

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

Departamento de Farmacología, de Toxicología y de
Terapéutica

U.A.B

**NUEVAS ESTRATEGIAS ANTITROMBÓTICAS
PARA EL TRATAMIENTO DE LA CARDIOPATÍA
ISQUÉMICA**

Gemma Vilahur

CSIC-ICCC-Hospital de la Santa Creu i Sant Pau-UAB Barcelona

Barcelona, Julio del 2004

La Dra. Lina Badimon Maestro, Profesora de Investigación del CSIC y el Dr. Fernando de Mora Pérez, Profesor de Farmacología de la UAB, como directora y tutor respectivamente,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral que presenta Gemma Vilahur García con el título: "*Nuevas estrategias antitrombóticas para el tratamiento de la cardiopatía isquémica*" está en condiciones de ser leída y defendida.

Dra. Lina Badimon Maestro

Dr. Fernando de Mora Pérez

ICCC³
Institut Català de
Ciències Cardiovasculars
CIF : Q - 0801076 - A

Gemma Vilahur García

Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Farmacologia,
de Terapèutica i de Toxicologia
Unitat de Farmacologia Veterinària

Barcelona, Julio del 2004

"El objetivo de la vida es ser una persona completa más que perfecta en una área determinada"

Jhedu Krishnamurti
(Filósofo Indú s. XX d.c)

"Es mucho más importante la dirección que la velocidad"

Aristóteles
(Filósofo Griego s.IV a.c)

"El éxito es el resultado del 90% de esfuerzo y un 10% de genialidad"

Xavier Cugat
(Artista Catalán s.XX)

"La consecución de un resultado importante nunca es sólo fruto de un esfuerzo individual si no del resultado de un esfuerzo colectivo y unas circunstancias favorables"

Francesc Vilahur
(Consultor de I+D)

GRACIAS.

Por un sueño hecho realidad, por una mirada, por un apoyo, por un comentario, por una sonrisa, por unas palabras, por compañerismo, por mi vida, por un beso.

Por *un sueño hecho realidad*, por su sabiduría, su guía, su optimismo, su confianza, su sinceridad, su cariño, su sonrisa y por creer en mí, a Lina.

Por *una mirada*, por su compañía, sus consejos, su ayuda, su lealtad y su calidez, a Silvia.

Por *su apoyo*, su esfuerzo, su dedicación, su interés, su colaboración y su alegría, a Laura, Pablo, Mari, Sonia y Albert.

Por *un comentario*, por empujarme, perfeccionarme, por sus ideas, su ayuda desinteresada y sus palabras, a Teresa

Por *una sonrisa*, por su consejo, su ánimo, sus valores y su generosidad, a Maribel, a Esther y a Maisa.

Por *sus palabras*, su objetividad y su integridad, a Marta y Nia.

Por su *compañerismo* y colaboración, a Vicenta, a Rosa, a Marta Miguel, a Judith, a Vanessa, a Oriol, a Xevi, a Sandra, a Berta, a Jordi, a Javi, a Oriol Juan, a Olga, a Silvia Aguiló, a Cristina y a Pepe.

Por *mi vida*, por su amor, su ejemplo, sus consejos, su orientación, su desvelo, su entrega y su sacrificio, a mis padres y a mi hermana.

Por *un beso*, su apoyo, por inspirarme y por el futuro, a Ricardo.

AGRADECIMIENTOS

I. ABREVIATURAS	1
II. PRESENTACIÓN	5
III. INTRODUCCIÓN	9
1. Antecedentes	11
2. Sistema arterial	
2.1 Estructura de una arteria	12
2.1.1 Intima.....	12
2.1.2 Media	12
2.1.3 Adventicia	12
2.2 Clasificación de las arterias según su calibre.....	13
2.2.1 Arterias de gran calibre.....	13
2.2.2 Arterias de mediano calibre.....	13
2.2.3 Arterias de pequeño calibre.....	13
3. Patofisiología de la lesión aterosclerótica	
3.1 Tipos de lesión	14
3.2 La lesión inicial	15
3.2.1 El endotelio: papel del óxido nítrico.....	15
3.2.2 El endotelio disfuncional.....	20
3.3 Formación de la estría grasa	22
3.4 Progresión de la placa aterosclerótica	23
4. Complicación de la lesión aterosclerótica	
4.1 Factores desencadenantes de la rotura de la placa	25
4.1.1 Propiedades intrínsecas.....	25
4.1.2 Propiedades extrínsecas.....	29
4.2 Proceso aterotrombótico	29
4.2.1 Formación del trombo:	
a) Adhesión y activación plaquetar.....	30
b) Agregación plaquetar	33
c) Coagulación	33

