

SALVADOR MONCADA

DISCURSO DE PRECEPTO
«AVENTURAS EN FARMACOLOGIA:
VEINTE AÑOS DE CASUALIDAD Y DISEÑO»

Separata

de los

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

TOMO CXI

CUADERNO CUARTO



MADRID, 1994

AVENTURAS EN FARMACOLOGIA: VEINTE AÑOS DE CASUALIDAD Y DISEÑO

Por el Excmo. Sr. D. SALVADOR MONCADA

Académico de Honor

Excmo. Sr. Presidente

Sres. Académicos

Sras. y Sres.

Quisiera, antes de comenzar, recordar a don Severo Ochoa desaparecido hace algunas semanas aquí en Madrid, talento y orgullo de la biología española. Quisiera, además, recordar a doña Amparo Pérez Carnicero, desaparecida hace algunos días, esposa y compañera de don Benigno Lorenzo Velázquez, maestro de varias generaciones de farmacólogos españoles.

Es un gran placer y un inmenso honor estar con vosotros esta noche para agradecer profundamente el generoso reconocimiento que me habeis concedido al elegirme Académico de honor de esta ilustre corporación. Me complace especialmente agradecer a los profesores Amador Schuller, Jesús Fernández Tresguerres y Alberto Portera que propusieron mi candidatura y por supuesto a todos vosotros que tuvisteis a bien elegirme por unanimidad de voto. A Pedro Sánchez García, mi entrañable profesor y querido amigo por más de 30 años, le debô todo el apoyo y la confianza que ha tenido en mi y en mi trabajo.

Voy a referirme a mi trabajo científico de los últimos 20 años. Pero no a mi trabajo en general sino a las situaciones en las que puedo discernir el proceso de descubrimiento. Son estos pocos momentos misteriosos que se resuelven en esa incomparable sensa-

ción de maravilla que es el descubrimiento científico, los que alcanzan para abastecer de esperanza la duda existencial que nos domina.

Voy, además, a referirme a la ciencia experimental llevada a cabo no como consecuencia de inmensa tecnología, que es el signo de nuestra época, sino como resultado del uso de la curiosidad y del ingenio aplicados a la más sencilla de todas las técnicas de la biología experimental: el ensayo biológico.

PRINCIPIOS DEL BIOENSAYO

En farmacología, los ensayos biológicos en animales de laboratorio se han venido utilizando, de una u otra forma, desde los comienzos del siglo XIX. Sin embargo, el empleo de órganos aislados con estos fines se inició posteriormente. En 1869, Reimann observó que si separaba el útero del cuerpo y lo mantenía en una cámara a temperatura corporal, dicho órgano experimentaba movimientos peristálticos rítmicos y sobrevivía por un período razonablemente largo (1). A partir de entonces se desarrolló rápidamente el empleo de tejidos y órganos con distintos propósitos, incluyendo la detección cuantitativa de catecolaminas en solución, empleando músculo intestinal, tejido vascular o membrana nictitante y el ensayo de 5-hidroxitriptamina, en útero de rata. En la mayoría de los casos, el órgano aislado se hallaba inmerso en una solución fisiológica que se renovaba a intervalos frecuentes.

Nosotros en cambio utilizamos un tipo de bioensayo conocido como bioensayo de superfusión, en el que el tejido no está inmerso sino que la solución fisiológica fluye sobre su superficie. La historia de esta técnica es bastante reciente, pues comenzó en 1953 con la publicación de John Gaddum «La técnica de superfusión» (2). Este sistema, según John Gaddum tiene la ventaja de una mayor sensibilidad, ya que los materiales investigados pueden aplicarse sin dilución sobre el tejido, lo que resulta particularmente adecuado para sustancias de acción lenta. Una importante adición a la técnica del ensayo en superfusión fue hecha unos años más tarde por John Vane. Esta consistió en la superfusión en serie de tejidos de bioensayo a modo de cascada (3). Obviamente, en un sistema fluvente de estas características, no sólo se puede emplear soluciones fisiológicas sino también sangre de animales, como circulación extracorpórea. Cada tejido de bioensayo responde de una manera ca-

racterística y reproducible a una sustancia vasoactiva dada; la superfusión de una determinada combinación de tejidos proporciona una forma de reconocimiento específico y una medida cuantitativa de las sustancias vasoactivas cuyo perfil de actividad biológica ha sido determinado previamente (fig. 1). Además, y probablemente de mayor trascendencia, es que esta técnica proporciona la base para el descubrimiento de sustancias no identificadas, a las cuales los tejidos de bioensayo responden, a su vez, de una manera inesperada. Esta técnica versátil ha sido el centro de gran parte de nuestro trabajo en los últimos 20 años y nos ha permitido a mis colegas y a mi realizar las contribuciones que describiré a continuación.

