos de producida la lesión en los distintos grupos de ratas.

Con relación al grupo control hay un mayor valor medio de NO estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en los grupos de ratas inhaladas e inhaladas-quemadas y un menor valor estadísticamente significativo en el grupo de ratas quemadas-inhaladas.

El grupo de ratas quemadas presenta un valor medio de NO superior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al del grupo de ratas quemadas-inhaladas e inferior y estadísticamente significativo al valor medio en los grupos de ratas inhaladas e inhaladas-quemadas.

El grupo de ratas inhaladas tiene un valor medio de NO que es superior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al resto de grupos.

Lo mismo sucede con el grupo de ratas inhaladas-quemadas, en el que el valor medio de NO es superior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al resto de grupos excepto con relación al grupo de ratas inhaladas que es inferior de forma estadísticamente significativa, con una $p < 0,05$.

El valor del NO en el grupo de ratas quemadas-inhaladas es inferior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al resto de grupos.

	C	Q	I	I + Q	Q + I
Nº RATAS	20	20	20	20	20
MEDIA (x)	54,70	78,78	166,00	94,67	8,74
DESVIACIÓN TÍPICA (Φ)	18,12	32,33	47,33	46,28	9,25

C: grupo control.

Q: grupo quemadura.

I: grupo inhalación.

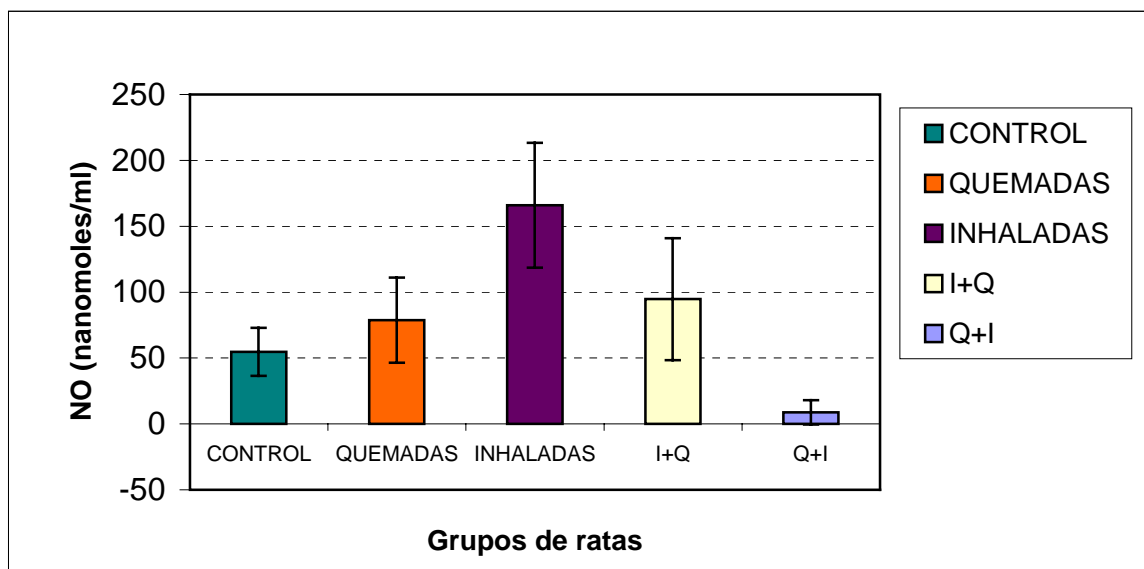
I+Q: grupo inhalación-quemadura.

Q+I: grupo quemadura-inhalación.

Tabla.V.5. Valores medios de NO (nmoles/ml) en suero sanguíneo de ratas a los ciento veinte minutos de producida la lesión.

En la tabla V.5. vemos que el valor del NO es mayor en los grupos de ratas inhaladas e inhaladas-quemadas, siendo algo menor en los grupos de ratas

quemadas y grupo control y mucho menor en el grupo de ratas quemadas-inhaladas.



Gráfica V.5. Comparación de los valores de NO (nmoles/ml) en el suero sanguíneo en los distintos grupos de ratas a los 120 minutos después de producir la lesión.

Con relación al grupo control, el valor medio del NO es mayor de forma estadísticamente significativa en los grupos de ratas inhaladas e inhaladas-quemadas y menor de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el grupo de ratas quemadas-inhaladas.

En el grupo de ratas quemadas, el valor medio del NO es inferior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al del grupo de ratas inhaladas y superior con una $p < 0,05$ al del grupo de ratas quemadas-inhaladas.

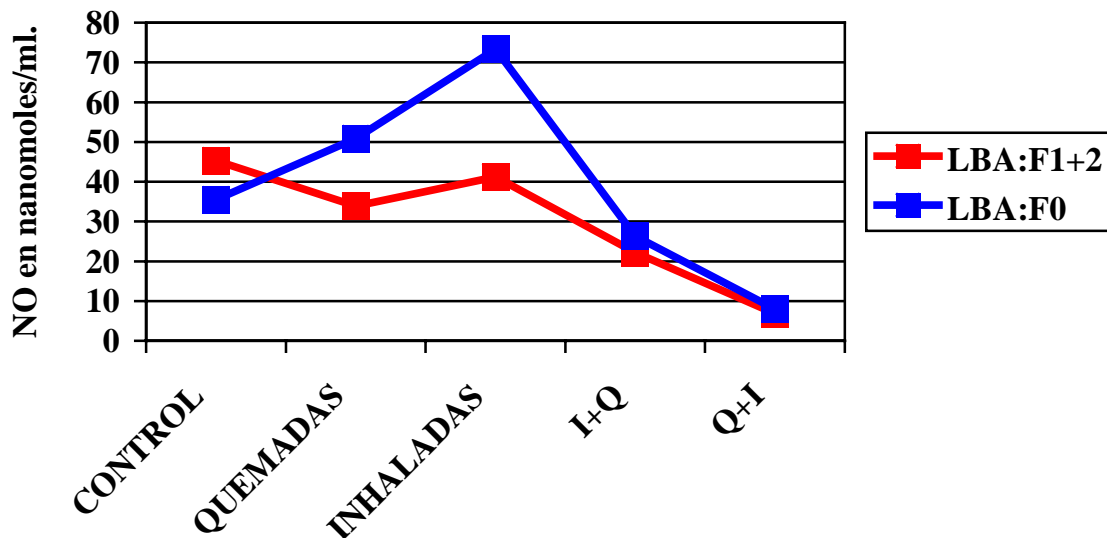
El valor del NO en el grupo de ratas inhaladas es superior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al valor medio en el resto de grupos e igual

sucede pero al contrario con el grupo de ratas quemadas e inhaladas en el que el valor medio del NO es inferior de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al del resto de grupos.

Finalmente, el grupo de ratas inhaladas-quemadas presenta un valor medio de NO que es superior y estadísticamente significativo ($p < 0,05$) al del resto de grupos excepto el grupo de ratas quemadas.

V.3. Correlación de los valores de NO en LBA y en suero sanguíneo en los distintos grupos de ratas.

En las siguientes gráficas están representados de forma lineal los valores medios de NO (nmoles/ml) obtenidos en el LBA (gráfica V.6) y en suero sanguíneo (gráfica V.7) en los distintos grupos de ratas

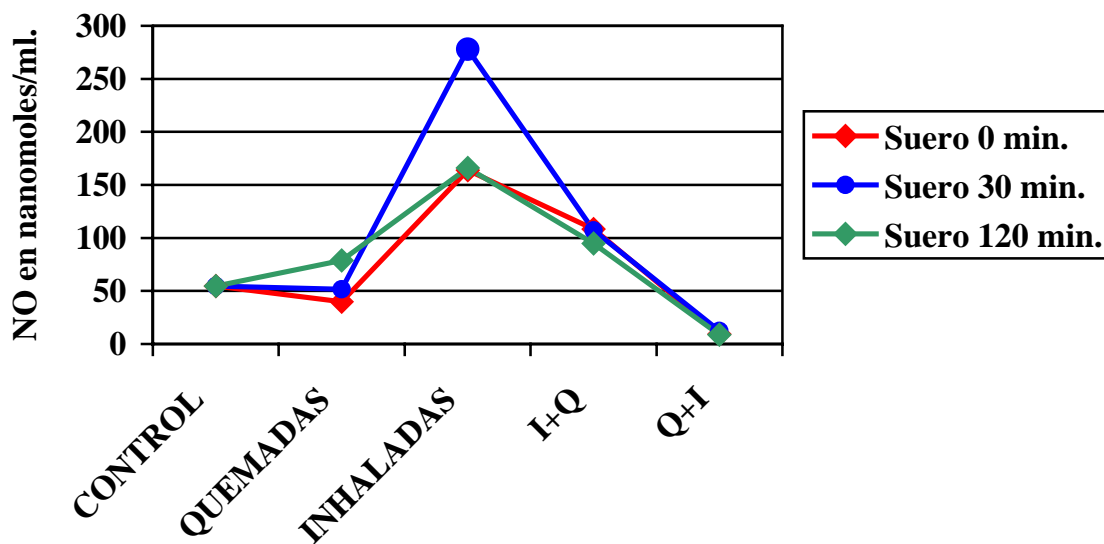


Gráfica V.6. Representación gráfica de los valores medios de NO (nmoles/ml) en las fracciones F0 y F1+2 en el lavado broncoalveolar en los distintos grupos de ratas

En la primera fracción del LBA (F0) y con respecto al grupo control, el valor medio del NO (nmoles/ml) en el grupo de ratas quemadas es mayor, teniendo un valor aún mayor en el grupo de ratas inhaladas.

El valor del NO (nmoles/ml) con relación al grupo control en el grupo de ratas inhaladas-quemadas es menor y todavía menor en el grupo de ratas quemadas-inhaladas.

En la segunda fracción del LBA (F1+2) se obtiene un menor valor de NO (nmoles/ml) con respecto al control en todos los grupos y con el siguiente orden: 1º:Grupo de ratas inhaladas, 2º:Grupo de ratas quemadas, 3º:Grupo de ratas inhaladas-quemadas y 4º:Grupo de ratas quemadas-inhaladas.



Gráfica V.7. Representación gráfica de los valores medios de NO (nmoles/ml) en suero sanguíneo en los distintos tiempos una vez producida la lesión en los distintos grupos de ratas.

El valor medio de NO (nmoles/ml) con respecto al grupo control en el grupo de ratas quemadas es menor en el suero obtenido inmediatamente después de producida la lesión y a los 30 minutos, siendo ligeramente superior a los 120 minutos. En el grupo de ratas inhaladas el valor de la media de NO (nmoles/ml) con respecto al control es muy superior en todos los suero sanguíneos obtenidos, teniendo el valor máximo en el suero obtenido a los 30 minutos de producida la lesión.

En el grupo de ratas inhaladas-quemadas el valor medio del NO (nmoles/ml) es mayor que en el grupo control en todos los sueros y en los distintos tiempos.

En el grupo de ratas quemadas-inhaladas el valor medio del NO (nmoles/ml) es menor que en el grupo control en todos los sueros y en los distintos tiempos.

V.4. Resultados de histología pulmonar en los distintos grupos.

Para valorar histológicamente las lesiones agudas provocadas se analizaron las siguientes variables en todos los pulmones de las ratas pertenecientes a los distintos grupos:

Edema peribronquial en grandes vías

Edema perivascular en grandes vías

Inflamación peribronquial

Congestión en parénquima distal.

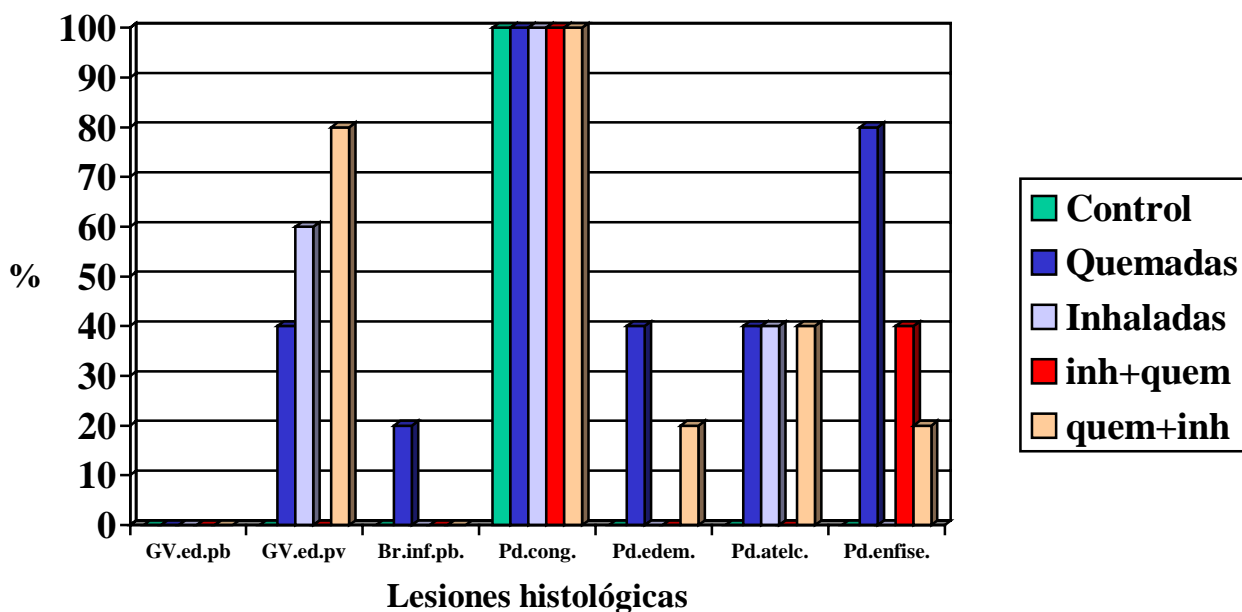
Edema en parénquima distal.

Atelectasia en parénquima distal.

Enfisema en parénquima distal.

Como resultado del estudio de estas variables observamos (gráfica V.7.) que el grupo de ratas inhaladas presenta como resultados estadísticamente significativos un edema perivascular en grandes vías (figura V.3), congestión en el parénquima distal (figura V.2) y atelectasia en parénquima distal (figura V.1).

Histológicamente si a la lesión respiratoria por inhalación de humos se asocia una quemadura observamos que se produce enfisema en parénquima distal en el grupo de ratas inhaladas-quemadas y edema y enfisema en el parénquima distal en el grupo de ratas quemadas e inhaladas aunque estas lesiones no son estadísticamente significativas. (gráfica V.7)



Gráfica V.7. Resultados de la histología pulmonar en los distintos grupos de ratas.

GV.ed.pb: Edema peribronquial en grandes vías

GV.ed.pv: Edema perivascular en grandes vías

Br.inf.pb: Inflamación peribronquial

Pd.cong: Congestión en parénquima distal.

Pd.edem: Edema en parénquima distal.

Pd.atelc.: Atelectasia en parénquima distal.

Pd.enfise.: Enfisema en parénquima distal.

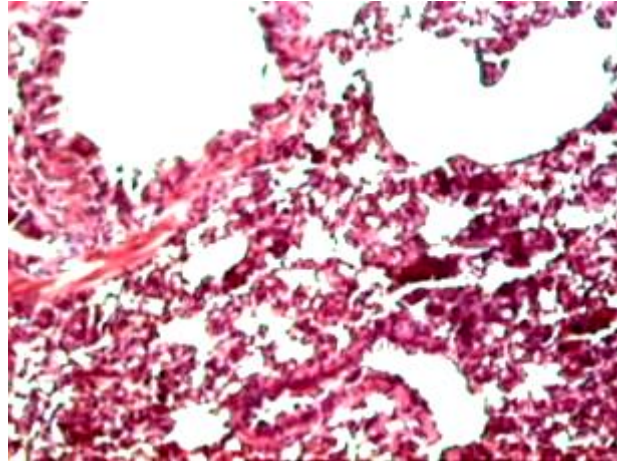


Figura V.1. Corte de pulmón de rata perteneciente al grupo de ratas inhaladas, teñido con HE (10X). Se aprecia congestión y colapso de espacios alveolares formando pequeñas zonas de atelectasia.