4.3 Repercusiones clínicas de la aterotrombosis	34
4.4 Vasoconstricción	36
5. Progresión de la arteriosclerosis	36
6. Terapia farmacológica en eventos cardiovasculares	
6.1 Agentes hipolipemiantes	38
6.2 Agentes antitrombóticos.....	38
6.2.1 Antiplaquetares de primera generación	39
a) La aspirina	39
b) Los antagonistas del receptor del ADP.....	40
6.2.2 Antiplaquetares de segunda generación	41
a) Terapia combinada: aspirina y clopidogrel.....	41
b) Antagonistas de la GP IIb/IIIa.....	41
6.2.3 Nuevas aproximaciones antiplaquetares.....	42
6.3 Agentes antiisquémicos (Donadores de óxido nítrico)	43
6.3.1 Nitratos.....	43
6.3.2 Nitrosotioles.....	44
7. Las proteínas Rho	46
IV. OBJETIVOS	49
V. MATERIAL Y MÉTODOS	55
1. Artículo Primero:	
<i>Antithrombotic effects of saratin on human atherosclerotic plaques</i>	
Thrombosis and Haemostasis 2004; en prensa.....	63
2. Artículo Segundo:	
<i>A novel anti-ischemic nitric oxide donor inhibits thrombosis without</i>	
<i>modifying haemodynamic parameters.</i>	
Thrombosis and Haemostasis 2004;91:1035-1043.....	75
3. Artículo Tercero:	
<i>Inhibition of thrombosis by a novel platelet selective S-nitrosothiol</i>	
<i>compound without hemodynamic side effects.</i>	
Cardiovascular Research 2004;61:806 816.....	87

4. **Artículo Cuarto:**

Effects of a novel platelet NO-donor (LA816), aspirin, clopidogrel and combined therapy in inhibiting flow and lesion-dependent thrombosis in the porcine ex vivo model

Circulation 2004 ; en prensa.....	101
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	135
VII. CONCLUSIONES	151
VIII. BIBLIOGRAFÍA	157
IX. ANEXO I.....	179
X. ANEXO II (Otras publicaciones)	185

Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, Llorente-Cortés V, **Vilahur G**, Badimon L. Hypercholesterolemia downregulates c-4 sterol methyl oxidase (ERG25) in vascular cells and in the arterial wall.
Cardiovasc Res 2003;58(1):178-185.

Royo T, Martínez-González J, **Vilahur G**, Badimon L. Differential intracellular trafficking of von Willebrand factor (vWF) and vWF propeptide in cells lacking Weibel-Palace bodies.
Atherosclerosis 2003;167(1):55-63

Sánchez S, **Vilahur G**, Casaní L, Badimon L. Efecto de la inhibición de la vía del factor tisular en la respuesta plaquetar a la lesión vascular.
Invest Cardiovasc 2003; 6:42-53.

Badimon L, **Vilahur G**, Sánchez S, Duran X. Atheromatous plaque formation and thrombogenesis : formation, risk factors and therapeutic approaches.
European Heart Journal 3 (suppl I):I16-I22; 2001.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato.
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico.
ATP	Adenosina trifosfato.
BH4	Tetrahidrobiopterina.
CAPRIE	<i>Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events.</i>
CAPTURE	<i>c7E3 Fab Antiplatelet Therapy in Unstable Refractory Angina.</i>
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico.
SMC	Células musculares lisas.
COX-2	Ciclooxigenasa-2.
CURE	<i>Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events.</i>
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio.
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial.
ET-1	Endotelina-1.
FDA	<i>Food and Drug Administration (USA).</i>
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio.
GC	Guanilato ciclasa.
GP	Glicoproteína.
GSNO	S-nitrosoglutation.
IS-5-MN	Isosorbide 5 Mononitrato.
ICAM	Molécula de adhesión intercelular.
LAPP	<i>Leech Anti-Platelet Protein.</i>
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1.
ECM	Matriz extracelular.
MMP	Metaloproteasas.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
NO	Óxido nítrico.
ONNO-	Peroxinitrito.
ONNOH	Peroxinitroso.
PAIs	Inhibidores del activador del plasminógeno.
PCI	Intervención Coronaria Percutánea.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PGI₂	Prostaciclina-2.
PRISM	<i>Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management</i>