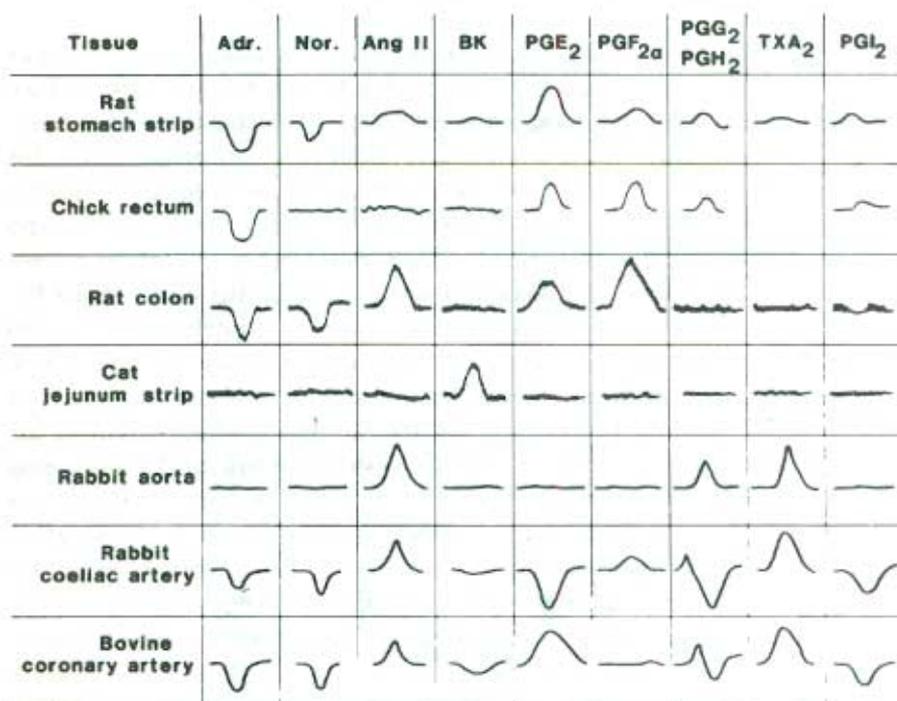


FIG. 1.—Perfiles de bioensayo de diversas sustancias vasoactivas. Los agonistas contraen, relajan o carecen de efecto en los tejidos utilizados para el bioensayo: Adr = Adrenalina; Nor = Noradrenalina; Ang II = Angiotensina II; BK = Bradiquinina, PGE₂ = Prostaglandina E₂; PGF_{2α} = Prostaglandina F_{2α}; PGG₂ y PGH₂ = Endoperóxidos de prostaglandina; TXA₂ = Tromboxano A₂; PGI₂ = Prostaciclina

MECANISMO DE ACCION DE LA ASPIRINA Y FARMACOS RELACIONADOS

En 1971 tuve el privilegio de incorporarme al grupo dirigido por John Vane en el Departamento de Farmacología del Real Colegio de Cirujanos. Durante los meses previos, este grupo había desarrollado ciertas ideas que sugerían que los fármacos del tipo de la aspirina podrían estar inhibiendo la síntesis de prostaglandinas (4). Por esas fechas se estaba investigando las acciones biológicas de las únicas prostaglandinas conocidas PGE_1 , $PGF_{1\alpha}$; PGE_2 y $PGE_{2\alpha'}$ y aunque se sabía que el precursor metabólico era el ácido araquidónico, los detalles de la ruta bioquímica no estaban completamente dilucidados (5).

La primera tarea que se me asignó fue investigar si las acciones inducidas por el ácido araquidónico en una serie de tejidos de bioensayo podían inhibirse por aspirina. Esto lo demostré rápidamente. Mis resultados estaban, además, de acuerdo con otros obtenidos en homogeneizados de pulmón de cobayo que demostraban inhibición de la formación de prostaglandinas por tres fármacos de tipo de la aspirina: la propia aspirina, indometacina y salicilato de sodio (6). Al cabo de unas pocas semanas, trabajando con Sergio Ferreira y utilizando el bazo de perro, aislado y perfundido, como fuente de prostaglandinas y una cascada de tejidos de bioensayo, confirmamos la inhibición de la liberación de prostaglandinas por fármacos del tipo de la aspirina (7, fig. 2). Estos experimentos, así como los llevados a cabo por Smith y Willis empleando plaquetas humanas como fuente de prostaglandinas (8), demostraron que los fármacos del tipo de la aspirina inhiben la biosíntesis de prostaglandinas y sugirieron que este es el mecanismo que explica las acciones anti-inflamatorias, analgésicas y antipiréticas de dichos compuestos, así como probablemente algunos de sus efectos colaterales.