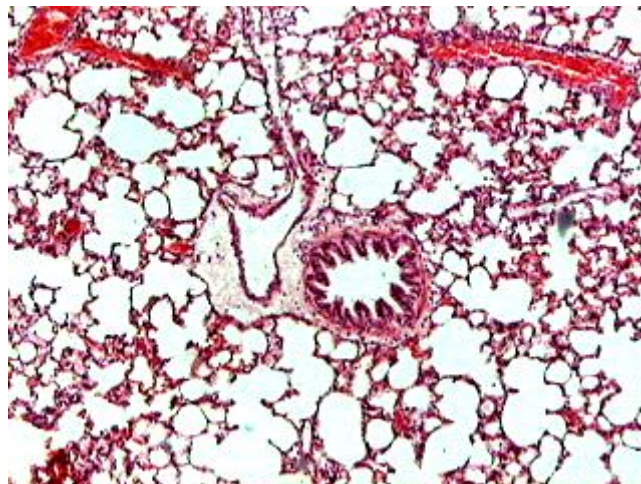


Figura V.2. Corte de pulmón de rata perteneciente al grupo de ratas inhaladas, teñida con HE (4X). Se observa dilatación y rotura de espacios alveolares, formando focos de enfisema. Los vasos y capilares presentan congestión y existe edema perivascular y peribronquial.

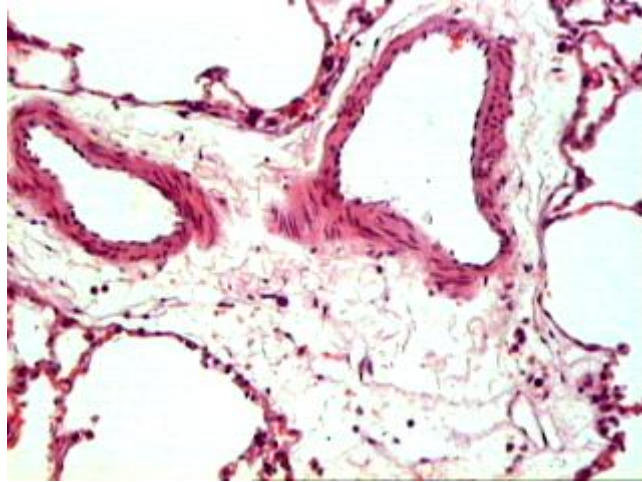


Figura V.3. Corte de pulmón de rata perteneciente al grupo de ratas inhaladas, teñido con HE (10X). Zona de edema perivascular.

V.5. Resultados de la microscopía confocal en los distintos grupos.

Las siguientes figuras corresponden a imágenes obtenidas mediante microscopía confocal y que corresponden a los pulmones de las ratas pertenecientes a los distintos grupos. La tinción se realiza con IP y FITC como marcador. El yoduro de propidio (IP) se utiliza como tinción general. Las células con fluorescencia verde amarillenta corresponden a macrófagos, los cuales se distribuyen entre los espacios alveolares. La identificación de los macrófagos se realizó mediante la utilización del anticuerpo CD4-FITC.

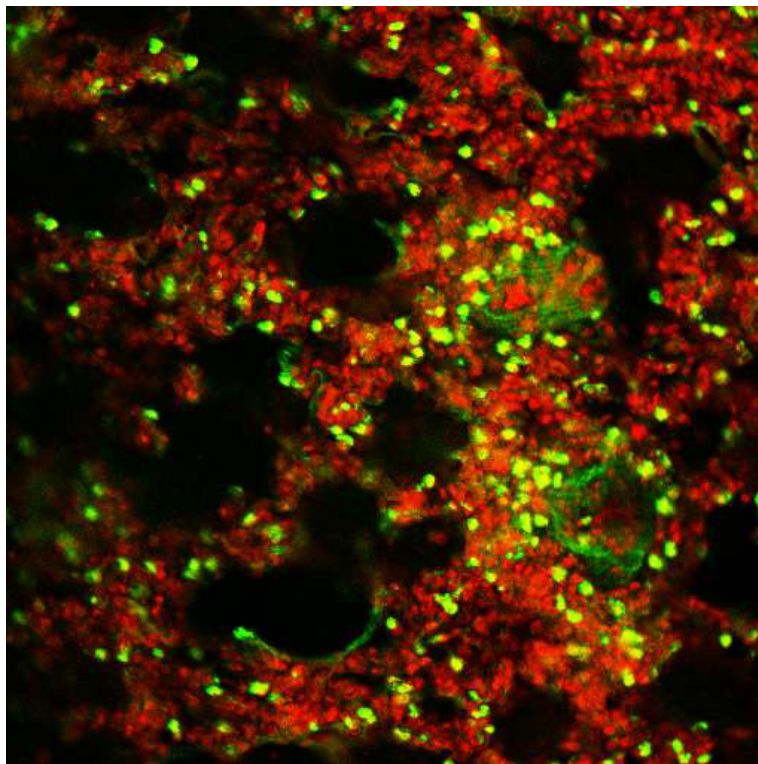


Figura V.4. Imagen obtenida mediante microscopía confocal de un pulmón perteneciente al grupo control. No se advierte ninguna alteración morfológica relevante, salvo una ligera congestión del parénquima.

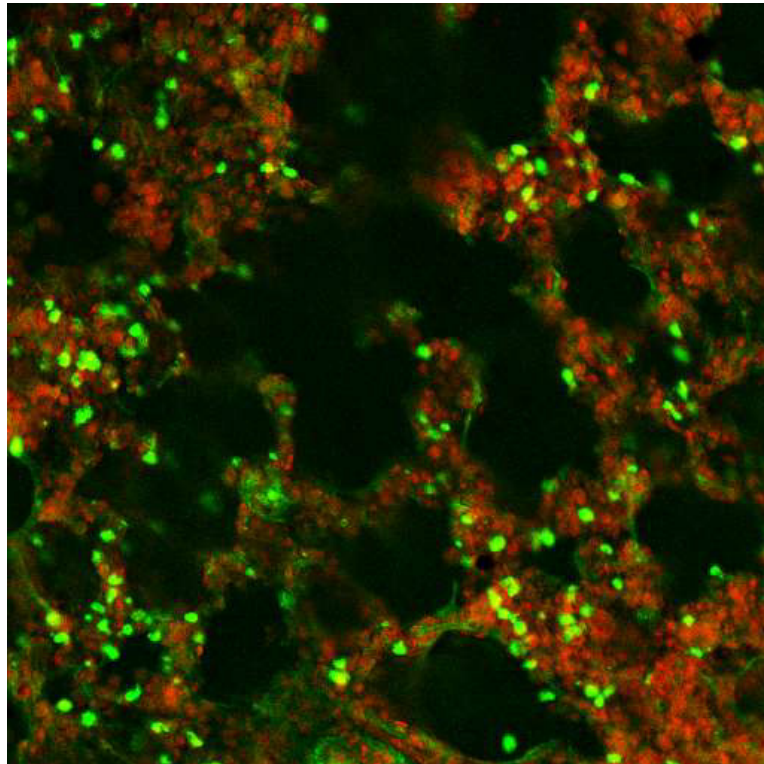


Figura V.5. Imagen obtenida mediante microscopía confocal de un pulmón perteneciente al grupo de ratas sometidas a quemadura. Destacamos la ligera disminución de macrófagos con relación al grupo control. El parénquima muestra congestión , atelectasia y enfisema.

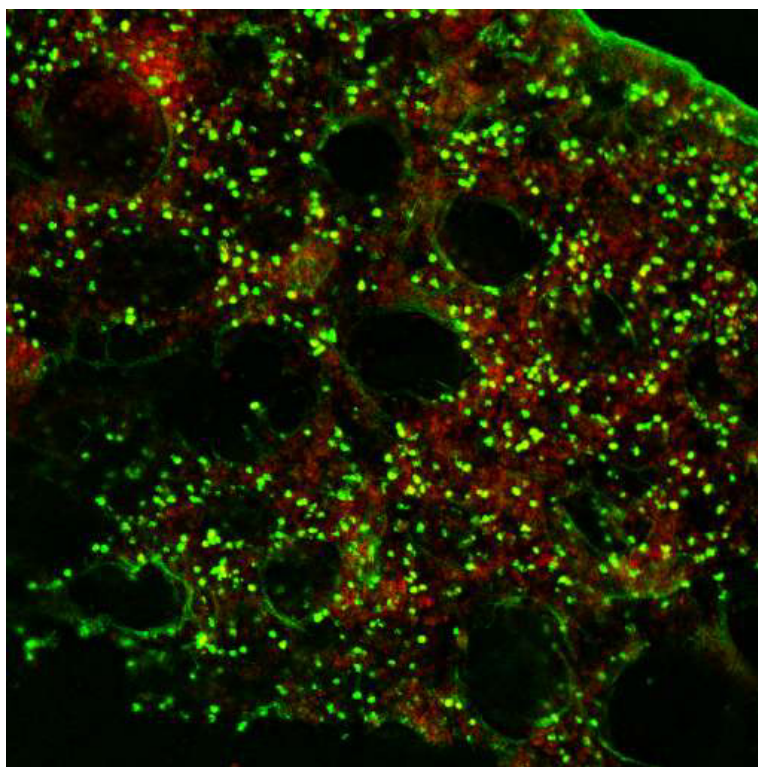


Figura V.6. Imagen obtenida mediante microscopía confocal de un pulmón perteneciente al grupo de ratas sometidas a inhalación. Morfológicamente se puede observar congestión y atelectasia. Cabe destacar el gran número de macrófagos con relación a los dos grupos anteriores (control y quemadura).

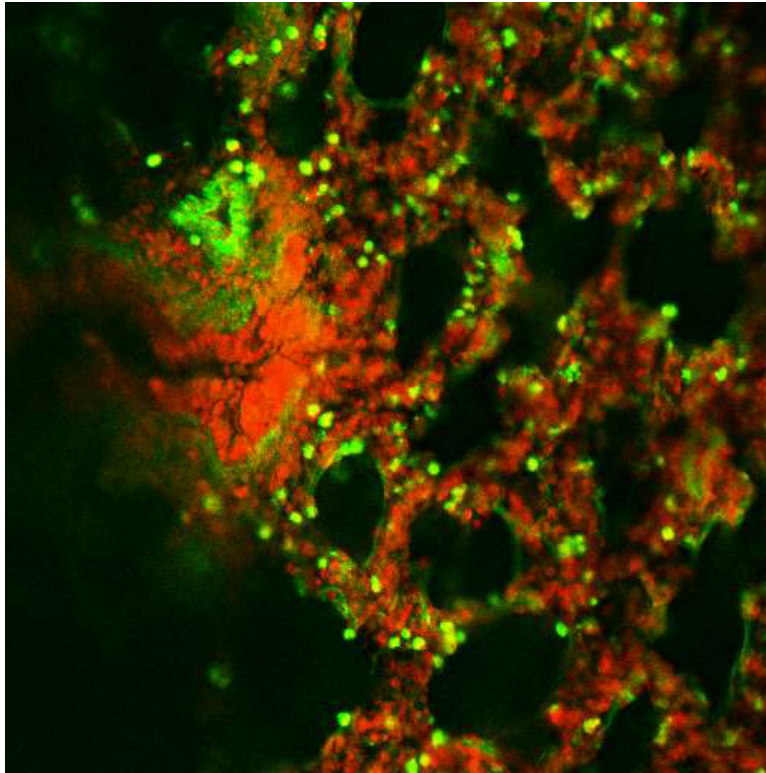


Figura V.7. Imagen obtenida mediante microscopía confocal de un pulmón perteneciente al grupo de ratas sometidas a inhalación y quemadura. Morfológicamente se observa congestión y enfisema. El número de macrófagos es menor que en los grupos anteriores.

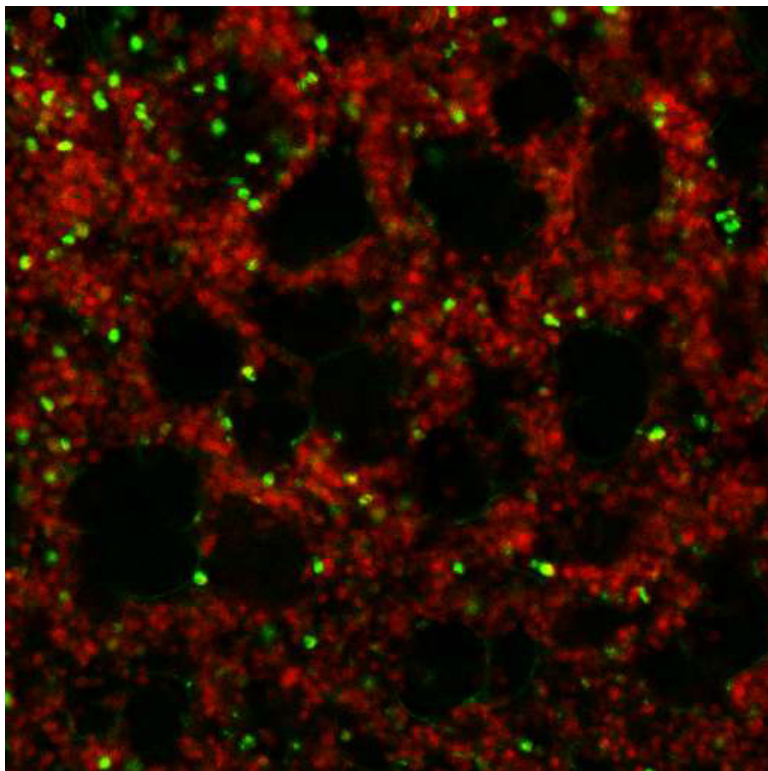


Figura V.8. Imagen obtenida mediante microscopía confocal de un pulmón perteneciente al grupo de ratas sometidas a quemadura e inhalación. Morfológicamente se observa congestión, edema, atelectasia y enfisema. Destacamos el escasísimo número de macrófagos en relación al resto de grupos.

VI. DISCUSIÓN

VI.1. Elección del modelo animal.

Al igual que los ratones, las ratas comenzaron a producirse, con miras a que sirvieran de reactivos biológicos, a mediados del siglo XIX, llegando a ser los más utilizados, después del ratón blanco, a partir de 1900. Anualmente se utilizan en Estados Unidos unos diez millones de estos animales. La rata pertenece al género rodentia, familia muridae, género rattus: Rata norvegicus, variedad albina. Entre las estirpes de mayor interés en el campo de las ciencias biológicas se encuentran las siguientes: *Sprague-Dawley*, *Wistar* y *Long-Evans*. La primera, albina, de cabeza fina y cola larga, es muy prolífica, mientras que la *Wistar*, también albina, tiene la cola más corta que el cuerpo, las orejas más largas que aquella, y sus camadas son más reducidas. Por fín, la *Long-Evans*, de tamaño más reducido que las anteriores, es de cuerpo blanco pero cabeza, cuello y hombros negros. La estirpe *Sprague Dawley* es muy susceptible a las afecciones respiratorias, mientras que la *Wistar* presenta una sensible resistencia a gran número de infecciones, especialmente respiratorias y cutáneas.

Este hecho, junto a la facilidad de manejo y disección de este animal así como su disponibilidad, hace que sea la rata *Wistar* el modelo animal elegido para realizar nuestra experiencia.

VI.2. Elección del modelo de quemadura.

El modelo de quemadura elegido es el modelo publicado por nuestro grupo de trabajo (Santos FX y cols. 1996.). Con este modelo provocamos una quemadura dérmica profunda que afecta a un 45% de la superficie corporal animal.