PURSUIT	<i>Platelet IIb/IIIa in Unstable angina: Receptor Supression Using Integrilin Therapy.</i>	90A
RGD	Secuencia 1744-1746 (arg-gly-asp) receptor glicoproteico IIb/IIIa	77A
ROK	Rho Kinasa.	84B
ROS	Especies reactivas de oxígeno.	279A3
TF	Factor tisular.	2479A3
TNF-α	Factor de necrosis tumoral - α .	742B
t-PA	Activador tisular del plasminógeno.	281C
TXA2	Tromboxano A2.	2-200
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares.	287C3
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial.	730C2
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad.	2879A
vWf	Factor de von Willebrand.	2-173
WOSCOPS	<i>West of Scotland Coronary Prevention Study.</i>	40A

PRESENTACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares isquémicas constituyen la principal causa de muerte en naciones industrializadas y una de las más importantes en países en vías de desarrollo. La enfermedad aterotrombótica es una enfermedad difusa, que empieza ya en la niñez y progresa de una manera asintomática durante la vida adulta; es a partir de la tercera o cuarta década cuando empieza a manifestarse clínicamente. Cuando estas lesiones crecen pueden, eventualmente, limitar el flujo sanguíneo, produciendo los síntomas de isquemia crónica. Si la progresión es rápida, como en el caso de la rotura de la placa acompañada con trombosis luminal, se producen los síndromes agudos (Fuster V et al, 1992 y 1994; Badimon JJ et al., 1993; Davies MJ., 2001). Debido a la complejidad y a los numerosos procesos que intervienen en esta patología, actualmente existen diversas líneas farmacológicas destinadas a su tratamiento. Los fármacos antitrombóticos han sido y son ampliamente utilizados en la práctica clínica; de entre ellos el más representativo es, probablemente, la aspirina. Ésta ha demostrado ser efectiva en la prevención de eventos vasculares en diferentes ensayos clínicos, tanto a corto como a largo plazo (Patrono C., 2001). Sin embargo, a pesar de los beneficios obtenidos con los salicilatos y otros antitrombóticos, estos grupos farmacológicos no erradican completamente los eventos trombóticos (Harker L et al., 1996). Ello ha derivado en un creciente progreso en el desarrollo de nuevas estrategias dirigidas a actuar sobre los receptores del ADP, el receptor del fibrinógeno (complejo GPIIb/IIIa), inhibidores específicos de la trombina y los nuevos donadores de óxido nítrico (Dogne et al., 2002)

Esta tesis se centra en el estudio de las propiedades antiplaquetares / antitrombóticas de nuevos fármacos destinados al tratamiento de la enfermedad aterotrombótica, con la finalidad de esclarecer la manera por la cual son capaces de aportar beneficios apreciables desde el punto de vista clínico.

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

Las dos hipótesis clásicas sobre el origen de la arteriosclerosis, la hipótesis de incrustación de material trombótico y la de imbibición de material lipídico, se han integrado en una hipótesis multifactorial, de respuesta de la pared a la lesión o respuesta de reparación celular, que además de la trombosis o los lípidos, considera otros muchos factores causales (hipertensión, diabetes, hábito tabáquico, agentes infecciosos, etc.). De acuerdo con esta hipótesis, la coexistencia de uno o más factores de riesgo contribuyen a la ocurrencia de una lesión endotelial mínima o disfunción endotelial. Dicha anomalía endotelial facilita la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la pared, éstas son un potente estímulo inflamatorio que provoca la infiltración de monocitos circulantes. En el espacio subendotelial los monocitos se diferencian a macrófagos que captan de forma masiva lípidos y se transforman en células espumosas. De esta manera se agrava la lesión endotelial que puede complicarse con la adhesión y la agregación de las plaquetas. Los factores de crecimiento, citoquinas y otras sustancias liberadas por las células endoteliales, (los monocitos/macrófagos, las plaquetas y linfocitos T) potencian la migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular (ECM) por parte de las células musculares lisas (SMC). El resultado es una respuesta inflamatoria y fibroproliferativa crónica que hace progresar las lesiones (Fuster V y cols., 1992a). La rotura o erosión de las lesiones ateroscleróticas induce la exposición de superficies protrombóticas que provocan la activación de las plaquetas y la formación de trombos. Dichos trombos pueden producir complicaciones clínicas o bien contribuir al crecimiento de la placa de forma asintomática (*Figura 1*).