Estos hallazgos sentaron las bases de mis siguientes dos años y medio de trabajo, investigando el papel que juegan las prostaglandinas en los procesos de inflamación y dolor. Asimismo estudié la hipótesis que postulaba que las prostaglandinas podrían estar implicadas en la modulación de la neurotransmisión simpática. Los frutos de mi trabajo de este período se plasmaron en diversos artículos (9, 10) y revisiones (11), así como en mi Tesis Doctoral (12). Básicamente éstos demostraron que, tanto en inflamación como en dolor las prostaglandinas no actúan como mediadores de ninguno

de los signos o síntomas sino como moduladores, proporcionando un sistema de amplificación el que es reducido por fármacos del tipo de la aspirina. Estos hallazgos, así como la hipótesis general, fueron confirmados por diversos laboratorios de todo el mundo. Más aún, estos fármacos acabaron siendo las herramientas farmacológicas y bioquímicas más importantes para investigar el papel de las prostaglandinas en el organismo. El descubrimiento del mecanismo de acción de los fármacos del tipo de la aspirina condujo a su empleo en situaciones nuevas tales como la prevención del parto prematuro, la estimulación del cierre del ductus arteriosus persistente y el tratamiento del síndrome de Bartter (13).

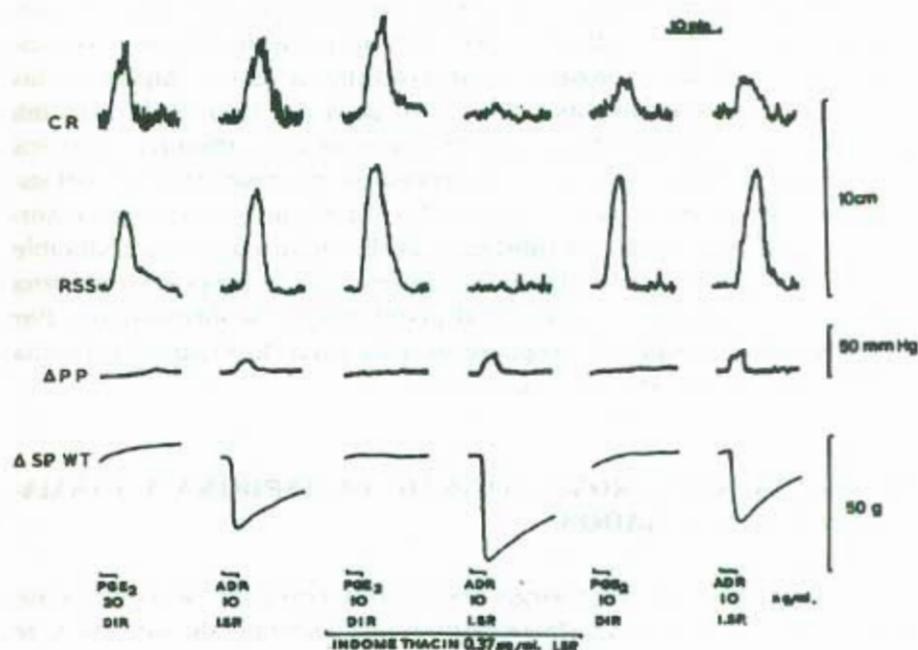


FIG. 2.—La indometacina previene la liberación de prostaglandinas inducida por Adrenalina en el bazo perfundido de perro. Una muestra del efluente esplénico fue utilizada para perfundir los tejidos de bioensayo (CR = recto de pollo; RSS = Tiras de estómago de rata). Los cambios en la presión de perfusión y peso (SP.WT) también se controlaron. Indometacina (0.37 μg/ml) se añadió al efluente esplénico excepto cuando fue reinfundido en el bazo (I.SP). Prostaglandina PGE₂ (20 ng/ml) produjo contracción de los tejidos de bioensayo. La infusión de indometacina en el bazo abolió la liberación de prostaglandinas. Este efecto desapareció aproximadamente a los 70 min. de terminar la infusión de indometacina. Estos datos pertenecen a la referencia 7.

Uno de los objetivos principales en los últimos 20 años ha sido encontrar fármacos desprovistos en los efectos colaterales de estos compuestos, buscando sustancias que pudiesen inhibir la generación de prostaglandinas en el lugar de la inflamación, pero sin afectar a la enzima generadora de prostaglandinas (ciclo-oxigenasa) en la mucosa del estómago. Recientemente esta búsqueda ha sido asistida por el descubrimiento de dos tipos de ciclooxigenasa, una de tipo constitutivo y otra isoforma inducible. La primera, cuya estructura tridimensional ha sido descrita recientemente (14), se encuentra presente en el endotelio vascular, mucosa gástrica y otros tejidos y es responsable de la formación de metabolitos del ácido araquidónico que llevan a cabo funciones fisiológicas. La segunda, se ha demostrado recientemente que es inducida en células migratorias, y en otros tipos celulares, por estímulos inflamatorios y por citoquinas (15). Este hallazgo ha sugerido una atractiva hipótesis: las acciones anti-inflamatorias de los fármacos del tipo de la aspirina se deben a la inhibición de la enzima inducible, mientras que los efectos indeseables (tales como la irritación del revestimiento del estómago) tienen su origen en la inhibición de la isoforma constitutiva (15). El diseño de un inhibidor de la ciclo-oxigenasa inducible permitirá confirmar esta hipótesis y posiblemente proporcionará una mejor aproximación terapéutica al problema de la inflamación. Por consiguiente, a pesar del progreso en esta área, la búsqueda de una nueva y mejor aspirina aún continúa.