Para el estudio experimental de las quemaduras se necesita el empleo de diferentes modelos animales para reproducir las condiciones fisiopatológicas. Los principales modelos animales y su manipulación son presentados con arreglo a la experiencia de distintos autores. El animal empleado más frecuentemente es la rata Wistar a causa de su disponibilidad, bajo precio, resistencia a las infecciones y la posibilidad de reproducir los diferentes tipos de quemadura. La forma más fácil de provocar una quemadura dérmica experimental es la escaldadura. Este método es ideal para reproducir todos los tipos de quemadura porque ofrece la posibilidad de variar la temperatura del agua, el tiempo de exposición y la zona quemada. Para las quemaduras eléctricas es necesario utilizar, normalmente, animales superiores para obtener lesiones comparables a las quemaduras observadas en el hombre. Para evaluar la profundidad, en el modelo utilizado, se utiliza la escala de Suzuki (Suzuki y cols.1991) que establece parámetros histológicos objetivos para las lesiones. Sobre la base de esta escala, el modelo de quemadura por escaldadura es el más frecuentemente utilizado, provocando lesiones dérmicas superficiales o profundas según el tiempo de exposición y la temperatura. Para que los modelos de quemadura experimentales puedan ser homologados y considerados comparables, es preciso que sean reproducibles por otros autores, que produzcan resultados consecuentes y que sean simples de realizar y si es posible, económicos. Esta condición final del bajo precio puede ser fácilmente llevada a cabo con el modelo descrito, ofreciendo la posibilidad de realizar experimentación en el campo de las quemaduras a otros Centros y Servicios, no especializados y que disponen de fuentes económicas limitadas.

Modelos de quemaduras experimentales

En nuestra Unidad nosotros hemos usado distintos modelos de quemadura experimentales para el estudio de la respuesta local y sistémica a la agresión.

El modelo termal que preferimos es la escaldadura. En nuestra opinión este modelo ofrece las condiciones de facilidad, fiabilidad y economía que lo hacen superior a los demás. Este modelo inflige una quemadura dérmica profunda en el área cutánea expuesta. Histológicamente, la piel quemada muestra las señales clásicas de necrosis epidérmica, infiltrado perivascular difuso, y un nivel importante de degeneración de colágeno en la dermis papilar. El modelo permite la variación en tiempo de exposición y temperatura del agua con el fin de obtener lesiones termales de profundidades diferentes.

Este tipo de lesión termal causa en una fase inicial extravasación de líquido que puede llevar a la muerte del animal a consecuencia de choque hipovolémico a menos que en las primeras 6-8 horas postquemadura se reemplacen los líquidos perdidos. En base a esto, nosotros administramos 1 ml de NaCl 0,9% intraperitoneales inmediatamente después de producida la quemadura.

En el segundo método de quemadura termal usado en nuestra Unidad la lesión se produce por medio del contacto directo. Nosotros usamos el modelo descrito por Feifel, 1992. La parte dorsal del animal se afeita y con un disco de cobre (4 centímetros de diámetro) calentado a 250° C, se aplica en la superficie tantas veces sea necesario para quemar el área deseada. El inconveniente mayor de este método es la dificultad de asegurar una presión constante del disco en la piel en las aplicaciones sucesivas, siendo casi imposible obtener una quemadura de profundidad uniforme.

En 1991 Suzuki describió un método de quemadura basado en el contacto de la piel con una cámara a través de la cual circula agua a una temperatura predeterminada. Esto permite la aplicación de una presión constante de 10 g/cm². La gran ventaja de este modelo es la posibilidad de variar la temperatura y tiempo de exposición, y también de aplicar más o menos presión de contacto, lo cual hace posible agregar isquemia a la lesión termal.

El estudio experimental de quemaduras químicas en el pasado presentó el inconveniente de la difusión incontrolable del agente químico más allá del área en la que era aplicado. Esto, impidió la disponibilidad de un modelo contrastable y uniforme. Sin embargo, en 1994 Kim y cols. describieron un modelo para el análisis experimental de los efectos de agentes químicos en la piel. Este modelo consiste en un hemcilindro de teflón con una ventana en el centro. La rata se coloca en posición dorso-ventral con el objetivo de adherir el dorso firmemente al hemcilindro de teflón, impidiendo así que el agente químico escape más allá de los límites de la ventana abierta.

Con este modelo es posible probar agresores químicos diferentes y, variando la superficie superficial expuesta, evaluar las respuestas locales y sistémicas.

El estudio de quemaduras eléctricas generalmente requiere la utilización de animales superiores para permitir la aplicación de corrientes eléctricas con efectos similares a los que producirían en las personas. Posiblemente el estudio más completo de los efectos de la aplicación experimental de corriente eléctrica se publicó en 1988 por Zelt y cols. Estos autores, aplican corrientes eléctricas (40 Kj, 3500 V y 4,2 amperios) durante 2,5 segundos en las extremidades anteriores de primates. La parte más interesante de su trabajo es el análisis exhaustivo de los efectos de estas corrientes. Ellos realizaron un análisis histológico de la piel y músculo que reveló necrosis celular. Al mismo tiempo realizaron una angiografía, demostrando el estrechamiento segmentario de troncos vasculares grandes con una disminución significativa de los vasos nutrientes en las áreas afectadas. Los

estudios de conducción de los nervios cubitales demostraron una pérdida de la conducción sin posibilidad de recuperación. A pesar de esto, no observaron ninguna evidencia de necrosis progresiva.

Evaluación de la profundidad de la quemadura

Antes de homologar cualquier modelo experimental para el estudio de quemaduras, es necesario definir el tipo de quemadura que produce. Para esto, se necesita un número específico de animales control en los que la profundidad de la lesión termal es histológicamente verificada. En nuestra experiencia, el modelo de Suzuki (Suzuki y cols.1991) es el más simple y permite una buena comparación entre las muestras. Este modelo establece cuatro grados de profundidad de la quemadura. El primer grado corresponde a una quemadura epidérmica con vasodilatación simple e infiltración perivascular inflamatoria en la piel quemada. En el segundo grado se presenta necrosis epidérmica con vacuolización característica y un infiltrado perivascular denso (correspondiendo a una quemadura dérmica superficial). En la quemadura dérmica profunda se ve una degeneración de colágeno limitada a la dermis papilar. En el cuarto grado se presenta la degeneración de colágeno en los niveles más profundos de la dermis. En las quemaduras por escaldadura, que son las más frecuentemente estudiadas, las lesiones dérmicas pueden ser profundas o superficiales, dependiendo de la temperatura del agua y el tiempo de la exposición.

Obtención y procesamiento de las muestras

Uno de los principales problemas con que se han encontrado los investigadores cuando evalúan los resultados de quemaduras experimentales es la dificultad de tener a su disposición un protocolo fiable para la recolección de las muestras y analizar las repercusiones sistémicas de la lesión. Normalmente, las muestras de sangre que se requieren tienen que ser tomadas en momentos

diferentes del experimento. También, si se desea administrar cualquier sustancia, es necesario tener una buena ruta de acceso. En este caso, la ruta intraperitoneal puede sustituir la ruta intravenosa para la administración de drogas. Para la obtención de sangre en un grupo de ratas es tras canalizar la vena es posible enterrar un catéter bajo la piel, cerrar la herida y mantener una ruta permeable para estudios a largo plazo.

En nuestra Unidad, antes de producir la quemadura, la vena femoral es cateterizada en el animal pre-anestesiado. Con un poco de experiencia este procedimiento es fácil de realizar. Un Venocath® del número 18 cortado a una longitud de 6 centímetros y con la punta biselada, se inserta a través de la bifurcación femoral. El catéter se anuda a la vena femoral con una sutura de seda de 4/0 y se hepariniza con heparina de sodio. En cada extracción que se efectúe, debemos despreciar el volumen correspondiente a la cantidad de heparina dejada en el catéter. Después de cada extracción el catéter es heparinizado de nuevo y cerrado.

VI.3. Elección del modelo de inhalación.

El modelo de inhalación utilizado ha sido desarrollado en nuestra Unidad de Cirugía Experimental y tiene la ventaja sobre otros modelos existentes en que la inhalación de humos se produce de forma espontánea y controlando una serie de variables que para el desarrollo de nuestro estudio son indispensables.

La mayoría de los modelos experimentales de inhalación de humos, utilizan como animal de experimentación a la oveja. Los animales son intubados o traqueotomizados para la administración de humo procedente de la combustión de diferentes materiales. Entre estos modelos experimentales caben destacar y a título de ejemplo, los siguientes:

Soejima,K. Y cols.2000. utilizando ovejas, éstas efectúan 48 respiraciones de humo producido por la combustión de algodón. Booke, M y cols.1997. utilizan también ovejas traqueotomizadas las cuales inhalan humo procedente de la combustión de tela de algodón, 12 respiraciones repetidas 4 veces. Ogura,H. Y cols.1994. utilizan un modelo experimental de inhalación de humo espontánea en ovinos. Entre los modelos experimentales en que se utilizan otras especies animales destacaremos los siguientes:

Ischiropoulos,H. y cols.1994. utilizan ratas que son sometidas a inhalación espontánea de humo procedente de la combustión de madera de abeto.

Alving, K. y cols. 1993. utilizando cerdos les someten a la inhalación espontánea de humo de cigarro y de un aerosol de nicotina.

Hoffmann,D. Y Brunnemann,KD. 1983 realizan sus investigaciones en hombres fumadores. En esta línea hay un gran número de trabajos de investigación para estudiar los efectos perjudiciales del tabaquismo.

En todos los modelos revisados hemos encontrado inconvenientes para poder adoptar alguno de ellos para nuestro estudio ya que en la mayoría se utiliza la intubación o traqueotomía para administrar el humo, apartándose de circunstancias reales. En los modelos en que la inhalación es espontánea se han introducido una serie de variables no controladas (tamaño de los animales, tiempo de inhalación y volumen, material de combustión, etc) que para nuestro estudio son de vital importancia ya que con nuestro modelo hemos tratado sobre todo de simular una situación real que puede suceder en un escenario cotidiano

Con el sistema propuesto conseguimos reproducir la situación real con mayor fidelidad, eliminándose un gran número de variables.

La patogenia de las lesiones pulmonares secundarias a la inhalación tiene su origen en el edema (figura V.3) que se forma tanto en la vía aérea como en el

parénquima pulmonar, y a una marcada infiltración de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) como resultado de un aumento de la permeabilidad microvascular (Demling RH y cols,1990; Isago T y cols,1991; Raulf M y cols,1995; Bidani A y cols,1999) con un significativo incremento del flujo transvascular de proteínas, liberación de mediadores de la inflamación y radicales libres de oxígeno (Mikawa K y cols, 1995).

El edema que se forma en las primeras 12 horas es debido a la acción directa de los gases tóxicos y calientes, pero a partir de ese momento el edema del intersticio pulmonar parece estar mediado por diferentes agentes vasoactivos (Herndon DN y cols,1987).

El término genérico de gases y sustancias tóxicas se refiere a una serie de productos químicos que, suspendidas en el aire ambiente, son capaces de causar daño en el aparato respiratorio tras su inhalación (Smith LL y cols,1987).

Cuando la suspensión de estas sustancias, en el aire ambiente, es en su forma molecular, se denomina gas o vapor, la combustión de metales produce una suspensión de finas partículas sólidas que se conoce como humo (Zikria BA y cols, 1975).

El lugar de depósito de los gases inhalados depende de su solubilidad en la capa acuosa de la mucosa respiratoria. Así, los gases que son altamente solubles en agua como el amoníaco y el dióxido de sulfuro, ejercen sus efectos en las vías respiratorias altas, y sólo alcanzan los espacios aéreos distales cuando son inhalados en grandes dosis (Moritz AR y cols, 1945; Seaton A y cols, 1984).

En el caso de los humos, el lugar de depósito de las partículas inhaladas depende de su tamaño; las partículas grandes de 15-20 micras de diámetro se depositan en la nariz y en la garganta, las de diámetro entre 10 y 15 micras se depositan en la traquea y los bronquios, y las menores de 5 micras pueden llegar a los alveolos (Hill IR,1993). Otros factores que influyen en la lesión producida por

la sustancia inhalada son la concentración del agente, su potencial irritante y la duración de la exposición. En nuestro modelo partimos de una misma concentración para todos los grupos, siendo su poder irritante el mismo dado que se trata del mismo agente y la duración de la exposición es exactamente la misma.

Las exposiciones previas al mismo agente, la actividad física durante la exposición y la edad también pueden modificar la respuesta del individuo a la inhalación (Gandevia B, 1970). En el modelo propuesto, no hay actividad física durante la exposición ya que los animales permanecen anestesiados, y son todos de la misma edad y peso corporal.

Las sustancias tóxicas inhaladas pueden producir distintos efectos, según sus mecanismos de actuación, entre los que se incluyen asfixia, toxicidad a distancia, broncoconstricción, daño tisular de las vías aéreas y afectación del parénquima pulmonar (Zikria BA y cols, 1972).

El daño en el parénquima pulmonar es causado por la combustión incompleta de los productos; muchas de las sustancias presentes en la combustión del algodón son dañinas, pero las más importantes son aldehidos y óxidos de azufre y nitrógeno (Dyer RF y cols, 1976). La combustión del cloruro de polivinilo libera aproximadamente 75 compuestos potencialmente tóxicos, incluyendo ácido clorhídrico y monóxido de carbono(CO) (Dyer RF y cols, 1976; Einhorn IN, 1975).

El monóxido de carbono es un gas invisible y sin olor que posee una gran afinidad por la hemoglobina desplazando al oxígeno, dando lugar a una tremenda reducción en la capacidad de transporte de oxígeno (Emmons HW, 1974; Zikria BA y cols, 1972). El incremento en la permeabilidad en la membrana epitelial alveolar se puso de manifiesto en estudios realizados con conejos expuestos a CO (Fein A y cols, 1980; Nider A, 1971).

El CO interfiere mediante reacciones de oxidación-reducción en la actividad metabólica de distintos tipos de células como son las células tipo II alveolares, dando lugar a cambios histológicos (Rhodes ML, 1971).

La patología de las lesiones tanto de vías altas como de vías bajas es debido a la formación de edema. El estudio broncoscópico de dichas lesiones en las primeras 24 horas han mostrado una gradual edematización de la mucosa traqueobronquial (DiVicenti FC y cols,1971; Head JM,1980).

Las lesiones pueden ser de diversa consideración; benignas, una descamación superficial, hinchazón; hasta llegar a una completa interrupción del epitelio traqueobronquial, con focos de necrosis y la formación de pseudomembranas compuestas por moco, exudado de fibrina, leucocitos polimorfonucleares, y restos de bacterias. La submucosa traqueobronquial aparece con una severa congestión y edema con hemorragias ocasionales (Yang T y cols, 1994). (figuras V.2 , V.3 y V.6)

Las pseudomembranas no se forman en los bronquiolos, pero los cambios inflamatorios que ocurren en la fase aguda dan lugar al desarrollo de neumonía peribronquial. También aparece un gran número de PMN en la pared y luz traqueobronquial así como en estructuras peribronquiales. Tanto la vía aérea como el parénquima pulmonar lesionado van a mostrar distintos grados de congestión (figura V.2), edema intersticial y alveolar (figura V.3), infiltración de neutrófilos, ocasionalmente membrana hialina, y densa atelectasia (figura V.1).

La insuficiencia pulmonar aguda tiene severos componentes. La falta de oxígeno como consecuencia de su consumición por el fuego, es la primera amenaza, seguidamente el envenenamiento por monóxido de carbono; la mayoría de las muertes que se producen en los primeros momentos son debidas a una de estas dos tipos de asfixia. Los efectos irritantes de las partículas y otros compuestos derivados de la combustión incompleta de productos llevan rápidamente a un broncoespasmo agudo, tos, y traqueobronquitis (DiVicenti FC y

col, 1971). La atelectasia, se vio que aparecía en cuestión de segundos en lesiones experimentales, y probablemente debido a la desactivación del surfactante (Nieman GF y cols, 1980). Esta atelectasia apareció igualmente en nuestro modelo experimental prácticamente en todos los pulmones de las ratas inhaladas (gráfica V.7).(figuras V.1 y V.6)

Concluimos indicando que el modelo experimental propuesto reproduce de forma fidedigna los acontecimientos que suceden en la realidad, reproduciendo las lesiones que suelen producirse a consecuencia del desarrollo de una insuficiencia pulmonar aguda.