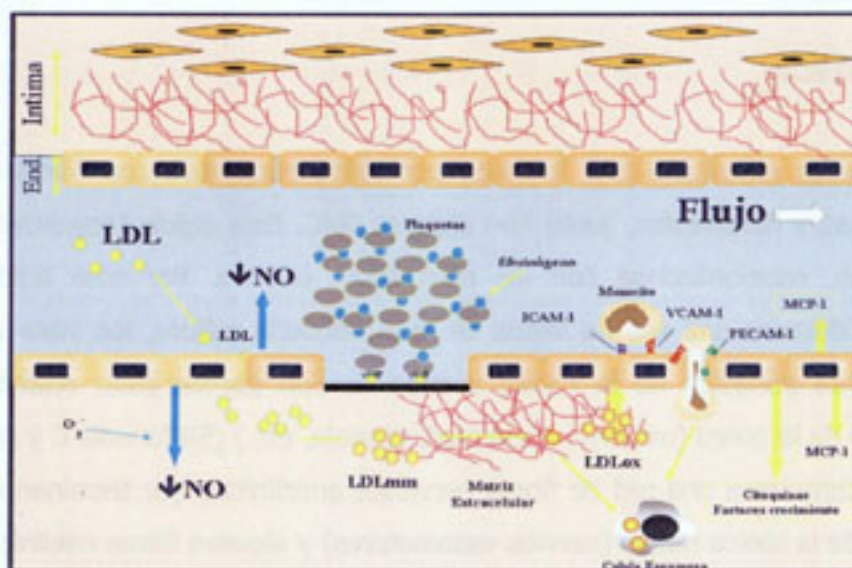


Figura 1.- Esquema gráfico de la evolución del proceso aterotrombótico.

2. SISTEMA ARTERIAL

2.1 ESTRUCTURA DE UNA ARTERIA

La estructura de la pared arterial se repite en todos los tipos de arterias, variando la proporción de algunos de los elementos de las mismas (láminas elásticas y SMC) según el territorio en el que se encuentren. Se compone básicamente de tres capas concéntricas: íntima, media y adventicia.

2.1.1 ÍNTIMA

La túnica íntima está formada por endotelio y subendotelio o capa basal, que limita con la lámina elástica interna. El endotelio está formado por una monocapa de células endoteliales que revisten la luz del vaso. El subendotelio es la lámina basal, constituida por una tenue capa de tejido conjuntivo; debajo, se halla la lámina elástica interna, formada por una malla compacta de elastina con fenestraciones distribuidas regularmente.

2.1.2 MEDIA

La túnica media es la de mayor grosor. Está formada por SMC dispuestas circular o helicoidalmente respecto al eje del vaso, formando capas que se alternan con capas elásticas. Esta túnica está limitada exteriormente por la lámina elástica externa e internamente por la lámina elástica interna. Estas láminas son hojas de fibras elásticas con fenestraciones que permiten el paso de sustancias y de células en ambas direcciones.

2.1.3 ADVENTICIA

La túnica adventicia está formada por tejido conjuntivo con fibras de colágeno, fibras elásticas y fibroblastos, junto con algunas SMC. Este tejido conjuntivo se prolonga gradualmente, relacionándose con las estructuras vecinas. Por este tejido conjuntivo perivascular discurre una red de vasos de muy pequeño calibre, los *vasa vasorum*, que ocasionalmente penetran en la media y cuya función parece estar relacionada con el metabolismo de la pared (oxígeno, nutrientes, drenaje, etc.) (Stefanadis C y cols., 1995). También encontramos una red de fibras nerviosas amielínicas que terminan en las células musculares de la túnica media (nervios vasomotores) y algunas fibras mielínicas que llegan hasta la íntima, fibras sensitivas de los vasos.