LA ACCION ANTI-TROMBOTICA DE LA ASPIRINA Y FARMACOS RELACIONADOS

Quedaba todavía un rompecabezas por resolver: la aspirina inhibe la agregación plaquetaria, aumenta el tiempo de sangría y se ha sabido durante mucho tiempo que posee acción antitrombótica (16). El misterio consistía en que ninguna de las prostaglandinas conocidas hasta entonces inducía la agregación plaquetaria. Importantes pistas para la explicación de este fenómeno surgieron de la combinación de hallazgos previos y de nuevos avances en el conocimiento de la vía metabólica del ácido araquidónico. En 1969, Priscilla Piper y John Vane describieron la liberación de una sustancia capaz de contraer la aorta del conejo (rabbit aorta contracting substances, RCS), cuya síntesis se inhibía con los fármacos del tipo de

la aspirina (17). Se sabía, además, que microsomas obtenidos de plaquetas producían un potente agregante de las plaquetas humanas (18) y, en 1974, se demostró que intermediarios inestables del metabolismo del ácido araquidónico, los endoperóxidos de las prostaglandinas, PGG_2 , y PGH_2 , eran a la vez agregantes plaquetarios y contraían el tejido vascular (19, 20). Todo ello condujo inicialmente a la creencia de que los endoperóxidos eran responsables de la actividad RCS descrita por Piper y Vane y proporcionó, por vez primera, una explicación para las acciones plaquetarias de la aspirina. Sin embargo, las vidas medias de RCS (< 2 min.) y de los endoperóxidos (aprox. 5 min.) eran diferentes y la cantidad de endoperóxidos liberados por el pulmón o por las plaquetas agregadas no era suficiente para explicar la actividad contráctil observada en la aorta de conejo. De ahí que Bengt Samuelsson con sus colegas, se propusieron buscar otra sustancia responsable de la actividad RCS. En 1975, ellos demostraron que las plaquetas incubadas con ácido araquidónico o con PGG_2 producían un compuesto activo muy inestable (vida media de 30 segundos), posteriormente identificado como tromboxano A_2 (TXA_2). Este era capaz de contraer en forma potente tiras de aorta e inducir la agregación plaquetaria (21), lo que permitió concluir que el componente principal del RCS formado en plaquetas y pulmón de cobayo es el TXA_2 .

El hallazgo de la conversión de endoperóxidos de prostaglandina en TXA_2 sugirió la existencia de una vía enzimática responsable de esta transformación. Esta fue la base del proyecto que iniciamos el verano de 1975 con muestras de endoperóxidos obtenidas del Instituto Karolinska en Estocolmo. Nuevamente utilizando como bioensayo la superfusión en cascada, identificamos una enzima en la fracción microsomal de la plaqueta que denominamos TX sintasa (22). El criterio que utilizamos en el bioensayo en cascada fue la transformación de la PGG_2 , sustancia con características RCS, en otra sustancia con las mismas propiedades pero de mayor potencia y menos estabilidad (fig. 3). Fue difícil llevar a cabo estos experimentos, ya que a $37^\circ C$ o aún a temperatura ambiente, el TXA_2 era extremadamente inestable y su actividad biológica desaparecía antes de ser transferido al bioensayo en cascada. Tras muchos esfuerzos, Stuart Bunting, un estudiante en ese tiempo, y yo diseñamos un sistema para incubar la enzima con el endoperóxido a $0^\circ C$. Esto retardó la conversión a TXA_2 y aumentó su estabilidad, resolviendo el problema. En forma concomitante empleamos la agrega-

ción de plaquetas como sistema de bioensayo y demostramos la acción potente del TXA_2 , comparada con los endoperóxidos de pla-