Para que los modelos experimentales puedan ser homologados y considerados comparables, es preciso que sean reproducibles por otros autores, que produzcan resultados consecuentes y que sean simples de realizar y si es posible, económicos. Estas condiciones pueden ser fácilmente llevadas a cabo con el modelo descrito, ofreciendo la posibilidad de realizar experimentación en el campo de la inhalación de humos a otros Centros y Servicios, no especializados y que disponen de fuentes económicas limitadas.

VI.4. Medición del Óxido Nítrico.

La medición de NO en el aire exhalado parece representar a aquel originado en la porción distal de las vías aéreas (Kharitonov,S.1996). Al parecer, la contribución en aire exhalado del formado a nivel endotelial es mínima. (Cremona,G.1995).

El incremento de NO en aire exhalado (NOE) en pacientes asmáticos o con bronquiectasias ha sugerido la posibilidad de ser utilizado como método de medición de la inflamación en la vía aérea (Barnes,PJ.1996), habiéndose planteado su uso como guía en el tratamiento con fármacos antiinflamatorios, ya que el NOE disminuye con dosis elevadas de corticoides inhalados.

Sin embargo también han sido descritos niveles de NOE normales en pacientes asmáticos (Ho,LP.1998), en otras formas de inflamación o incluso en la fase de exacerbación de dichos procesos. Ello podría explicarse por una ausencia clara de relación entre la intensidad de la inflamación y el NOE medido, la existencia de mecanismos de producción y autorregulación del NO hasta ahora no suficientemente explicados.

El origen celular y destino metabólico final en la formación del NO no están hasta la fecha suficientemente despejados. La capacidad de intervenir en las oxidaciones de diferentes compuestos como los tioles, grupos hemo o sulfuros ferrosos explican su implicación en multitud de procesos fisiológicos.

La vida media muy corta del NO, las alteraciones en la difusión de las células inflamatorias por la propia inflamación, la presencia de moco o el edema hacia la luz, podrían explicar todos los condicionantes a los que puede verse expuesto el NO previo a su paso a la luz endobronquial para ser posteriormente medido en aire exhalado.

Además hay que añadir las complicaciones propias de la contaminación del NOE por parte del NO formado en las fosas nasales.

Frente a ello, el LBA podría representar un método de medición in situ que obviara alguna de las dificultades señaladas anteriormente y que permitiera medir el NO producido localmente en las vías aéreas.

Asimismo nos permitiría identificar las fuentes celulares potenciales responsables de la producción de NO.

La medición en aire exhalado se recomienda sea realizada con el método de quimioluminiscencia directamente. En nuestro caso la medición fue realizada con el método de Griess, que mide el valor del nitrito formado a partir del nitrato

procedente del NO. Aunque se trata de un método indirecto y menos específico que la quimioluminiscencia permite sin embargo medir en medio líquido pudiendo tratarse de un método muy útil dada la inestabilidad del NO en el aire exhalado. (Arias Díaz, J. 1994)

El lavado broncoalveolar (LBA.) consiste en la introducción de cierta cantidad de líquido a través de una cánula introducida en la tráquea del animal, que teóricamente, difunde por todo el árbol bronquial y llega a los alveolos. Esta técnica nos permite recoger las células y las proteínas que descansan sobre el epitelio del tracto respiratorio, ofreciéndonos enormes posibilidades como método de estudio de las enfermedades que afectan al pulmón. (Banks, 1990).

Actualmente no existe una normativa común en animales de experimentación, lo que hace que cada grupo de trabajo utilice su propia técnica intentando asemejarla a la realizada en humanos.

Rennard y cols., en estudios realizados en humanos demostraron que con la técnica del LBA se pueden obtener dos tipos distintos de muestras. Los primeros mililitros recuperados corresponden al lavado de la porción bronquial del pulmón, representando la muestra bronquial, mientras que la segunda fracción sería la bronquioloalveolar, es decir aquella que aporta información del parénquima pulmonar propiamente dicho.

La similitud existente entre la anatomía e histología del pulmón de ratas y humano, con existencia en ambos de vías aéreas de conducción, bronquios y parénquima, constituido por la porción distal, bronquiolo terminal, bronquiolo respiratorio, sacos alveolares y alveolos, nos lleva a pensar que realizando en ratas el lavado broncoalveolar con la misma sistemática que se realiza en los humanos, podemos acercarnos mejor a la realidad, distinguiendo una primera fracción procedente del lavado puramente bronquial de la segunda, más representativa del parénquima pulmonar.

El método de lavado broncoalveolar en ratas propuesto (Callol, LM. y cols, 1994) nos permite estudiar los componentes celulares en ambas fracciones por separado así como determinar los valores de óxido nítrico.

En 1847, Green describió por primera vez, en la “Medical and Surgical Society” una técnica para visualizar el tracto respiratorio. Este método fue rechazado y Green expulsado de dicha sociedad. Sin embargo, fue en 1927 en Yale, cuando se realizó por primera vez el lavado broncoalveolar (LBA) con fines terapéuticos (Gee JBL. 1980).

Inicialmente el LBA se utilizó para la experimentación animal (Moises JA. Y cols. 1989) con objeto de conocer las características de la composición celular y bioquímica de la superficie alveolar. A partir de la década de los sesenta, el LBA se empleó como técnica terapéutica permitiendo el tratamiento de ciertos procesos respiratorios como bronquiectasias severas, asma y proteinosis alveolar (Ramirez RJ y Harlan WR. 1968).

A partir de los años cincuenta, el LBA adquiere un valor diagnóstico. En los años siguientes, la técnica se realizó con broncoscopio rígido, con auténtica intención exploratoria.

Dos hechos fundamentales destacan en la historia del LBA: la incorporación del fibrobroncoscopio en 1966, por Ikeda y la descripción del LBA, tal y como hoy lo entendemos, en 1974 por Reynolds y Newball.

En la actualidad, el LBA, se está empleando, de forma casi sistemática, en la investigación de procesos respiratorios de índole variada, sobre todo, desde que se demostró que sus resultados son reflejo de los datos obtenidos con la biopsia pulmonar. (Winberger SE y cols. 1978).

En el líquido obtenido tras el LBA se pueden analizar los componentes siguientes: 1) componente celular, 2) sustancias bioquímicas, 3) microorganismos y 4) minerales.

El LBA parece ser un método útil para el estudio de la porción distal de las vías aéreas (Castellá,J.1997). Parece evidente que en él, la fracción de líquido obtenido después de la primera instilación de suero salino puede ser, en parte, secreción bronquial y la segunda, bronquioloalveolar, más representativa del fluido alveolar.

En el caso concreto de los animales de experimentación, algunos modelos han propuesto el LBA con uso de aspiración, que permite la recogida del 90% del volumen instilado, aunque en un única fracción (Von Vicher,P, 1993). En el método utilizado, aunque en las recogidas se obtiene un 46% y 98% de lo obtenido en la primera y segunda muestra respectivamente, se permite no someter a las vías aéreas a cambios de presión secundaria al proceso de aspiración, obteniendo a pesar de ello un elevado porcentaje del volumen instilado y obtener la separación de la 1ª fracción (bronquial) de la segunda (bronquioloalveolar).

En este contexto, por tanto, la medición del NO en el LBA podría representar, no solo a aquel producido localmente, sino también al procedente de tejido distal al epitelio alveolar o bronquial.

V.5. Óxido nítrico y quemadura.

Los valores de óxido nítrico aumentados reflejan la intensidad de la inflamación en la fase de quemadura temprana, pero la excesiva formación de óxido nítrico está causada probablemente por la quemadura de la vía aérea y no por el incremento de la tensión. (Nakae, H. Y cols. 2000.)

Cui, XL y cols.2000. estudiaron la expresión de las citoquinas inflamatorias en ratas alimentadas con una dieta suplementada con arginina y sometidas a quemadura de un 30% de superficie corporal por escaldadura, llegando a la

conclusión de que la adición de un suplemento de arginina dietética disminuye la expresión del RNAm de citoquinas inflamatorias en los órganos y mejora el porcentaje de supervivencia frente a la lesión termal. El óxido nítrico aumentó en el plasma de estas ratas que ingieren L-arginina.

Las lesiones por quemadura activan la respuesta inflamatoria en la piel quemada ocasionando la formación de edema y daño circulatorio. Esta respuesta involucra la activación del óxido nítrico, pudiendo jugar un papel importante en los cambios hemodinámicos y hemostáticos que acontecen como resultado del trauma post-quemadura.

Lindblom, L. y cols. 2000 realizaron una experiencia con ratas, observando que en ratas a las que se les administra un precursor del óxido nítrico (L-arginina) había inhibición en la extravasación del plasma inducida por la quemadura, sin embargo la administración de un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), no influye en la extravasación. El volumen de orina acumulado aumentaba 10 veces en los animales quemados, tratados con L-arginina. En estos animales había una proteinuria significativamente aumentada, no sucediendo nada de esto en los animales pretratados con el inhibidor de la NOS.

La activación de la síntesis de óxido nítrico suprime el edema de la quemadura de forma significativa y aumenta de forma considerable la diuresis y la proteinuria.

Shi, S y Wu, K. 1998, utilizando un inhibidor y un precursor de óxido nítrico en ratas frente a una lesión termal comprobaron que el aumento de óxido nítrico en sangre inmediatamente después de la quemadura puede jugar un papel protector en la fase temprana de la lesión. El inhibidor de óxido nítrico perturbó la microcirculación y acortó el tiempo de supervivencia de los animales, mientras que el precursor (L-arginina) produjo los efectos contrarios.

En la respuesta inflamatoria no específica se producen interacciones complejas y no aclaradas de mediadores inflamatorios: neutrófilos, citoquinas y metabolitos del óxido nítrico. En las quemaduras se liberan citoquinas proinflamatorias en respuesta a una variedad de estímulos nocivos. Estas citoquinas provocan la activación de los neutrófilos y endotelio vascular. La actividad de óxido nítrico sintasa también aumenta y por lo tanto aumenta la producción de óxido nítrico. (Mayers, I y cols.1998)

La concentración de óxido nítrico aumenta, en la presencia de radicales libres como por ejemplo el anión superóxido secretado por los neutrófilos da lugar a la formación de peroxinitritos, que son moléculas más reactivas y tóxicas. Una vez que el proceso comienza, la lesión del órgano se puede producir. Sería interesante desarrollar técnicas para manipular esta interacción compleja de mediadores inflamatorios.

Deliconstantinos,G. Y cols.1996. intentaron demostrar si la eNOS y la xantino-oxidasa podrían activarse para producir NO y peroxinitrito (ONOO-) a continuación de una exposición a rayos UVA, comprobando que la radiación UVA actúa como un potente estimulador de la eNOS y la xantino-oxidasa en las células endoteliales humanas. Los efectos citotóxicos del NO y del ONOO- pueden ser los factores principales en la respuesta integrada de la piel que lleva a una vasodilatación, primer evento importante de producción del eritema y del proceso de inflamación.

Suzuki,K. Y cols.1996. estudiando el trastorno contráctil cardíaco en pacientes con shock séptico, vieron que era consecuencia de la respuesta inflamatoria del organismo y que mediadores tóxicos orgánicos como son las citoquinas, eicosanoides, factor plaquetario y óxido nítrico se producen por las células activadas en el sistema cardiovascular.

Bamberger,T. Y cols.1992. investigando si el óxido nítrico está implicado en la inmunosupresión que se produce a consecuencia de la lesión post-quemadura,

demonstraron por primera vez que el NO está implicado, por lo menos en parte, en un estado de inmunosupresión que no tiene nada que ver con ninguna enfermedad infecciosa.

La producción de NO aumenta en pacientes humanos después de la lesión por quemadura. La producción aumentada de NO como potente vasodilatador endógeno ha sido descrita en pacientes con estados inflamatorios, incluso con sepsis.

Preiser,JC. Y cols.1996. vieron que la lesión por quemadura estaba asociada con un aumento en la producción de óxido nítrico, siendo este aumento no proporcional al área quemada. El incremento era aún mayor en pacientes sépticos.

El óxido nítrico es una molécula que regula la inmunidad y el tono vascular, sirve como neurotransmisor y participa en la curación de la herida. (Carter,EA. Y cols.1994.) Según los resultados obtenidos por estos autores llegaron a la conclusión que el hiperdinamismo cardiovascular y la respuesta hipermetabólica vistas después de la lesión termal podrían ser resultado de una secreción autocrina y paracrina de NO localmente dentro de los tejidos, además del generado por las células inflamatorias.

En la fase temprana post-quemadura, es un lipopolisacárido producido por E. Coli el que podría inducir una excesiva producción de NO. (Jia,X. Y cols.1996).

Tanto en quemaduras superficiales como profundas se produce una vasoconstricción e isquemia progresiva. El shock post-quemadura produce inestabilidad hemodinámica, resistencia vascular sistémica aumentada, rendimiento cardíaco disminuido y presión arterial afectada. (Mosher,M. Y cols.1996). Estos autores comprobaron que con el uso de inhibidores de la NOS y de la peroxidación lipídica mejora la inestabilidad hemodinámica que se produce a consecuencia de la quemadura. La activación de la peroxidación lipídica y

biosíntesis de NO, contribuye a la intoxicación endógena en pacientes críticos. (Golikov,PP.y cols.2000).

La falta de mejora en la perfusión en respuesta al tratamiento con un precursor de NO (L-arginina) puede sugerir que la síntesis de NO en respuesta al trauma termal ya esté en su pico más alto. (Lindblom y cols.2000).

Peng,X. y cols.1998. vieron que la actividad de la NOS constitutiva y el flujo de sangre disminuyen notablemente tras la quemadura, sin embargo la actividad de la iNOS aumenta y no tiene correlación con el flujo de sangre. Utilizando un precursor que alimente la actividad de la NOS constitutiva mejora la isquemia postquemadura.

Los períodos prolongados de choque hemorrágico están asociados a la inducción de la isoforma NOSe en varios órganos y en el músculo liso vascular. La formación de grandes cantidades de NO por la isoforma NOS inducible contribuye a la descompensación vascular y a la hiporeactividad vascular frente a agentes vasoconstrictores. Un deterioro en la formación de NO por la NOSe se ha demostrado en varios modelos de shock traumático, considerando que hay evidencia experimental que apoya la hipótesis de que una producción reforzada de NO contribuye a la patofisiología de la lesión termal experimental.(Szabo y cols.1994). Estos autores especulan sobre una modulación farmacológica de la biosíntesis de NO: La utilización de un inhibidor selectivo de la iNOS podría ser considerado como una nueva terapia para mejorar el resultado de pacientes con shock circulatorio.

Jia,X. y cols.1997. en ratas quemadas por escaldadura vieron como el tejido quemado contenía NO en una cantidad hasta 60 veces superior al plasma, por lo que llegaron a la conclusión de que el NO cutáneo podría tener una influencia sistémica muy pequeña, siendo sólo un factor local.

En los resultados obtenidos (Gráfica V.7) en el grupo de ratas quemadas se produce un ligero incremento de NO en el suero sanguíneo tan sólo a los 120

minutos con respecto al grupo control, a los 0 y 30 minutos el valor de NO en el suero sanguíneo en el grupo de ratas quemadas prácticamente no sufre modificación con respecto al grupo control.

Estos resultados coinciden con los encontrados por Rawlingson y cols, los cuales vieron que la generación simultánea de óxido nítrico (NO) y anión superóxido (O₂⁻) puede llevar a la formación de peroxinitrito (ONOO⁻), que es un potente oxidante implicado en la patogénesis de diversas enfermedades (Rawlingson A. y cols. 2000). En su estudio, diseñado para investigar la posible generación de ONOO⁻ localmente en tejidos cutáneos afectados por una lesión termal, utilizaron como biomarcador para el ONOO⁻ en la piel de rata una proteína llamada 3-nitrotirosina. Vieron que se producía un aumento significativo en todos los casos. Estos datos sugieren que el ONOO⁻ se genera en el tejido cutáneo termalmente dañado.