2.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ARTERIAS SEGÚN SU CALIBRE

2.2.1 ARTERIAS DE GRAN CALIBRE

Presentan un predominio del material elástico en su túnica media (arterias elásticas) (*Figura 2*) y contienen múltiples lamelas de SMC limitadas en el exterior y el interior por una lámina elástica fenestrada. El número de unidades lamelares está en relación con el tamaño o la posición anatómica de la arteria. Estas arterias juegan un doble papel fisiológico: son conductoras y reguladoras del caudal sanguíneo. Debido a su elasticidad, transforman el flujo pulsante a la salida del corazón en flujo prácticamente continuo a nivel de las arteriolas. Ejemplos de este tipo de arterias lo encontramos en la aorta, a sus niveles torácico y abdominal, la arteria pulmonar, la arteria braquicefalia, la arteria carótida común, la arteria subclavia y las arterias ilíacas comunes. En comparación con su gran luz, la pared es relativamente delgada, ya que ocupa menos de una décima parte del diámetro del vaso (Ross R & Glomset JA., 1976).

2.2.2 ARTERIAS DE MEDIANO CALIBRE

Tienen un predominio de SMC en su túnica media, por lo que se denominan arterias musculares (*Figura 3*). La capa media de estas arterias está formada por láminas de células musculares entre las cuales hay fibras de colágeno y proteoglicanos. Fisiológicamente parece que su función es controlar la luz del vaso y regular el flujo sanguíneo. Ejemplos de este tipo de arterias son las arterias coronarias, la arteria poplítea, la arteria femoral y la arteria media cerebral. El espesor de la pared representa en la mayoría de los casos una cuarta parte del diámetro de la arteria (Ross R & Glomset JA., 1976).

2.2.3 ARTERIAS DE PEQUEÑO CALIBRE

Las arteriolas son las arterias más pequeñas cuya túnica media se reduce a una simple capa de SMC. En los lugares donde el flujo varía mucho, existen muchas arteriolas directamente conectadas con las vénulas por medio de derivaciones cortas en espiral, llamadas anastomosis arteriovenosas. Su diámetro oscila entre 12 y 15 micras. Forman parte esencial de los cuerpos carotídeos, aórtico y coccígeo.

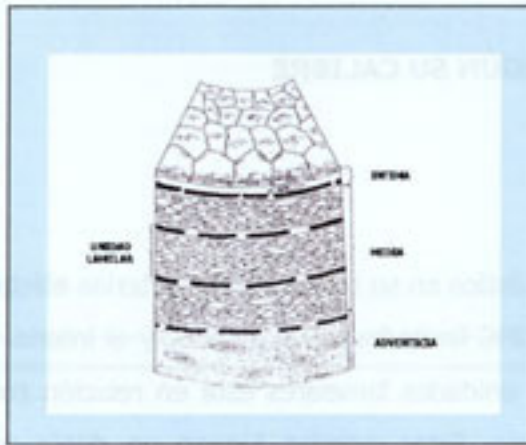


Figura 2.- Estructura de una arteria elástica sana (Ross R & Glomset JA., 1976).

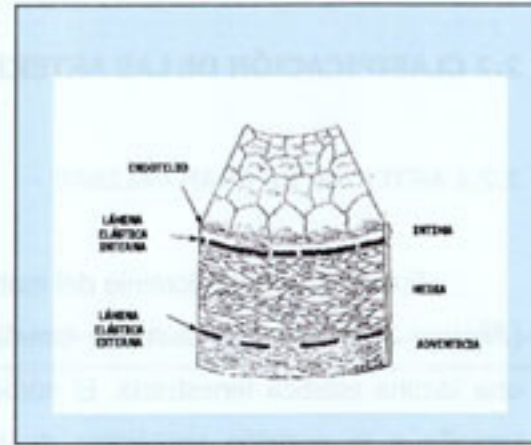


Figura 3.- Estructura de una arteria muscular sana (Ross R & Glomset JA., 1976).