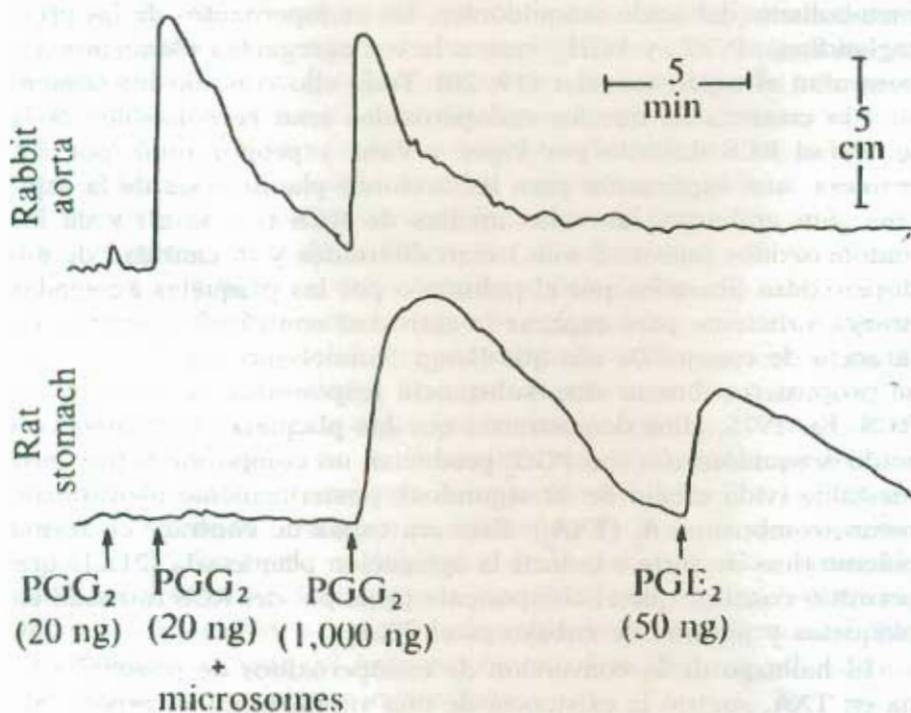


FIG. 3.—Bioensayo diferencial de sustancias que contraen la aorta de conejo: Endoperóxido de prostaglandina (PGG_2 , 200 ng) se añadió a 500 μl de Tris-buffer at 0°C y una muestra de 50 μl (equivalente a 20 ng) fue ensayada en los tejidos. Inmediatamente después se añadieron microsomas de plaquetas de caballo a la solución de PGG_2 . 50 μl de esta solución se ensayaron en los tejidos dos minutos más tarde. La figura muestra también la respuesta de los tejidos a 1000 ng de PGG_2 y 50 ng de PGE_2 . Figura tomada de la referencia 22.

quetas (fig. 4). Posteriormente, encontramos un inhibidor de esta enzima, el imidazol (23), que ayudó a la identificación de la TX sintasa, y además, sugirió una nueva posibilidad terapéutica ya que, teóricamente, los inhibidores de esta enzima estarían dotados de los mismos efectos antiplaquetarios que la aspirina (13).

Todo este trabajo esclareció la ruta plaquetaria de biotransformación del ácido araquidónico hacia los endoperóxidos por medio de la enzima ciclo-oxigenasa, y su ulterior conversión en TXA_2 me-

diente la TX sintasa. Se trataba de una vía metabólica única ya que, en la mayoría de los tejidos estudiados, los endoperóxidos se transforman en prostaglandinas estables mediante reacciones catalizadas por isomerasas y reductasas.

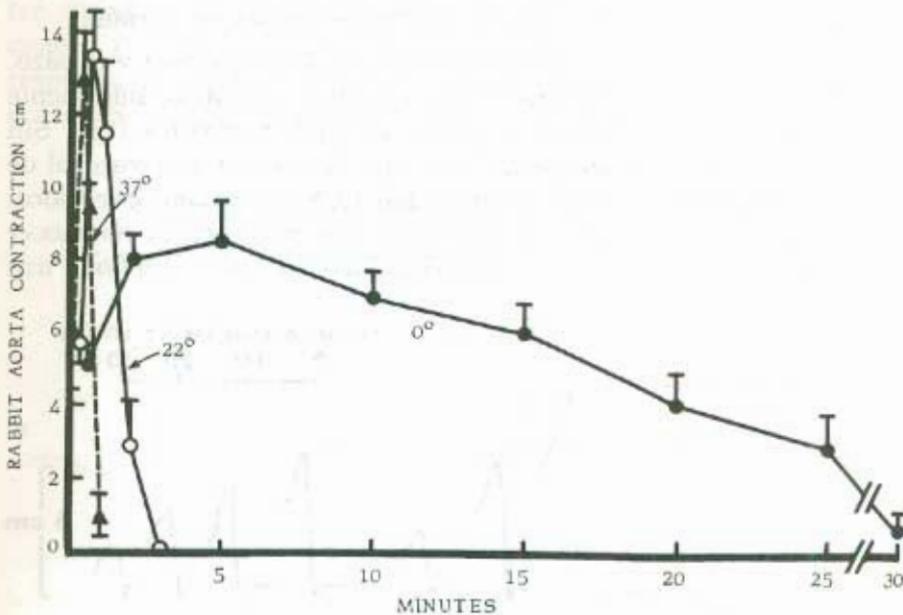


FIG. 4.—Curso temporal y dependencia de temperatura de tromboxano sintetasa. Prostaglandina G₂ (500 ng) fue añadida a 1 ml de Tris-buffer conteniendo microsomas de plaquetas e incubada a 0°C, 22°C o 37°C antes de ensayar 50 µl. Datos tomados de la referencia 22.