Harper,R. Y cols. 1997. concluyen demostrando que los niveles de NO en el plasma no aumentan en pacientes con quemaduras de menos del 15% de superficie corporal, salvo que haya un trastorno multiorgánico o un aporte externo de nitratos.

V.6 Óxido nítrico e inhalación de humos.

La lesión por inhalación de humo es el principal determinante de la supervivencia en la lesión por quemadura. La localización primaria de la lesión por inhalación de humos son las pequeñas vías respiratorias en lugar de los alveolos y así, la oclusión de estas vías aéreas más pequeñas a consecuencia del edema es la causa de la hipoxia progresiva. Las alteraciones tras la inhalación de humos se caracterizan todas por un aumento en el flujo de sangre. (Shimazu,T. Y cols.1998).

Ischiropoulos,H. Y cols.1994. examinaron los mecanismos potenciales responsables de la lesión del parénquima pulmonar en un modelo animal de inhalación de humos. Las ratas expuestas al humo procedente de la combustión

de madera de abeto presentaban un aumento de la albúmina por aumento de la permeabilidad pulmonar, un aumento de la mieloperoxidasa pulmonar y un aumento de nitratos en el plasma. Las concentraciones de nitratos en el plasma aumentaron 3 veces con respecto al control. La utilización de un inhibidor de la NOS inmediatamente después de la exposición al humo abolió el aumento de los nitratos en el plasma y previno los cambios de la actividad de la mieloperoxidasa pulmonar y del índice de permeabilidad del tejido pulmonar. La producción de NO contribuye y juega un papel importante en la lesión alveolar pulmonar tras la inhalación de humo.

En los resultados obtenidos (Gráfica V.7) podemos ver como en el grupo de ratas inhaladas se produce un incremento significativo de NO en el suero sanguíneo con respecto al resto de grupos.

Alving,K. Y cols.1993. vieron como en cerdos sometidos a la inhalación de humo de cigarro y a nicotina en aerosol y además un aporte exógeno de NO, el humo producía una vasodilatación bronquial, probablemente causada por el NO presente en el humo en su mayor parte y una pequeña parte puede estar causada por el monóxido de carbono que da lugar a una vasodilatación débil en la circulación bronquial.

Soejima,K. Y cols.2000. utilizando ovejas a las que sometieron a la inhalación de humo procedente de la combustión de algodón, en un grupo utilizaron mercaptoetilguanidina como inhibidor de la iNOS y basurero del peroxinitrito vieron como en el grupo control se producía un incremento en el flujo de sangre y edema pulmonar. En el grupo pretratado con el inhibidor no se produjo aumento del flujo de sangre y el edema era menor. Por ello llegaron a la conclusión de que la iNOS juega un papel importante en el aumento del flujo de sangre y en el desarrollo de la lesión pulmonar.

En esta línea de investigación Lin ,YS y cols.2000. vieron como varias inhalaciones de humo produjeron edema submucosal de traquea y bronquios y

edema peribronquial. Esta respuesta fue inhibida o atenuada con un pretratamiento con dimetilgliurea como inhibidor de la NOS.

Ischiropoulos,H. Y cols.1994. comprobaron como la inyección de un inhibidor de la NOS inmediatamente después de la exposición al humo abolió el aumento en las concentraciones de nitratos circulantes. Estos datos sugieren que la producción de NO deriva de las sustancias oxidantes que se producen en el pulmón tras la lesión.

El NO inhalado reduce la hipertensión pulmonar selectivamente después de la inhalación de humos, sin embargo no mejora la oxigenación pero si la ventilación. A esta conclusión llegan un gran número de investigadores que han realizado diversos trabajos con distintos animales sometidos a inhalación de humos producidos por la combustión de distintos materiales.(Qi,S. y cols.1997.Ogura,H. Y cols.1994.Booke,M. Y cols1997.)

La inhalación de NO baja la hipertensión pulmonar disminuyendo la resistencia vascular pulmonar, mejorando la ventilación. La oxigenación arterial no mejora con la inhalación de NO y esto se debe probablemente a la formación del edema intersticial.

El NO inhalado puede recomendarse como aplicación clínica ya que puede invertir la hipertensión pulmonar que se produce tras la inhalación de humos.

V. 7 Óxido nítrico y macrófagos

Los macrófagos alveolares representan la primera línea de defensa del pulmón frente a los agentes medioambientales inhalados. Estas células liberan una variedad de mediadores inflamatorios que incluyen oxígeno reactivo y compuestos intermediarios de nitrógeno implicados en los mecanismos defensivos del organismo y en el tejido lesionado (Pendino,KJ. Y cols.1993.).

Estos autores aislaron macrófagos alveolares de rata e in-vitro fueron tratados con mediadores inflamatorios, produciendo NO, peróxido de hidrógeno y anión superóxido. La producción de NO por los fagocitos pulmonares se vió reforzada por la presencia de SOD (superóxido dismutasa). Tras la breve exposición in-vivo de ratas a ozono, agente irritante e inflamatorio pulmonar que se convierte rápidamente en oxígeno molecular, los fagocitos pulmonares produjeron cantidades significativamente aumentadas de NO, comparadas con el grupo control, también se vió una producción aumentada de peróxido de hidrógeno, sin embargo se observó una clara disminución en la producción de anión superóxido por parte de los fagocitos pulmonares. Todos estos datos demuestran que una exposición a un irritante –de forma aguda- modifica la producción de oxígeno reactivo y nitrógeno.

La función específica del macrófago intersticial pulmonar es poco conocida debido a la dificultad que supone su aislamiento. En una población de macrófagos intersticiales obtenida mecánicamente del pulmón y comparados con macrófagos alveolares, obtenidos a través de LBA (lavado broncoalveolar), se observó que éstos últimos produjeron más NO y anión superóxido. (Prokhorova,S. y cols.1994.)

Las células epiteliales alveolares tienen capacidad de sintetizar NO. En este tipo de células se encontraron cantidades significativas de NO después del tratamiento con citoquinas inflamatorias, interferon gamma y/o interleukinas o también con la combinación de IFN-gamma y factor de necrosis tumoral. En contraste a esto, los macrófagos alveolares tenían poca respuesta frente a lipopolisacáridos (bacterianos). La producción de NO por células tipo II frente a IFN-gamma era dosis dependiente. Utilizando un inhibidor de la iNOS se pudo comprobar que la producción de NO por células tipo II era debido a la expresión de RNAm para la forma inducible de la NOS. Luego, también se observó que utilizando un irritante (ozono, 2 ppm/3 horas) la producción de NO por células tipo II era significativamente mayor que en el grupo control y esto se debía a la

producción aumentada del RNAm de la iNOS. En la inhalación de ozono también se observó una producción aumentada de peróxido de hidrógeno. (Punjabi,CJ. Y cols.1994.).

Los macrófagos alveolares asimismo liberan otros radicales libres de oxígeno reactivos frente a la exposición de otro irritante como es el polvo de sílice. Blackford,JA. Y cols.1994. instilaron polvo de sílice intratraqueal en ratas, recogiendo las células a través de LBA y tejido pulmonar. Observaron un aumento de macrófagos y leucocitos (neutrófilos) en las ratas tratadas con sílice, exhibiendo un aumento significativo de NO debido a la expresión aumentada del RNAm de la iNOS.

En los resultados obtenidos, (Gráfica V.6) los valores de NO correspondientes a la fracción F1+2 (fracción bronquiolo-alveolar) del lavado broncoalveolar, se corresponde con los resultados obtenidos en la microscopía confocal en la que podemos comprobar que a una mayor activación de los macrófagos alveolares, mayor producción de NO.

CONCLUSIONES

1. El modelo experimental de inhalación utilizado y desarrollado en nuestra Unidad ha demostrado ajustarse perfectamente a las condiciones que debe cumplir todo modelo experimental.
2. Con el sistema utilizado se ha conseguido reproducir la situación real con mayor fidelidad, eliminándose un gran número de variables, cuyo control es indispensable para el desarrollo de nuestra investigación.
3. La medición del óxido nítrico, realizada con el método de Griess, y aunque se trata de un método indirecto y menos específico que la quimioluminiscencia ha demostrado, sin embargo, ser un método válido para medir óxido nítrico en medio líquido, pudiendo resultar un método muy útil dada la inestabilidad del NO en el aire exhalado.
4. El método de lavado broncoalveolar en ratas propuesto ha permitido estudiar los componentes celulares así como determinar los valores de óxido nítrico.
5. Las lesiones por quemadura activan la respuesta inflamatoria en la piel quemada ocasionando la formación de edema y daño circulatorio. Esta respuesta involucra la activación del óxido nítrico, el cual desarrolla un papel importante en los cambios hemodinámicos y hemostáticos que acontecen como resultado del trauma post-quemadura.

6. La lesión por inhalación de humo es el principal determinante de la supervivencia en la lesión por quemadura. La producción de óxido nítrico contribuye y juega un papel importante en la lesión alveolar pulmonar tras la inhalación de humo. La producción de NO deriva de las sustancias oxidantes que se producen en el pulmón tras la lesión.

6. Los macrófagos alveolares representan la primera línea de defensa del pulmón frente a los agentes medioambientales inhalados. Una mayor activación de los macrófagos alveolares representa una mayor producción de NO lo cual hace pensar que este componente celular es el que está más directamente implicado en la producción de NO.

- Abrahams M, Sjoberg F, Oscarsson A, Sundqvist T.** The effects of human burn injury on urinary nitrate excretion. *Burns*. Feb;25(1):29-33. 1999.
- Abramson SL, Malech HL, Gallin JI.** Neutrophils. En: Crystal RG, West JB y cols. *The lung*. New York. 553-561. 1991.
- Achauer BM, Allyn PA, Furnas DW, Bartlet RH.** Pulmonary complications of burns: The major treat to the burn patient. *Ann sug* 177: 311-319, 1973.
- Akcaay MN, Ozcan O, Gundogdu C, Akcaay G, Balik A, Kose K, Oren D.** Effect of nitric oxide synthase inhibitor on experimentally induced burn wounds. *J Trauma*. Aug;49(2):327-30.2000.
- Alving K, Fornhem C, Lundberg JM.** Pulmonary effects of endogenous and exogenous nitric oxide in the pig: relation to cigarette smoke inhalation. *Br J Pharmacol*. Oct;110(2):739-46.1993.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad .**Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissues preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3203-3207.1977.
- Atanassov B, Georgiev GH** Electrophoresis of NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) in boar spermatozoa. *Andrologia* 22:585-9.1990.
- Bacci S, Arbi-Riccardi R, Mayer B, Rumio C, Borghi-Cirri MB .** Localization of nitric oxide synthase immunoreactivity in mast cells of human nasal mucosa. *Histochemistry* 102:89-92.1994.
- Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T.** Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 270:14582-6.1995a.
- Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Kobzik L, Lowenstein CJ, Lamas S, Kelly RA, Smith TW, Michel T.** Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 beta and IFN-gamma. *Am J Physiol* 268:H1293-303.1995b
- Bamberger T, Masson I, Mathieu J, Chauvelot-Moachon L, Giroud JP, Florentin I.** Nitric oxide mediates the depression of lymphoproliferative responses following burn injury in rats. *Biomed Pharmacother*.;46(10):495-500. 1992.
- Banks DE, Bell DY, Davis GS y col.** Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am.Rev.Respir.Dis.* 141: 169-201, 1990.
- Becker WK, Shippee RL, McManus AT, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr.** Kinetics of nitrogen oxide production following experimental thermal injury in rats. *J Trauma*. Jun;34(6):855-62. 1993.
- Beckman JS, Chen J, Crow JP, Ye YZ.** Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 103:371-80.1994.

Bidani A, Hawkins HK, Wang CZ, Heming TA. Dose dependence and time course of smoke inhalation injury in a rabbit model. *Lung*. 177:111-122, 1999.

Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC . The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis* 127:1-11.1996.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA . Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7162-6.1995.

Booke M, Bradford DW, Hinder F, Nishida K, Biondo NA, Traber LD, Traber DL Inhaled nitric oxide selectively reduces pulmonary hypertension after ovine smoke inhalation but does not improve oxygenation. *J Burn Care Rehabil.* Jan-Feb;18(1 Pt 1):27-33.1997.

Brady AJ, Poole-Wilson PA . Circulatory failure in septic shock. Nitric oxide: too much of a good thing?. *Br Heart J* 70:103-5.1993.

Brain JD, . Mechanisms, measurement, and significance of lung macrophage function. *Envir. Health. Perspec.* 97:5-10. 1992.

Brain JD, .Lung macrophages. How many kinds are there? What do they do?. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137: 507-509. 1988.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-8.1991.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770.1990.a

Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:682-5.1990.b

Brown GC. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 369:136-9.1995.

Brüne B, Messmer UK, Sandau K. The role of nitric oxide in cell injury. *Toxicol Lett* 82-83:233-7.1995.

Brüne B, Mohr S, Messmer UK . Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127:1-3.1996.

Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 87:432-8.1991.

Bult H . Nitric oxide and atherosclerosis: possible implications for therapy. *Mol Med Today* 2:510-8.1996.

- Burrell MA, Montuenga LM, García M, Villaro AC** . Detection of nitric oxide synthase (NOS) in somatostatin-producing cells of human and murine stomach and pancreas. *J Histochem Cytochem* 44:339-46.1996.
- Busconi L, Michel T** . Endothelial nitric oxide synthase membrane targeting. Evidence against involvement of a specific myristate receptor. *J Biol Chem* 269:25016-20.1994.
- Calka J, Wolf G, Brosz M**. Ultrastructural demonstration of NADPH-diaphorase histochemical activity in the supraoptic nucleus of normal and dehydrated rats. *Brain Res Bull* 34:301-8.1994.
- Calka J, Wolf G, Schmidt W**. Induction of cytosolic NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in reactive microglia/macrophages after quinolinic acid lesions in the rat striatum: an electron and light microscopical study. *Histochem Cell Biol* 1996 105: 81-9.1996.
- Calloí LM, Barbero EA, Blasco R, Laguna R, Chivato T, Gómez de Terreros FJ, Muñoz R**. New method of collection os bronbrochioloalveolar lavage in rat. *Respiratory Medicine*. 88:399. 1994..
- Cardozo C, Edelman J, Lesser M**. Lipopolisaccharide-induced stimulation of alveolar macrophage opsonin-independent phagocytosis.. *J.Surg.Research*. 53:170-174. 1992.
- Carrougher GJ**. Inhalation injury. *AACN Clin. Issues Crit. Care Nurs*. May. 4(2): 367-77, 1993.
- Carter EA, Derojas-Walker T, Tamir S, Tannenbaum SR, Yu YM, Tompkins RG**. Nitric oxide production is intensely and persistently increased in tissue by thermal injury. *Biochem J*. Nov 15;304 (Pt 1):201-4. 1994.
- Casado M, Diaz-Guerra MJ, Rodrigo J, Fernández AP, Boscá L, Martín-Sanz P**. Expression of the calcium-independent cytokine-inducible (iNOS) isoform of nitric oxide synthase in rat placenta. *Biochem J* 324:201-7.1997.
- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Bu D, Bukrinsky MI, Peterson PK**. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism.*Glia* 16:276-84.1996.
- Charles IG, Chubb A, Gill R, Clare J, Lowe PN, Holmes LS, Page M, Keeling JG, Moncada S, Riveros-Moreno V**. Cloning and expression of a rat neuronal nitric oxide synthase coding sequence in a baculovirus/insect cell system. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1481-9.1993.a.
- Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S**. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11419-23.1993.b
- Chen LW, Hsu CM, Cha MC, Chen JS, Chen SC**. Changes in gut mucosal nitric oxide synthase (NOS) activity after thermal injury and its relation with barrier failure. *Shock*. Feb;11(2):104-10. 1999.
- Chen LW, Hsu CM, Wang JS, Chen JS, Chen SC**. Specific inhibition of iNOS decreases the intestinal mucosal peroxynitrite level and improves the barrier function after thermal injury. *Burns*. Dec;24(8):699-705. 1998.