3. PATOFISIOLOGÍA DE LA LESIÓN ATEROSCLERÓTICA

3.1 TIPOS DE LESIÓN

Los estudios morfológicos han proporcionado importantes respuestas sobre la evolución de la lesión aterosclerótica (Stary HC., 2000). Todos los humanos desarrollan engrosamientos focales, excéntricos, en la capa íntima de arterias de medio y gran tamaño (engrosamiento adaptativo de la íntima), debido a la proliferación de células musculares lisas (SMC) como respuesta a fuerzas mecánicas locales, inducidas por el flujo sanguíneo especialmente en zonas de bifurcaciones arteriales. Además de provocar un engrosamiento adaptativo, las fuerzas mecánicas de flujo en estas zonas favorecen la permeabilidad de moléculas circulantes como lipoproteínas plasmáticas, albúmina y fibrinógeno. Estas lesiones aparecen ya a edades tempranas, de hecho hacia final de la segunda década la mayoría de personas han desarrollado lesiones en la capa íntima (Tipo I y II). En tales lesiones, se encuentran grupos aislados de macrófagos, sin o con inclusiones lipídicas, sobre todo ésteres de colesterol (células espumosas). La lesiones iniciales Tipo I son sólo identificables bioquímica y microscópicamente, mientras que las lesiones Tipo II son visibles macroscópicamente como puntos grasos o estrías mínimamente elevadas en el lumen de las arterias (estrías grasas). Presentan una mayor proporción de macrófagos cargados de lípidos que las lesiones Tipo I. Cada lesión está formada por una o más capas de células espumosas y se acompañan ocasionalmente por SMC que también contienen inclusiones lipídicas. En los lugares en los que se encuentran preferentemente las estrías grasas se desarrollan formas de transición hacia placas avanzadas. La progresión de estas placas más allá de la fase de estría grasa, se asocia con una secuencia de cambios que se inician con la aparición de acúmulos múltiples y difusos de lípidos extracelulares (lesión de

Tipo III). Los acúmulos múltiples y difusos de lípido extracelular pueden progresar a una acumulación única más grande de lípido extracelular que se encuentra sobre todo como colesterol libre y sus ésteres formando el núcleo lipídico que es característico de las lesiones Tipo IV (ateroma). Estas lesiones contienen gránulos de calcio, los cuales se localizan extracelularmente en el núcleo lipídico o en el interior de algunas SMC. Las lesiones Tipo V se caracterizan porque las SMC migran hacia el núcleo lipídico y proliferan dentro del mismo formando una capa sobre su cara luminal. Esta lesión se conoce como fibroateroma. Habitualmente se produce más colágeno y la placa aumenta su tamaño haciendo que el núcleo lipídico quede sin perfusión, es decir, avascular y acelular, consistiendo de un *debris* pultáceo que incluye macrófagos y células mesenquimales muertas con abundantes cristales de colesterol libre que constituye el *gruel* lipídico. Las lesiones que tienen depósitos trombóticos visibles con o sin hemorragia, además de lípido y colágeno, se refieren como placas fibroateromatosas complicadas o lesiones complejas, y se clasifican como lesiones Tipo VI. La categorización de Tipo VII se reserva para las placas avanzadas y mineralizadas (lesión calcificada). Finalmente, las lesiones ateroscleróticas que consisten casi enteramente en colágeno fibrilar, donde el lípido puede de hecho haberse reducido, se refieren como lesiones Tipo VIII.

3.2 LA LESIÓN INICIAL

Desde en punto de vista funcional, la primera manifestación de la arteriosclerosis es una disfunción endotelial que se define como una disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO).

3.2.1 EL ENDOTELIO: papel del óxido nítrico

El endotelio es un verdadero órgano multifactorial, capaz de monitorizar estímulos - tanto de origen sistémico como local- y modificar su estado funcional contribuyendo a mantener la homeostasis de la pared vascular. Su situación le hace especialmente sensible a cambios en las condiciones hemorreológicas que soporta. De hecho, la expresión de un elevado número de genes que regulan las funciones del endotelio es modulada por las condiciones de flujo, ya que en su promotor contienen elementos de respuesta a la velocidad de cizalladura de la sangre. La naturaleza de estos genes es diversa: enzimas reguladoras del tono vascular (óxido nítrico sintasa endotelial, eNOs; y ciclooxigenasa-2, COX-2), factores trombóticos y fibrinolíticos (factor tisular, TF; activador del plasminógeno tisular, t-PA; trombomodulina), quimoquinas (proteína quimiotáctica para monocitos tipo 1,

MCP-1), moléculas de adhesión; factores de crecimiento citoquinas y protooncogenes (c-fos, c-myc).