DESCUBRIMIENTO DE LA PROSTACICLINA Y ALGUNAS DE SUS CONSECUENCIAS

Durante la realización de este proyecto también decidimos investigar cuál era la distribución de la TX sintasa en el organismo. Para ello preparamos fracciones microsomales a partir de diferentes tejidos y los incubamos con endoperóxidos con el fin de estudiar la formación de TXA₂. Yo tenía particular interés en la pared vascular, ya que había pensado que el TXA₂ en caso de que fuese gene-

rado en los vasos podría actuar en sinergismo con aquel producido por las plaquetas. Si esto era correcto, nos ayudaría a entender el proceso de formación del tapón hemostático y, especialmente, la vasoconstricción inmediata que se produce tras cortar un pequeño vaso. Por otra parte, yo sabía que las plaquetas y el tejido vascular comparten algunas propiedades antigénicas (24), lo que sugería que ambas estructuras debían poseer ciertas proteínas en común.

Encontramos que varios tejidos, incluyendo el pulmón y el bazo, tenían la capacidad de generar TXA_2 , mientras que otros únicamente sintetizaban prostaglandinas a partir de endoperóxidos (25). Sin embargo, un hallazgo inesperado fue que la fracción microsomal de la pared vascular consumía la actividad RCS de los endoperóxidos, sin generar TXA_2 u otra prostaglandina que pudiésemos reconocer (fig. 5). Se trataba de un proceso enzimático, ya que se prevenía tras

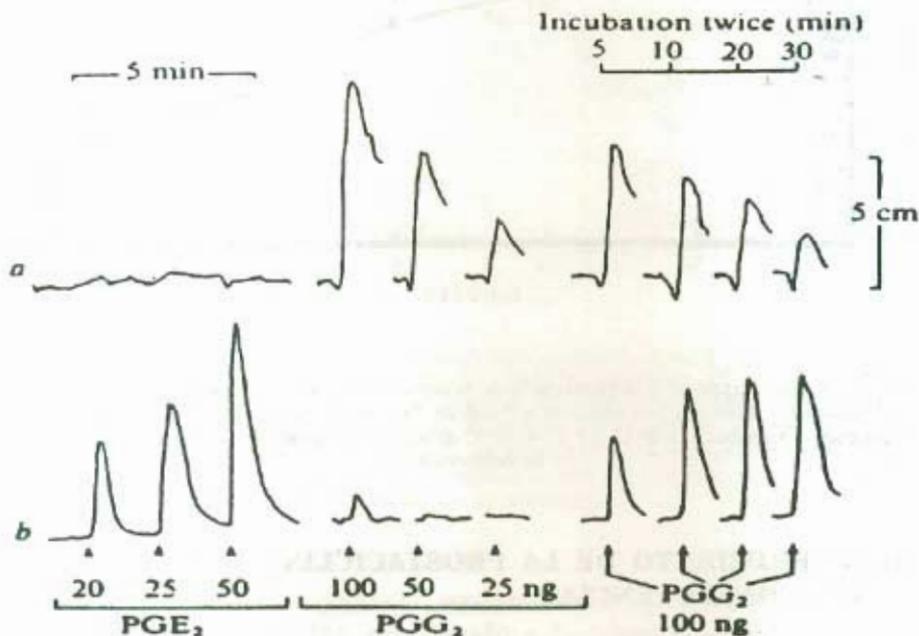


FIG. 5—Bioensayo utilizando tiras aorticas de conejo (a) y colon de rata (b). Prostaglandina PGE_2 contrae el colon de rata, mientras que PGG_2 (0.5 μg) fue incubada en 0.5 ml de Tris buffer a 22° C, y alícuotas de 100 μl fueron ensayadas en los tejidos a 5, 10, 20 y 30 min. La desaparición espontánea de PGG_2 (expresada como disminución en la contracción de la aorta de conejo) se vio asociada con la aparición de actividad de tipo PGE (expresada por el aumento de la contracción del colon de rata). Figura tomada de la referencia 27.

hervir la preparación microsomal (fig. 6). Más aún, el fenómeno observado no podía explicarse en términos de una ulterior conversión de alguna prostaglandina en un producto inactivo, ya que la PGE_2 o $\text{PGF}_{2\alpha}$ incubadas con fracción microsomal de aorta no perdían su actividad biológica. El producto formado, al que denominamos prostaglandina X (PGX), parecía tener cierta actividad vascular, puesto que relajaba tiras de arteria celiaca y mesentérica de conejo. Por esa época, habíamos descubierto que estos dos tejidos respondían a endoperóxidos de manera bifásica, esto es, con una contracción seguida de una relajación de larga duración (26).