- Chu AJ, Prasad JK.** Up-regulation by human recombinant transforming growth factor beta-1 of collagen production in cultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling. *J Am Coll Surg.* Mar;188(3):271-80. 1999.
- Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA .** Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 55:727-30.1995.
- Colasanti M, Persichini T, Menegazzi M, Mariotto S, Giordano E, Caldarera CM, Sogos V, Lauro GM, Suzuki H.** Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. *J Biol Chem* 270:26731-3.1995.
- Cooke JP, Dzau VJ .** Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 48:489-509.1997.
- Cooke JP.** Role of nitric oxide in progression and regression of atherosclerosis. *West J Med* 164:419-24.1996.
- Craven PA, Derubertis FR .**Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and heme proteins: Evidence of the involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem* 253:8433-8443.1978.
- Crow JP, Beckman JS.** Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* 34:37-43.1995.
- Cui XL, Iwasa M, Iwasa Y, Ogoshi S.** Arginine-supplemented diet decreases expression of inflammatory cytokines and improves survival in burned rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* Mar-Apr;24(2):89-96.2000.
- Curtis MJ, Pabla R.** Nitric oxide supplementation or synthesis block--which is the better approach to treatment of heart disease?. *Trends Pharmacol Sci* 18:239-44.1997.
- Dalkara T, Moskowitz MA.**The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* 4:49-57.1994.
- Daniele RP, Elios JA, Epstein PE, Rossmann MD.** Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis and management of interstitial lung disease. *Ann. Inter. Med.* 102: 93-108. 1985.
- Darius S, Wolf G, Huang PL, Fishman MC.** Localization of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the rat retina: an electron microscopic study. *Brain Res* 690:231-5.1995.
- Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO.** Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 82:1598-610.1995.
- Davies PF, Tripathi SC.** Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circ Res* 72:239-45.1993.

Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7797-801.1991.

Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. Molecular mechanisms of nitric oxide actions in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 738:76-85.1994.

Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase: role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. *Annu Rev Med* 47:219-27.1996.

Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide: Actions and pathological roles. *The Neuroscientist* (preview issue, November).1994.

Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14:5147-59.1994.

De Vente J, Manshanden CG, Sikking RA, Ramaekers FC, Steinbusch HW . A functional parameter to study heterogeneity of glial cells in rat brain slices: cyclic guanosine monophosphate production in atrial natriuretic factor (ANF)-responsive cells. *Glia* 3:43-54.1990.

De Vente J, Seteinbusch HW. On the stimulation of soluble and particulate guanylate cyclase in the rat brain and the involvement of nitric oxide as studied by cGMP immunocytochemistry. *Acta Histochem* 92:13-38.1992.

Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC. Nitric oxide and peroxynitrite released by ultraviolet B-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema and inflammation. *Exp Physiol*. Nov;81(6):1021-33. 1996.

Demarest GB, Hudson LD, Altman LC. Impaired alveolar macrophage chemotaxis in patients with acute smoke inhalation. *Amer Rev Resp Dis* 119:279-285, 1979.

Demling RH, Lalonde C. Moderate smoke inhalation produces decreased oxygen delivery, increased oxygen demands, and systemic but not lung parenchymal peroxidation. *Surgery St. Louis* 108:544-552, 1992.

Di Vicenti FC, Pruitt BA Jr, Reckler JM. Inhalation injuries. *J trauma* 11: 109-117, 1971.

Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4214-8.1994.

Dudeck RR, Wildhirt S, Conforto A, Pinto V, Suzuki H, Winder S, Bing RJ Inducible nitric oxide synthase activity in myocardium after myocardial infarction in rabbit. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1671-80.1994.

Dupuy PM, Lancon JP, Francoise M, Frostell CG. Inhaled cigarette smoke selectively reverses human hypoxic vasoconstriction. *Intensive Care Med*. Nov;21(11):941-4.1995.

Dyer RF, Esch VH. Polyvinyl chloride toxicity in fires. *JAMA*.235: 393-397, 1976.

Egberongbe YI, Gentleman SM, Falkai P, Bogerts B, Polak JM, Roberts GW) The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience* 59:561-78.1994.

Einhorn IN. Physiological and toxicological aspects of smoke produced during the combustion of polymeric materials. *Environ. Health Persp.* 11: 163-189, 1975.

Emmons HW. Fire and fire protection. *Sci. Am.* 231: 21-27, 1974.

Endoh M, Maiese K, Wagner JA. Expression of the neural form of nitric oxide synthase by CA1 hippocampal neurons and other central nervous system neurons. *Neuroscience* 63:679-8.1994.

Esparza I. Función de los macrófagos. *Med. Clin. (Barc.)* 87: 429-434. 1986.

Estévez AG, Radi R, Barbeito L, Shin JT, Thompson JA, Beckman JS. Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors. *J Neurochem* 65:1543-50.1995.

Faber-Zuschratter H, Wolf G. Ultrastructural distribution of NADPH-diaphorase in cortical synapses. *Neuroreport* 5:2029-32.1994.

Faraci FM, Brian JE Jr. Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 25:692-703.1994.

Feifel H, Bruchelt G, Schmidt K. Effect of constituents of burned skin and in vivo burning on the respiratory activity of rat liver mitochondria. *Burns*, 18:308-12, 1992.

Fein A, Grossman RF, Jones JG, Hoeffel J, McKay D. Carbon monoxide effect on alveolar epithelial permeability. *Chest* 78: 726-731, 1980.

Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1788-92.1991.

Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 42:1849-57.1991.b

Freeswick PD, Wan Y, Geller DA, Nussler AK, Billiar TR. Remote tissue injury primes hepatocytes for nitric oxide synthesis. *J Surg Res.* Jul;57(1):205-9. 1994.

Fukuda S, Takaichi S, Naritomi H, Hashimoto N, Nagata I, Nozaki K, Kikuchi H. Ultrastructural localization and translocation of nitric oxide synthase in the endothelium of the human cerebral artery. *Brain Res* 696:30-6.1995.

Furchgott RF, Zawadzki JV . The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.1980.

Gabbott PL, Bacon SJ. Localisation of NADPH diaphorase activity and NOS immunoreactivity in astroglia in normal adult rat brain. *Brain Res* 714:135-44.1996.

Gamelli RL, George M, Sharp-Pucci M, Dries DJ, Radisavljevic Z. Burn-induced nitric oxide release in humans. *J Trauma.* Nov;39(5):869-77; discussion 877-8. 1995.

- Gandevia B.** Occupational asthma. *Med J Aust* 2:332-333, 1970.
- Garcia NM, Horton JW.** Burn injury alters coronary endothelial function. *J Surg Res.* Jan;60(1):74-8. 1996.
- Garcia NM, Horton JW.** L-arginine improves resting cardiac transmembrane potential after burn injury. *Shock.* May;1(5):354-8. 1994.
- Garthwaite J, Boulton CL.** Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57:683-706.1995.
- Garthwaite J.** Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14:60-67.1991.
- Gath I, Gödtel-Armbrust U, Förstermann U.** Expressional downregulation of neuronal-type NO synthase I in guinea pig skeletal muscle in response to bacterial lipopolysaccharide. *FEBS Lett* 410:319-323.1997.
- Gee JBL, Fick RB.** Bronchoalveolar Lavage. *Thorax* . 35:1-8. 1980.
- Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR.** Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 522-6.1993.
- Gianotti L, Alexander JW, Pyles T, Fukushima R.** Arginine-supplemented diets improve survival in gut-derived sepsis and peritonitis by modulating bacterial clearance. The role of nitric oxide. *Ann Surg.* Jun;217(6):644-53; discussion 653-4. 1993.
- Golikov PP, Nikolaeva Nlu, Gavrilenko IA, Matveev SB, Davydov BV, Marchenko VV, Smirnov SV, Lebedev VV, Golikov AP.** Nitric oxide and lipid peroxidation as factors in endogenous intoxication in emergency states]. *Patol Fiziol Eksp Ter.* Apr-Jun;(2):6-9. Russian.2000.
- Griffith OW, Sthuer DJ.** Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57:707-736.1995.
- Gross SS, Wolin MS.** Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57:737-69.1995.
- Grozdanovic Z, Nakos G, Dahrman G, Mayer B, Gossrau R .** Species-independent expression of nitric oxide synthase in the sarcolemma region of visceral and somatic striated muscle fibers. *Cell Tissue Res* 281:493-9.1995.
- Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ et al.** Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 5:211-224.1979
- Harper R, Parkhouse N, Green C, Martin R.** Nitric oxide production in burns: plasma nitrate levels are not increased in patients with minor thermal injuries. *J Trauma.* Sep;43(3):467-74.1997.

- Harper R, Parkhouse N, Green C, Martin R.** Nitric oxide production in burns: plasma nitrate levels are not increased in patients with minor thermal injuries. *J Trauma*. Sep;43(3):467-74. 1997.
- Harris JO, Swenson EW, Johnson JE.** Human alveolar macrophages: comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and non smokers. *J.Clin.Invest*. 49:2086-2096. 1970.
- Head JM.** Inhalation injury in burns. *Am J Surg* 139: 508-512,1980.
- Hecker M, Mülsch A, Busse R.** Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem* 62:1524-9.1994.
- Herndon DN, Adams T Jr, Traber LD, Traber DL.** Inhalation injury and positive pressure ventilation in a sheep model. *Circ Shock* 12: 107-113, 1984.
- Herndon DN, Thompson PB, Brown M y Traber DL.** Diagnosis, Pathophysiology, and treatment of inhalation injury. *The art and Science of Burn care*. John Boswick Jr Ed. ASPEN Publ, Maryland, 1987 (pp.153-161).
- Herndon DN, Traber DL, Kramer GC, Flynn JT.** Mediators of tracheobronchial fluid formation and pulmonary destruction following smoke inhalation, abstracted: *Physiologist* 26:A-55, 1983.
- Herrero MB, Goin JC, Boquet M, Canteros MG, Franchi AM, Perez Martinez S, Polak JM, Viggiano JM, Gimeno MA.** The nitric oxide synthase of mouse spermatozoa. *FEBS Lett* 411:39-42.1997.
- Herrero MB, Pérez Martínez S, Viggiano JM, Polak JM, de Gimeno MF .** Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 8:931-4.1996.
- Hevel JM, White KA, Marletta MA.** Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 266:22789-91.1991.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM.** Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule [published erratum appears in *Biochem Biophys Res Commun* 1989 Jan 31;158(2):624]. *Biochem Biophys Res Commun* 157:87-94.1988.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z.** Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-6.1987.
- Hiki K, Hattori R, Kawai C, Yui Y.** Purification of insoluble nitric oxide synthase from rat cerebellum. *J Biochem* 111:556-8.1992.
- Hill IR.** Particulate matter of smoke inhalation. *Ann. Acad. Med. Singapore*. Jan. 22(1): 119-23, 1993.
- Hoffman RA, Langrehr JM, Billiar TR, Curran RD, Simmons RL.** Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine. *J Immunol* 145:2220-6.1990.

- Hoffmann D, Brunnemann KD.** Endogenous formation of N-nitrosoproline in cigarette smokers. *Cancer Res.* Nov;43(11):5570-4.1983.
- Horton JW, White J, Maass D, Sanders B.** Arginine in burn injury improves cardiac performance and prevents bacterial translocation. *J Appl Physiol.* Feb;84(2):695-702. 1998.
- Hrendon DN, Traber DL, Niehaus GD, Linares HA, Traber LD.** The pathophysiology fo smoke inhalation injury in a sheep model. *J Trauma* 24(12): 1044-1051, 1984.
- Huan J, Han Y, Chen Y.** Effects of thermal injury on production of nitric oxide in rat heart. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chih.* Sep;33(9):568-70. Chinese. 1995.
- Huang YS, Yang ZC, Yan BG, Yang JM, Chen FM, Crowther RS, Li A.** Pathogenesis Up-regulation by human recombinant transforming growth factor beta-1 of collagen production in cultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling.of early cardiac myocyte damage after severe burns. *J Trauma.* Mar;46(3):428-32. 1999.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G.** Endothelium derived relaxing factor produced and released form artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9265-9269.1987.
- Ignarro LJ, Gold ME, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G, Frank G** Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ Res* 64:315-29.1989.
- Isago T,Traber LD, Herndon DN, Traber DL.** Analysis of pulmonary microvascular permeability after smoke inhalation.*J. Appl. Physiol.* 71:1403-1408, 1991.
- Ischiropoulos H, Mendiguren I, Fisher D, Fisher AB, Thom SR.** Role of neutrophils and nitric oxide in lung alveolar injury from smoke inhalation. *Am J Respir Crit Care Med.* Aug;150(2):337-41. 1994.
- Iyengar R, Sthuer DJ, Marletta MA .** Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:6369-73.1985.
- Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD.** Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase [published erratum appears in *J Biol Chem* 1992 Nov 5;267(31):22694]. *J Biol Chem* 267:14519-22.1992.b.
- Janssens SP, Simouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD.** Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relating factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267: 22694.1992.a.
- Jia X, Zhu Z, Kong Q.** Measurement of blood NO contents using ESR method in rats after thermal injury. *Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih.* Nov;12(6):433-6. 1996.

- Jia X, Zhu Z, Li P.** The etiologic role of thermal injury on the induction of NO and NOS in plasma, burned wounds and visceral organs]. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chih.* Nov;35(11):694-6. Chinese.1997.
- Johnson AA, Burleson DG.** Nitrate analysis in biological fluids by gas chromatography-nitrogen-phosphorous detection. *Anal Biochem.* May 1;236(2):331-7. 1996.
- Kalina M, Plapinger RE, Hoshino Y, Seligman AM.** Nonosmiophilic tetrazolium salts that yield osmiophilic, lipophobic formazans for ultrastructural localization of dehydrogenase activity. *J Histochem Cytochem* 20:685-95.1972.
- Karatinos J, Rosse RB, Deutsch SI.** The nitric oxide pathway: potential implications for treatment of neuropsychiatric disorders. *Clin Neuropharmacol* 18:482-99.1995.
- Kawakami M, Yasui S, Yamawaki I, Katayama M, Nagai A, Takizawa T.** Structural changes in airways or rats exposed to nitrogen dioxide intermittently for seven days. Comparison between major bronchi and terminal bronchioles. *Am.Rev.Respir.Dis.* 140: 1754-1762. 1989.
- Keilhoff G, Seidel B, Noack H, Tischmeyer W, Stanek D, Wolf G.** Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. *Neuroscience* 75:1193-201.1996.
- Kilbourn RG.** Nitric oxide: moving towards the clinic. *Mol Med Today* 2:324.1996.
- Kim C, Schinkel C, Fuchs D, Stadler J, Walz A, Zedler S, von Donnersmarck GH, Faist E.** Interleukin-13 effectively down-regulates the monocyte inflammatory potential during traumatic stress. *Arch Surg.* Dec;130(12):1330-6. 1995.
- Kishimoto J, Keverne EB, Hardwick J, Emson PC.** Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: a histochemical, immunological and in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 5:1684-94.1993.
- Klatt P, Schmidt K, Mayer B.** Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *Biochem J* 288:15-7.1992.
- Klimaschewski L, Obermüller N, Majewski M, Bachmann S, Heym C.** Increased expression of nitric oxide synthase in a subpopulation of rat sympathetic neurons after axotomy: correlation with vasoactive intestinal peptide. *Cell Tissue Res* 285:419-25.1996.
- Knowles RG.** Nitric oxide synthases. *Biochem Soc Trans* 24:875-8.1996.
- Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS K.** Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 9:371-7.1993.
- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS .**Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372:546-8.1994.

Koeshling D, Humbert P, Schultz G. The NO receptor: characterization and regulation of soluble guanylyl cyclase. In: Nitric oxide in the nervous system. Vincent S (de). Academic Press. London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo and Toronto. pp 43-50.1995.

Kolb H, Kolb- V. Nitric oxide: a pathogenetic Bachofen factor in autoimmunity. *Immunol Today* 13:157-60.1992.a.