En condiciones fisiológicas el endotelio presenta una superficie con propiedades no trombogénicas (es inerte a la activación de las plaquetas o para la activación de los componentes enzimáticos de la cascada de la coagulación). La tromboresistencia del endotelio vascular se produce debido a diversas propiedades: por un lado, las células endoteliales están cargadas negativamente, una característica que induce la repulsión de las plaquetas que están cargadas negativamente y por otro, las células endoteliales sintetizan NO y prostaciclina (PGI_2), que son inhibidores de la agregación plaquetaria, además de los cofactores que inhiben la acción de la trombina. Dichos cofactores son la trombomodulina, un receptor de superficie y el heparan-sulfato, un glicosaminoglicano que activa a la antitrombina III (**Figura 4**). El endotelio también protege contra la trombogénesis, mediante la elevación de los activadores del plasminógeno, que en presencia de fibrina, promueven la fibrinólisis y la consiguiente disolución del coágulo (Michiels C., 2003).

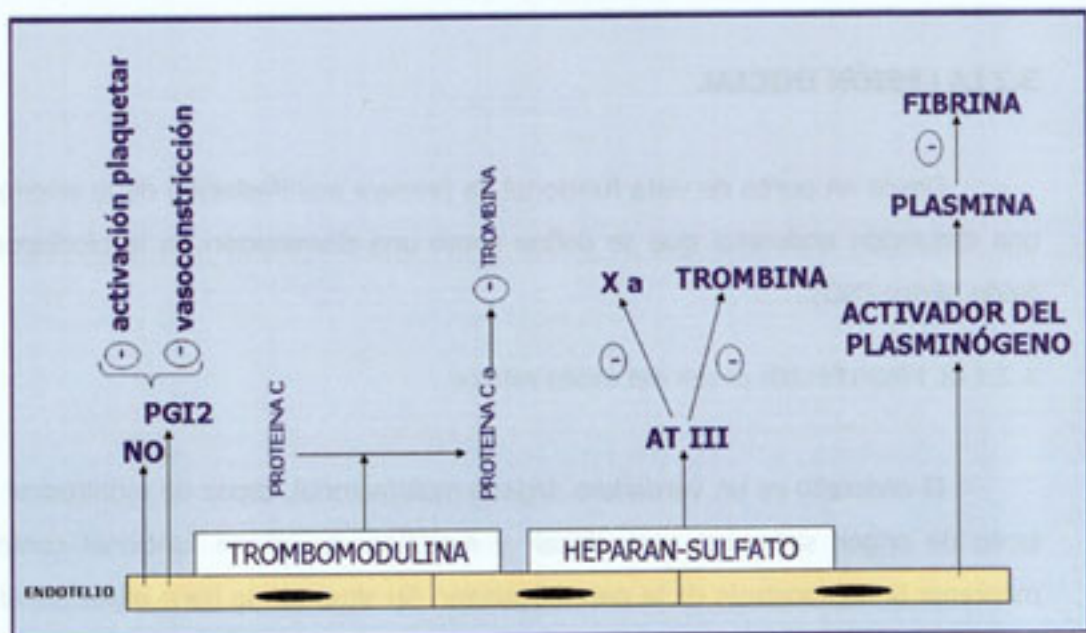


Figura 4. Diagrama simplificado del papel del endotelio en el control de la hemostasia.

Otra importante función del endotelio es la de regular el tono vascular mediante la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas que promueven vasodilatación (NO, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio y la PGI_2) o bien vasoconstricción (endotelina-1, ET-1; endoperóxidos; tromboxano A₂, TXA₂). El tono vascular es también

regulado por los efectos sobre el endotelio de los niveles circulantes de angiotensina II y bradiquinina.