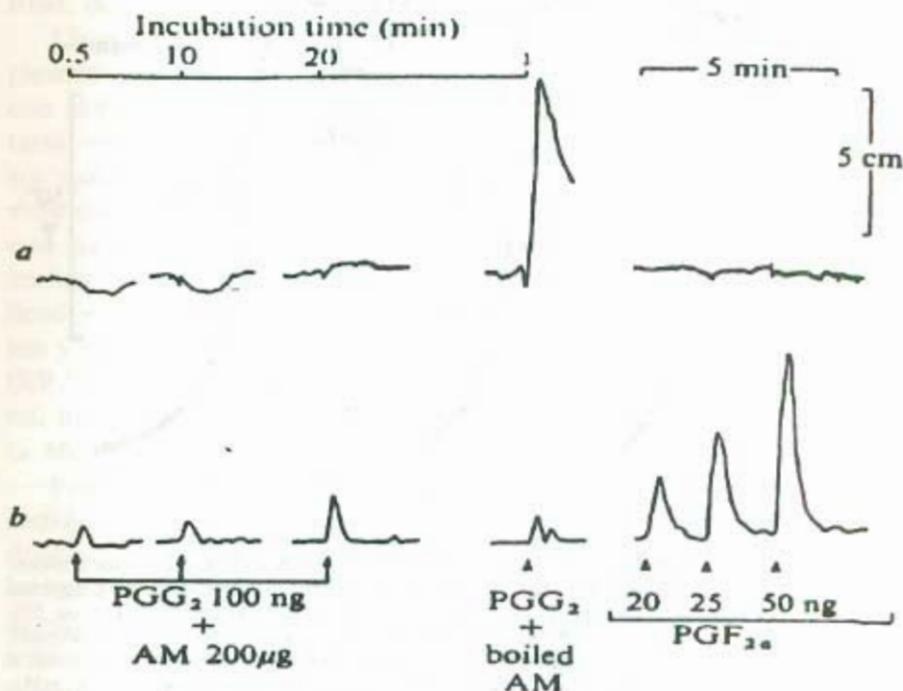


Fig. 6.—Efecto de microsomas aorticos (AM), sobre PGG_2 . PGG_2 (0.5 μg) fue incubada con AM (1 mg) en 0.5 ml de Tris buffer a 22° C y la actividad de alícuotas de 100 μl fue explorada, a 0, 5, 10 y 20 min. a) Representa tiras de aorta de conejo; b) Representa colon de rata. En presencia de AM la actividad contráctil de PGG_2 en tiras de aorta de conejo desaparece en 0.5 minutos, sin que se detecte la formación de PGE o PGF , aun cuando la incubación se haga durante 20 min. Microsomas (200 μg) hervidos e incubados con PGG_2 (100 ng) en Tris-buffer a 22° C durante 1 min., no afectan la actividad de PGG_2 en aorta de conejo. El efecto selectivo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ es también mostrado en el colon de rata. Figura tomada de la referencia 27.

Durante las semanas siguientes elaboramos varias hipótesis sobre la naturaleza de esta sustancia, incluyendo la posibilidad de que se tratara del ácido 12-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienoico (HHT), un producto inactivo de la degradación de endoperóxidos que genera malondialdehído al descomponerse. Esta, como todas las otras hipótesis resultaron incorrectas. Sin embargo, en diciembre de 1975 hicimos un descubrimiento importante al encontrar que PGX era un inhibidor muy potente de la agregación plaquetaria (27, fig. 7).