Kolb H, Kolb-Bachofen V. Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and nitric oxide. *Diabetologia* 35:796-7.1992.b.

Kolesnikov YA, Pick CG, Ciszewska G, Pasternak GW. Blockade of tolerance to morphine but not to kappa opioids by a nitric oxide synthase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5162-6.1993.

Kong Q, Zhu Z, Jia X. The injury of human lung cultured vascular endothelial cells in vitro added to burned skin extracts. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chih. Jun;*35(6):336-9. Chinese. 1997.

Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1250-4.1995.

Koshland DE Jr. Nitric oxide: the molecule of the year. *Science* 258:1861.1992.

Kowalyk S, Veith R, Boyle M, Taborsky GJ Jr Liver releases galanin during sympathetic nerve stimulation. *Am J Physiol* 262:E671-8. (1992).

Kröncke KD, Brenner HH, Rodriguez ML, Etzkorn K, Noack EA, Kolb H, Kolb-Bachofen V. Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide. *Biochim Biophys Acta* 1182:221-9.1993.

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376:327-43.1995.

Kuhn C, . Ultrastucture and celular finction in the distal lung. "The lung, structure, function and disease". Ed: International Academy of Pathology. The Willians and Wilkins Co. Baltimore. 1-20. 1978.

Kvetnansky R, Pacák K, Tokarev D, Jeloková J, Jezová D, Rusnák M. Chronic blockade of nitric oxide synthesis elevates plasma levels of catecholamines and their metabolites at rest and during stress in rats. *Eurochem Res* 22:995-1001.1997.

Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6348-52.1992.

Lee SC, Dickson DW, Liu W, Brosnan CF. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. *J Neuroimmunol* 46:19-24.1993.

- Lin YS, Kou YR.** Acute neurogenic airway plasma exudation and edema induced by inhaled wood smoke in guinea pigs: role of tachykinins and hydroxyl radical. *Eur J Pharmacol.* Apr 7;394(1):139-48.2000.
- Lindblom L, Cassuto J, Yregard L, Mattsson U, Tarnow P, Sinclair R.** Role of nitric oxide in the control of burn perfusion. *Burns.* Feb;26(1):19-23.2000.
- Lindblom L, Cassuto J, Yregard L, Mattsson U, Tarnow P, Sinclair R.** Importance of nitric oxide in the regulation of burn oedema, proteinuria and urine output. *Burns.* Feb;26(1):13-7.2000.
- Liu L, Barajas L .** Nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the rat kidney. *Neurosci Lett* 161:145-8.1993.
- Lizasoain I, Leza JC, Cuéllar B, Moro MA, Lorenzo P.** Inhibition of morphine withdrawal by lamotrigine: involvement of nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 299:41-5.1996.
- Loesch A, Belai A, Burnstock G .**An ultrastructural study of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in the perivascular nerves and vascular endothelium of the rat basilar artery. *J Neurocytol* 23:49-59.1994.
- Loesch A, Burnstock G.** Ultrastructural localization of nitric oxide synthase and endothelin in coronary and pulmonary arteries of newborn rats. *Cell Tissue Res* 279:475-83.1995.
- Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH.** Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6711-5.1992.
- Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Anggaard A, Hökfelt T, Lundberg JM, Alving K.** High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nat Med* 1:370-3.1995.
- Luo G, Peng D, Huang W.** The role of thermal injury on nitric oxide (NO) production by mouse macrophages and its possible mechanism. *Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih.* Jul;12(4):268-71. 1996.
- Luscher TF, Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent responses in human blood vessels. *Trends Pharmacol Sci* 9:181-4.1988.
- Luss H, Watkins SC, Freeswick PD, Imro AK, Nussler AK, Billiar TR, Simmons RL, del Nido PJ, McGowan FX Jr.** Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in endotoxemic rat cardiac myocytes in vivo and following cytokine exposure in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 27:2015-29.1995.
- Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM.** Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 267:6370-4.1992.
- Macedo MP, Lutt WW.** Autoregulatory capacity in the superior mesenteric artery is attenuated by nitric oxide. *Am J Physiol* 271:G400-4.1996.a.

- Macedo MP, Lutt WW.** Shear-induced modulation by nitric oxide of sympathetic nerves in the superior mesenteric artery. *Can J Physiol Pharmacol* 74:692-700.1996.b.
- Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M.** Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:355-8.1993.
- Masson I, Mathieu J, Nolland XB, De Sousa M, Chanaud B, Strzalko S, Chancerelle Y, Kergonou JF, Giroud JP, Florentin I.** Role of nitric oxide in depressed lymphoproliferative responses and altered cytokine production following thermal injury in rats. *Cell Immunol.* Jun 15;186(2):121-32. 1998.
- Mathieu J, Masson I, Chancerelle Y, Chanaud B, Strzalko S, De Sousa M, Kergonou JF, Giroud JP, Florentin I.** Restoration of postburn impaired lymphocyte responsiveness by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is independent of prostaglandin E2 inhibition. *J Leukoc Biol.* Jan;55(1):64-72. 1994.
- Mathru M, Venus B, Rao TLK, Matsuda T.** Noncardiac pulmonary edema precipitated by tracheal intubation in patients with inhalation injury. *Crit Care Med* 11: 804-806, 1983.
- Mayer B, John M, Böhme E.** Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett* 277:215-9.1990.
- Mayers I, Hurst T, Johnson D.** Augmentation of hypoxic pulmonary vasoconstriction by N(G)-L-methyl-arginine in a rabbit model of thermal injury. *Am J Emerg Med.* Nov;14(7):629-34. 1996.
- Mayers I, Johnson D.** The nonspecific inflammatory response to injury. *Can J Anaesth.* Sep;45(9):871-9. Review. 1998.
- McMillan K, Bredt DS, Hirsch DJ, Snyder SH, Clark JE, Masters BS.** Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11141-5.1992.
- Meller ST, Gebhart GF.** Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52:127-36.1993.
- Meng F, Korompai FL, Lynch DM, Yuan YS.** Acetylcholine-induced and nitric oxide-mediated vasodilation in burns. *J Surg Res.* Dec;80(2):236-42. 1998.
- Merz U, Schefels J, Hendricks H, Hornchen H.** Combination therapy of high frequency oscillatory ventilation, NO inhalation and surfactant replacement in a child with acute respiratory distress síndrome. *Klin Padiatr.* Mar-Apr;211(2):83-5. German. 1999.
- Michel T, Li GK, Busconi L.** Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6252-6.1993.
- Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, Obara H.** Attenuation of hyperoxic lung injury in rabbits with superoxide dismutase: effects on inflammatory mediators. *Acta Anaesthesiol Scand.* 39: 317-322, 1995.

- Miller MJ, Thompson JH, Zhang XJ, Sadowska-Krowicka H, Kakkis JL, Munshi UK, Sandoval M, Rossi JL, Eloby-Childress S, Beckman JS, et al** . Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 109:1475-83.1995.
- Minc-Golomb D, Yadid G, Tsarfaty I, Resau JH, Schwartz JP**. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in cerebellar neurons. *J Neurochem* 66:1504-9.1996.
- Mitrovic B, Ignarro LJ, Vinters HV, Akers MA, Schmid I, Uittenbogaart C, Merrill JE**. Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes. *Neuroscience* 65:531-9.1995.
- Miyawaki T, Sohma O, Mizuguchi M, Takashima S** Immunohistochemical studies on the distribution of nerve fibers in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol* 83:1108-14.1995.
- Mizutani T, Layon AJ**. Clinical applications of nitric oxide. *Chest* 110:506-24.1996.
- Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, Kone BC**. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int* 46:653-65.1994.
- Moisés JA, Xaubet A, Agustí C, Picado C, Marín A, Agustí-Vidal A**. Significado de la presencia de mastocitos en el lavado broncoalveolar en la valoración diagnóstica de las enfermedades intersticiales difusas. *Med.Clin (Barc)*. 92:454-456. 1989.
- Moncada S, Higgs A, Furchgot R** . XIV International union of pharmacology: nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 49:137-42.1997.
- Moncada S, Higgs A**.The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-12.1993.
- Moncada S, Higgs EA**. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 9:1319-30.1992.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA**. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38:1709-15.1989.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA**. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-42.1991.
- Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL, Babbedge RC**. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol* 110:219-24.1993.
- Moritz AR, Henriques FC Jr, Mc Lean R**. The effects of inhaled heat on the air passages and lungs: An experimental investigation. *Am J Pathol* 21:311-331,1945.
- Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernández AP, Bentura ML, Boscá L, Rodrigo J, Lizasoain I** . Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosc* 10: (in press).1998.

- Morris SM Jr, Billiar TR.** New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 266:E829-39.1994.
- Mosher M, Hurst TS, Mayers I, Johnson DH.** Lazaroids--not nitric oxide synthetase inhibitors--improve hemodynamics after thermal injury in anesthetized guinea pigs. *J Burn Care Rehabil.* Jul-Aug;17(4):294-301. 1996.
- Münzel T, Heitzer T, Harrison DG.** The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. *Herz* 22:3158-72.1997.
- Murphy JT, Duffy S, Purdue GF, Hunt JL.** Thermal injury alters endothelial vasoconstrictor and vasodilator response to endotoxin. *J Trauma.* 1999 Sep;47(3):492-8; discussion 498-9.
- Murphy S, Lin HL, Park SK.** Cytokine-induced expression of type II nitric oxide synthase in astrocytes is downregulated by ATP and glutamate. *Glia* 15:77-82.1995.
- Nakae H, Endo S, Inada K, Yamada Y, Nasu W, Taniguchi S, Ishikura H, Tanaka T, Wakabayashi G, Sato S.** Are nitrite/nitrate (NOx) levels elevated by inhalation injury?. *Burns.* Sep;26(6):515-9.2000.
- Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M.** Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension?. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10045-8.1991.
- Napolitano LM, Campbell C.** Nitric oxide inhibition normalizes splenocyte interleukin-10 synthesis in murine thermal injury. *Arch Surg.* Dec;129(12):1276-82; discussion 1282-3. 1994.
- Nathan C, Xie QW.** Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915-8.1994.
- Nathan C.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-64.1992.
- Nathan CF, Hibbs JB Jr.** Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3:65-70.1991.
- Nicotera P, Ankarcona M, Bonfoco E, Orrenius S, Lipton SA.** Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress. *Adv Neurol* 72:95-101.1997.a.
- Nicotera P, Bonfoco E, Brüne B.** Mechanisms for nitric oxide-induced cell death: involvement of apoptosis. *Adv Neuroimmunol* 5:411-20.1995.
- Nicotera P, Brune B, Bagetta G.** Nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis? *Trends Pharmacol Sci* 18:189-90.1997.b.
- Nider A.** The effects of low levels of carbon monoxide on the fine structures of terminal airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 103: 898, 1971.
- Nieman GF, Clark WR Jr, Wax SD, Webb Wr.** The effect of smoke inhalation on pulmonary surfactant. *Ann Surg* 191: 171-181, 1980.

Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90: 2092-6.1992.

Nonami Y. The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jpn Circ J* 61:119-3.1997.

Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 191:89-94.1993.

Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 54:171-8.1993.

Ogura H, Cioffi WG Jr, Jordan BS, Okerberg CV, Johnson AA, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. The effect of inhaled nitric oxide on smoke inhalation injury in an ovine model. *J Trauma.* Aug;37(2):294-301; discussion 301-2. 1994.

Ogura H, Saitoh D, Johnson AA, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr, Cioffi WG Jr. The effect of inhaled nitric oxide on pulmonary ventilation-perfusion matching following smoke inhalation injury. *J Trauma.* Dec;37(6):893-8.1994.

Ogura H, Saitoh D, Johnson AA, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr, Cioffi WG Jr. The effect of inhaled nitric oxide on pulmonary ventilation-perfusion matching following smoke inhalation injury. *J Trauma.* Dec;37(6):893-8. 1994.

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S . Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666.1988.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxin factor. *Nature* 327:524-526.1987.

Paulsen SM, Wurster SH, Nanney LB. Expression of inducible nitric oxide synthase in human burn wounds. *Wound Repair Regen.*Mar-Apr;6(2):142-8. . 1998.

Pendino KJ, Laskin JD, Shuler RL, Punjabi CJ. Enhanced production of nitric oxide by rat alveolar macrophages after inhalation of a pulmonary irritant is associated with increased expression of nitric oxide synthase. *J.Immunol.*Dec 15;151 (12):7 196-205.1993.

Peer G, Blum M, Iaina A. Nitric oxide and acute renal failure. *Nephron* 73:375-81.1996.

Peng X, Feng J, Wang S. Effects of early enteral feeding on nitric oxide synthase activity in small intestine in burned rat. *Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih.* Jan;14(1):37-40. Chinese.1998.

Pierce GN, Maddaford TG, Russell JC. Cardiovascular dysfunction in insulin-dependent and non-insulin-dependent animal models of diabetes mellitus. *Can J Physiol Pharmacol* 75:343-50.1997.

Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10480-4.1991.

Pollock JS, Nakane M, Buttery LD, Martinez A, Springall D, Polak JM, Förstermann U, Murad F .Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am J Physiol* 265: C1379-87.1993.

Preiser JC, Reper P, Vlasselaer D, Vray B, Zhang H, Metz G, Vanderkelen A, Vincent JL. Nitric oxide production is increased in patients after burn injury. *J Trauma*. Mar;40(3):368-71. 1996.

Prokhorova S, Lavnikova N, Laskin DL. Functional characterization of interstitial macrophages and subpopulations of alveolar macrophages from rat lung. *J.Leukoc Biol*. Feb;55 (2): 141-146. 1994.

Punjabi CJ, Laskin JD, Pendino KJ, Goller NL, Durham SK. Production of nitric oxide by rat pneumocytes: increased expression of inducible nitric oxide synthase following inhalation of a pulmonary irritant. *Am J Respiratory*. Aug;11(2):165-72.1994.

Qi S, Yang Z, He B. An experiment study of reversed pulmonary hypertension with inhaled nitric oxide on smoke inhalation injury. *Chung Hua Wai Ko Tsa Chih*. Jan;35(1):56-8. Chinese.1997.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S . The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92:639-46.1987.b.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5193-7.1990.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2:1057-8.1987.a.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1482-9.1987.c.

Ramirez RJ, Harlan WR. Pulmonary alveolar proteinosis. Nature and origin of alveolar lipid. *Am.J.Med*. 45:502-512. 1968.

Raulf M, Tennie L, Marczyński B, Potthast J, Marek W, Baur X. Cellular and mediator profile in bronchoalveolar lavage of guinea pigs after toluene diisocyanate (TDI) exposure. *Lung*. 173(1): 57-68, 1995.

Rawlingson A, Greenacre SA, Brain SD. Generation of peroxynitrite in localised, moderate temperature burns. *Burns*. May;26(3):223-7.2000.

Reid IA, Chiu YJ. Nitric oxide and the control of renin secretion. *Fundam Clin Pharmacol* 9:309-23.1995.

Renaud JP, Boucher JL, Vadon S, Delaforge M, Mansuy D. Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of N omega-hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in no synthases of a sequence very similar to the heme-binding sequence in P450s. *Biochem Biophys Res Commun* 192:53-60.1993.

Rennard SI. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage to separate bronchial and alveolar samples. *Am.Rev. Respir. Dis*. 141: 208-217. 1990.