NO: óxido nítrico

En 1980, Furchgott RF y Zawadzki JV descubrieron un potente vasodilatador liberado por el endotelio de fragmentos intactos de aorta en respuesta a agonistas muscarínicos. A esta sustancia la llamaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Siete años después, Ignarro LJ y cols., y Palmer RH y cols., concluyeron, en estudios independientes, que EDRF y el NO eran la misma molécula. Sin embargo, basándonos en la cortísima vida media del NO (1-10 μ s. en sangre y 1 s. en tejido) y en que su ratio de difusión es de 100-170 nm en sangre y unos 50 μ m/s en tejido (unas 5 a 6 células) (Gally JA y cols., 1990), el NO sólo podría ejercer su acción a poquísima distancia del lugar de su síntesis. La respuesta nacería años más tarde cuando se observó la elevada afinidad del NO por interaccionar con grupos tiol, convirtiéndose así en S-nitrosotioles. Ello derivó a que la mayoría de los investigadores consensuaran que, a pesar de las enormes similitudes entre el NO y el EDRF, la bioactividad de EDRF no está solamente relacionada con el NO. También interviene la presencia de otras importantes moléculas, como las moléculas obtenidas mediante la unión covalente del NO con grupos -SH presentes en determinadas proteínas (i.e. albumina, hemoglobina) o tioles de bajo peso molecular (i.e. glutatión, cisteína), formando los denominados S-nitrosotioles (S-nitrosoalbumina, S-nitrosohemoglobina, S-nitrosoglutatión y S-nitrosoacetilcisteína respectivamente) (Myers RR y cols. 1990). De hecho, Rassaf T. (2002) demostró que la mayoría de los efectos sistémicos tras la administración intravenosa de NO eran mediados tras su conversión a S-nitrosotioles. En este sentido, el S-nitrosoglutatión (GSNO) ha sido detectado en plasma a concentraciones de 0.1 μ mols/L y se ha visto involucrado en la transferencia de NO desde la NOS a la guanilato ciclasa (GC).

La conversión de NO a S-nitrosotioles permite almacenar el NO, protegerlo de su descomposición (especialmente por la hemoglobina) y transportarlo a dianas más alejadas (Stamler JS y cols., 1992 a y b). Su mecanismo de formación se desconoce (la reacción entre un grupo tiol y el NO no da S-nitrosotioles) y se sugiere que los mecanismos que derivan en su descomposición (iones metálicos, Cu⁺, Fe²⁺; descomposición enzimática; exposición fotónica o térmica y reacción con la vitamina C) serían los responsables de la liberación de NO (Hogg N., 2002). Concretamente, la presencia y concentraciones de iones

cobre y hierro y de oxihemoglobina son críticos para determinar si los S-nitrosotioles pueden ser usados como reservorios de NO.

El superóxido (O_2^-) también descompone GSNO para formar NO (Aleryani y cols. 1998); sin embargo, el NO liberado en presencia de superóxido forma rápidamente peroxinitrito ($ONNO^+$) (Beckman y cols., 1996) el cual genera a su vez ácido peroxinitroso ($ONNOH$) y posteriormente se descompone en el radical hidroxilo (OH) y el radical nitro ($-NO_2$). Estos últimos radicales son altamente reactivos y participan en la peroxidación lipídica y en la nitración de ciertos aminoácidos que forman proteínas, pero no son responsables de los efectos vasodilatadores y antiplaquetares obtenidos tras la liberación del NO.

Como se ha mencionado anteriormente, el NO tiene un papel preponderante en la regulación del tono vascular y en la inhibición de la agregación plaquetaria pero también interviene en muchos otros procesos involucrados en la patogénesis de la arteriosclerosis (**Tabla 1**).

DIANA	ACCIÓN
Endotelio	<ul style="list-style-type: none"> - Modula la permeabilidad - Inhibe la adhesión leucocitaria - Promueve la migración - Aumenta la proliferación
SMC	<ul style="list-style-type: none"> - Inicia la relajación - Inhibe la proliferación
Plaquetas	<ul style="list-style-type: none"> - Reduce la activación - Disminuye la agregación - Limita la adhesión
Leucocitos	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibe la adhesión y diapédesis

Tabla 1.- Principales dianas y acciones del NO.