- Reynolda HY, Newball HN.** Analysis of proteins and respiratory cells obtained from humans lungs by bronchial lavage. *J.Lab.Clin.Med.* 84: 559-573. 1974.
- Rhodes ML.** The effect of carbon monoxide on mitochondrial respiratory enzymes in pulmonary tissue, abstracted. *Am Rev Respir Dis* 103: 906, 1971.
- Riveros-Moreno V, Beddell C, Moncada S.** Nitric oxide synthase. Structural studies using autopeptide antibodies. *Eur J Biochem* 215:801-8.1993.
- Riveros-Moreno V,Heffernan B, Torres B, Chubb A, Charles I, Moncada S .** Purification to homogeneity and characterisation of rat brain recombinat nitric oxide synthase. *Eur J Biochem* 230:52-7.1995.
- Rodrigo J, Pedrosa JA, Alvarez FJ, Bentura ML, Uttenthal O, Martínez-Murillo R, Polak JM.** Presence of calcitonin gene-related peptide in intraepithelial nerve fibers and motor end-plates of the cat esophagus: a light and electron microscopic study. *J Auton Nerv Syst* 49:21-31.1994.
- Rosario Caneira da Silva M, Mota Filipe H, Pinto RM, Salaverria Timoteo de Carval, Godinho de Matos MM, Cordeiro Ferreira A, Toscano Rico JM.** Nitric oxide and human thermal injury short term outcome. *Burns.* May;24(3):207-12. 1998.
- Rubanyi GM.** Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem* 46:27-36.1991.
- Rubanyi GM.** The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 22:S1-S14.1993.
- Ruderman NB, Haudenschild C.** Diabetes as an atherogenic factor. *Prog Cardiovasc Dis* 26:373-412.1984.
- Sabille Y, Reynolds H.** Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev Respir. Dis.* 141: 471-501. 1990.
- Saito S, Kidd GJ, Trapp BD, Dawson TM, Bredt DS, Wilson DA, Traystman RJ, Snyder SH, Hanley DF.** Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience* 59:447-56.1994.
- Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N.** Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 96:2357-63.1995.
- Santos FX, Hamann C, Obispo JM, Rodriguez C y Coca S.** Experimental burn models. *Annals of Burns and Fire Disasters.* Vol IX, num.2: 96-100. 1996.
- Schmidlin A, Wiesinger H.** Stimulation of arginine transport and nitric oxide production by lipopolysaccharide is mediated by different signaling pathways in astrocytes. *J Neurochem* 65:590-4.1995.

- Schmidt W, Wolf G, Calka J, Schmidt HH.** Evidence for bidirectional changes in nitric oxide synthase activity in the rat striatum after excitotoxically (quinolinic acid) induced degeneration. *Neuroscience* 67:345-56.1995.
- Schoedon G, Schneemann M, Walter R, Blau N, Hofer S, Schaffner A.** Nitric oxide and infection: another view. *Clin Infect Dis Suppl* 2:S152-7.1995.
- Schott CA, Gray GA, Stoclet JC.** Dependence of endotoxin-induced hyporeactivity on extracellular L-arginine. *Br J Pharmacol* 108:38-43.1993.
- Schultz AM, Werba A, Wolrab C.** Early cardiorespiratory patterns in severely burned patients with concomitant inhalation injury. *Burns*. Aug;23(5):421-5. 1997.
- Schultz PJ, Tayeh MA, Marletta MA, Raj L .**Synthesis and action of nitric oxide in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* 261:F600-6.1991.
- Schuman EM, Madison DV.** Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:153-83.1994.
- Schwacha MG, Samy TS, Catania RA, Chaudry IH.** Thermal injury alters macrophage responses to prostaglandin E2: contribution to the enhancement of inducible nitric oxide synthase activity. *J Leukoc Biol*. Dec;64(6):740-6. 1998.
- Schwacha MG, Somers SD.** Thermal injury-induced immunosuppression in mice: the role of macrophage-derived reactive nitrogen intermediates. *J Leukoc Biol*. Jan;63(1):51-8. 1998.
- Seaton A, Morgan WKC.** Toxic gases and fumes. *Occupational lung diseases*. Philadelphia: Saunders: 609-642, 1984.
- Seki T, Hagiwara H, Naruse K, Kadowaki M, Kashiwagi M, Demura H, Hirose S, Naruse M.** In situ identification of messenger RNA of endothelial type nitric oxide synthase in rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 218:601-5.1996.
- Sennlaub F, Courtois Y, Goureau O.** Nitric oxide synthase-II is expressed in severe corneal alkali burns and inhibits neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Nov;40(12):2773-9.
- Sessa WC.** The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 31:131-43.1994.
- Shapiro KB, Hotchkiss JH.** Induction of nitric oxide synthesis in murine macrophages by *Helicobacter pylori*. *Cancer Lett* 102:49-56.1996.
- Shepherd JT, Vanhoutte PM.** Endothelium-derived relaxing (EDRF) and contracting factor (EDCF) in the control of cardiovascular homeostasis: the pioneering observations. In: Rubanyi G (de) Cardiovascular significance of endothelium-derived vasoactive factors. Futura. New York. pp 39-64.1991.
- Sheridan RL, Hurford WE, Kacmarek RM, Ritz RH, Yin LM, Ryan CM, Tompkins RG.** Inhaled nitric oxide in burn patients with respiratory failure. *J Trauma*. Apr;42(4):629-34. 1997.
- Sherman PA, Laubach VE, Reep BR, Wood ER.** Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry* 32:11600-5.1993.

- Shi S, Wu K.** Protective role of endogenous nitric oxide to microcirculation of rats during burn shock]. *Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih.* 1998 May;14(3):214-7. Chinese.
- Shimazu T, Ogura H, Sugimoto H.** Clinical and pathophysiological problems associated with smoke Inhalation injury. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* Jan;99(1):46-51. Japanese.1998.
- Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM.** Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res* 61:256-70.1987.
- Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM.** Natural course of the impairment of endothelium-dependent relaxations after balloon endothelium removal in porcine coronary arteries. Possible dysfunction of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circ Res* 65:740-53.1989.
- Shochina M, Loesch A, Rubino A, Miah S, Macdonald G, Burnstock G.** Immunoreactivity for nitric oxide synthase and endothelin in the coronary and basilar arteries of renal hypertensive rats. *Cell Tissue Res* 288:509-16.1997.
- Smith LL.** The response of the lung to foreign compounds that produce free radicals. *Annu. Rev. Physiol.* 49: 681, 1987.
- Soejima K, McGuire R, Snyder N 4th, Uchida T, Szabo C, Salzman A, Traber LD, Traber DL. The effect of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibition on smoke inhalation injury in sheep. *Shock.* ;13(4):261-6.2000.
- Soejima K, McGuire R, Snyder N, Uchida T, Szabo C, Salzman A, Traber LD.**The effect of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibition on smoke inhalation injury in sheep. *Shock*;13(4):261-6.2000.
- Southam E, Morris R, Garthwaite J.** Sources and targets of nitric oxide in rat cerebellum. *Neurosci Lett* 137:241-4.1992.
- Southan GJ, Szabó C.** Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol* 51:383-94.1996.
- Sozumi T.** The role of nitric oxide in vascular permeability after a thermal injury. *Ann Plast Surg.* Sep;39(3):272-7. 1997.
- Sparrow JR.** Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system. *J Mol Neurosci* 5:219-229.1995.
- Squadrito GL, Pryor WA.** The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chem Biol Interact* 96:203-6.1995.
- Staub NC, Schultz EL, Albertine KH.** Leucocytes and pulmonary microvascular injury. *Ann NY Acad Sci* 384: 332-343, 1982.
- Stone HH, Martin JD Jr.** Pulmonary injury associated with thermal burns. *Surg Gyn Obstet* 129: 1242-1246, 1969.

Stuehr DJ, Ikeda-Saito M. Spectral characterization of brain and macrophage nitric oxide synthases. Cytochrome P-450-like heme proteins that contain a flavin semiquinone radical. *J Biol Chem* 267:20547-50.1992.

Stuehr DJ, Marletta MA . Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7738-42.1985.

Subczynski WK, Lomnicka M, Hyde JS. Permeability of nitric oxide through lipid bilayer membranes. *Free Rad Res* 24:343-349.1996.

Sun S, He L, Guo Z. Influence of escharectomy during burn shock stage up on the changes in endothelin and NO. *Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih.* May;14(3):196-8. Chinese. 1998.

Suzuki T, Hirayama T, Aihara K. Experimental studies of moderate temperature burns. *Burns*, 17:443-51,1991.

Suzuki H, Shimosegawa T, Satoh A, Kimura K, Ohara S, Asaki S, Toyota T. Gastric mucosal blood flow response to stress in streptozotocin diabetic rats: regulatory role of nitric oxide. *J Gastroenterol.* Dec;32(6):726-33. 1997.

Suzuki K, Kohno M, Aoki M, Nishina M, Ogino R, Kohama A. Cardiac contractile dysfunction in response to surgical stress including trauma, hemorrhage, and infection. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* Sep;97(9):745-51. Review. Japanese. 1996.

Szabó C, Salzman AL, Ischiropoulos H. Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. *FEBS Lett* 363:235-8.1995.

Szabo C, Thiemermann C. Invited opinion: role of nitric oxide in hemorrhagic, traumatic, and anaphylactic shock and thermal injury. *Shock.* Aug;2(2):145-55. Review. 1994.

Szabó C. Nitric oxide, intracellular calcium overload, and cytotoxicity. *Shock* 6:25-6.1996.a.

Szabó C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull* 41:131-41.1996.b.

Szabó C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 6:79-88.1996.c.

Taheri PA, Lipton HL, Force SD, Franklin EW, Hyman AL, Flint LM, Ferrara JJ. Analysis of regional hemodynamic regulation in response to scald injury. *J Clin Invest.* Jan;93(1):147-54. 1994.

Thomsen LL, Olesen J The autonomic nervous system and the regulation of arterial tone in migraine. *Clin Auton Res* 5:243-50.1995.

Tojo A, Gross SS, Zhang L, Tisher CC, Schmidt HH, Wilcox CS, Madsen KM Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 4:1438-47.1994.

- Torihashi S, Horowitz B, Pollock JS, Ward SM, Xue C, Kobayashi S, Sanders KM** Expression of nitric oxide synthase in mucosal cells of the canine colon. *Histochem Cell Biol* 105:33-41.1996.
- Traber DL, Herndon DN, Stein MD, Traber LD.** Increased lung lymph flow with inhalation injury, abstracted. *Fed Proc* 42: 1105, 1983.
- Traber DL, Schlang G, Redl H Traber L.** The mechanism of the pulmonary edema of smoke inhalation. *Circ Shock* 13: 77, 1984.
- Tracey WR, Pollock JS, Murad F, Nakane M, Förstermann U** Identification of an endothelial-like type III NO synthase in LLC-PK1 kidney epithelial cells. *Am J Physiol* 266:C22-8.1994.
- Ujiiie K, Yuen J, Hogarth L, Danziger R, Star RA.** Localization and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *Am J Physiol* 267:F296-302.1994.
- Umans JG, Levi R.** Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu Rev Physiol* 57:771-90.1995.
- Ungureanu-Longrois D, Balligand JL, Kelly RA, Smith TW.** Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* Jan;27(1):155-67. Review. 1995.
- Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Rustioni A, Schmidt HH** Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neurosci Lett* 148:6-10.1992.
- Venus A, Matsuda T, Copiozo JB, Mathru M.** Prophylactic intubation and continuous positive airway pressure in the management of inhalation injury in burn victims. *Crit Care Med* 9: 519-523, 1981.
- Verge VM, Xu Z, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T.** Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11617-21.1992.
- Vincent SR, Kimura H.** Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46:755-84.1992.
- Vincent SR.** Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 42:129-60.1994.
- Vizzard MA, Erdman SL, Roppolo JR, Förstermann U, de Groat WC** Differential localization of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in the cat spinal cord. *Cell Tissue Res* 278:299-309.1994.
- Walter HL y Mason AD Jr.** A standard animal burn. *J. Trauma*, 8:1049-1051, 1968.
- Wang WD, Chen ZR, Li R, Lou SF. Nitric oxide synthesis in myocardium following burn injury in rats. *Burns.* Aug;24(5):455-9. 1998.
- Waynforth HB y Flecknell PA.** Anaesthesia and postoperative care.Experimental and surgical technique in the rat.

- Wedel B, Harteneck C, Foerster J, Friebe A, Schultz G, Koesling D.** Functional domains of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 270: 24871-5.1995.
- Weibel ER, Crystal RG.** Structural organization of the pulmonary interstitium. En: *The lung*. Crystal RG, West y col. New York. 369-378. 1991.
- Weiner C.P., Knowles R.G., Moncada S.** Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 171:838-43.1994.
- Weston JT, Liebow AA, Dixon MG, Rich TH.** Untoward effects of exogenous inhalants on the lung. *J Forensic Sci.* Apr;17(2):199-279. 1972.
- White KA, Marletta MA.** Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 31:6627-31.1992.
- Wimberger SE, Kelman JA, Elson NA y cols.** Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Ann.Intern.Med* 79:459-466. 1978.
- Wolf G, Henschke G, Würdig S.** Glutamate agonist-induced hippocampal lesion and nitric oxide synthase/NADPH-diaphorase: a light and electron microscopical study in the rat. *Neurosci Lett* 161:49-52.1993.
- Wolf G, Würdig S, Henschke G.** Nitric oxide synthase in the brain: light and electron microscopical findings based on the NADPH-diaphorase reaction. *J Neural Transm* 43:105-12.1994.
- Wolf G, Würdig S, Schünzel G.** Nitric oxide synthase in rat brain is predominantly located at neuronal endoplasmic reticulum: an electron microscopic demonstration of NADPH-diaphorase activity. *Neurosci Lett* 147:63-6.1992.
- Wolf G.** Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. *Histol Histopathol* 12:251-61.1997.
- Wood ER, Berger H Jr, Sherman PA, Lapetina EG.** Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 191:767-74.1993.
- Wroblewski DA, Bower GC.** The significance of facial burns in acute smoke inhalation. *Crit Care Med* 7: 335-338, 1979.
- Wu G.** Nitric oxide synthesis and the effect of aminoguanidine and NG-monomethyl-L-arginine on the onset of diabetes in the spontaneously diabetic BB rat. *Diabetes* 44:360-4.1995.
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C.** Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225-8.1992.
- Xue C, Pollock J, Schmidt HH, Ward SM, Sanders KM.** Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon. *J Auton Nerv Syst* 49:1-14.1994.

- Yamada Y, Endo S, Kamei Y, Minato T, Yokoyama M, Taniguchi S, Nakae H, Inada K, Ogawa M.** Plasma levels of type II phospholipase A2 and nitrite/nitrate in patients with burns. *Burns*. Sep;24(6):513-7. 1998.
- Yamada Y, Endo S, Nakae H, Kamei Y, Taniguchi S, Ishikura H, Tanaka T, Taki K, Inada K.** Nuclear matrix protein levels in burn patients with multiple organ dysfunction syndrome. *Burns*. Dec;25(8):705-8.1997.
- Yang T, Wu X, Cao Y.** Study of bronchoalveolar lavage fluid harvested from the dogs with steam inhalation injury. *Chung Hua Cheng Hsing. Shao Shang Wai Ko Tsa Chih*. May. 10(3): 215-7, 1994.
- Yoshida M, Kurose I, Wakabayashi G, Hokari R, Ishikawa H, Otani Y, Shimazu M, Miura S, Ishii H, Kitajima M.** Suppressed production of nitric oxide as a cause of irregular constriction of gastric venules induced by thermal injury in rats. *J Clin Gastroenterol.*;25 Suppl 1:S56-60. 1997.
- Yuan XJ, Bright RT, Aldinger AM, Rubin LJ.** Nitric oxide inhibits serotonin-induced calcium release in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 272:L44-50.1997.
- Zapata-Sirvent RL, Hansbrough JF y Steinspri S.** Effect of corticotropin releasing factor on acid-base alterations and bacterial translocations in murine model of thermal injury. *Burns* 19:302-305, 1993.
- Zawacki BE, Jung RC, Joice J, Rincon E .** Smoke, burns and the natural history of inhalation injury in fire victims. *Ann. Surg.* 185:100-110, 1977.
- Zhao YJ, Wang J, Rubin LJ, Yuan XJ.** Inhibition of K(V) and K(Ca) channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. *Am J Physiol* 272:H904-12.1997.
- Zikria BA, Budd DC, Folch F, Ferrer JM.** What is clinical smoke poisoning?. *Ann Surg* 181:151-156,1975.
- Zikria BA, Weston GC, Chodoff M, Ferre JM.** Smoke and carbon monoxide poisoning in fire victims. *J. Trauma.* 12: 641-645, 1972.