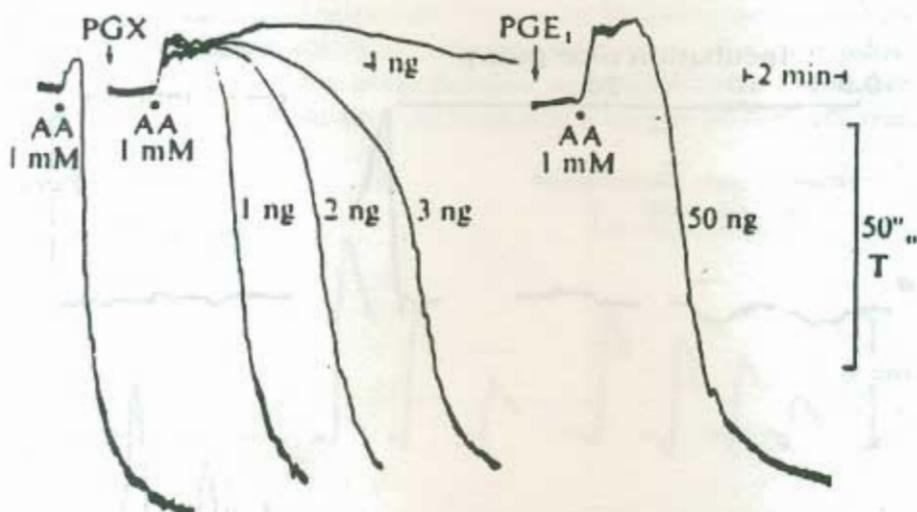


FIG. 7.—Comparación de la potencia anti-agregante de PGX y PGE_1 . La figura muestra los cambios en la transmisión de luz a través de plasma humano rico en plaquetas en un agregómetro. La PGX fue obtenida por incubación de 100 ng de PGH_2 con 500 μ g de microsomas aórticos en 100 μ l de Tris-buffer durante 2 min a 22° C y después conservados en hielo. PGX (1-4 ng) y PGE_1 (50 ng) cada una en 10 μ l, se añadieron a plasma humano rico en plaquetas 1 min, antes de ácido araquidónico (AA, 1 mM). En el experimento se muestra que PGX fue al menos 25 veces más potente que PGE_1 , como anti-agregante. Figura tomada de la referencia 27.

Stuart Bunting y yo ensayamos PGX en la agregación de plaquetas con una hipótesis simple; habíamos estado buscando TXA_2 , que es un vasoconstrictor e inductor de la agregación plaquetaria. En esa búsqueda nos habíamos tropezado con una sustancia vasodilatadora. ¿Podría este compuesto —pensé—, además, inhibir la agregación

plaquetaria y poseer, así, propiedades biológicas opuestas a las del TXA_2 ? ¡Efectivamente así fue!

La identificación de la estructura de la PGX fue otra fascinante historia de detectives. En un Congreso en Vale, Colorado a principios de 1976, asistimos a una charla de Cecil Pace-Asciak en la que éste describía la formación de un compuesto a partir de ácido araquidónico o de endoperóxidos de PG, la 6-ceto-PGF_{1 α} en estómago de rata (28). El desconocía por completo la actividad biológica de esta vía. Al concluir la charla, John Vane y yo nos preguntamos si en la formación de este compuesto existirían intermediarios biológicamente activos, ya que la 6-ceto-PGF_{1 α} parecía ser un producto final, desposeído en sí de actividad biológica.

Llamamos por teléfono a Inglaterra y pedimos a Richard Gryglewski que incubara microsomas de estómago con endoperóxidos con el fin de demostrar si se generaba alguna actividad antiplaquetaria, como sucede cuando se utiliza la fracción microsomal de vasos sanguíneos. Pocos días después teníamos la respuesta: el experimento había funcionado y sabíamos entonces que la PGX era casi con seguridad un producto intermediario de la transformación de endoperóxidos en 6-ceto-PGF_{1 α} . La dilucidación de su estructura se llevó a cabo mediante una colaboración entre biólogos de Wellcome y un grupo de químicos de la compañía Upjohn de Kalamazoo (EE.UU.). La estructura de la PGX y su nuevo nombre, prostaciclina, fueron hechos públicos en un Congreso que tuvo lugar en Santa Mónica, California el 3 de diciembre de 1976 (29).

Posteriormente, se demostró que tejidos de todas las especies, incluido el hombre, generaban prostaciclina. Esta posee un efecto dilatador en la mayoría de los lechos vasculares, incluida la circulación coronaria, y produce hipotensión. La prostaciclina inhibe la agregación plaquetaria mediante un aumento de las concentraciones intraplaquetarias de AMP cíclico. El hecho de que la prostaciclina inhiba la agregación plaquetaria a concentraciones mucho más bajas que las requeridas para inhibir la adhesión, hace pensar que esta substancia permite que las plaquetas se adhieran al tejido vascular con el cual interaccionan realizando así su papel de reparación vascular, a la vez de prevenir o limitar la formación de trombos (para revisión véase 13).

De esta manera los endoperóxidos son metabolizados en las plaquetas al agente pro-agregante y vasoconstrictor TXA_2 pero en la pared vascular son convertidos al factor vasodilatador, antiplaque-

tario, prostaciclina (fig. 8). Esto acoplado al descubrimiento posterior que enfermedades o condiciones médicas que favorecen el desarrollo de trombosis están asociadas a un aumento de TXA_2 y a una reducción de prostaciclina, ha llevado a nuevas ideas para el control de las condiciones tromboticas (para revisión ver 29).

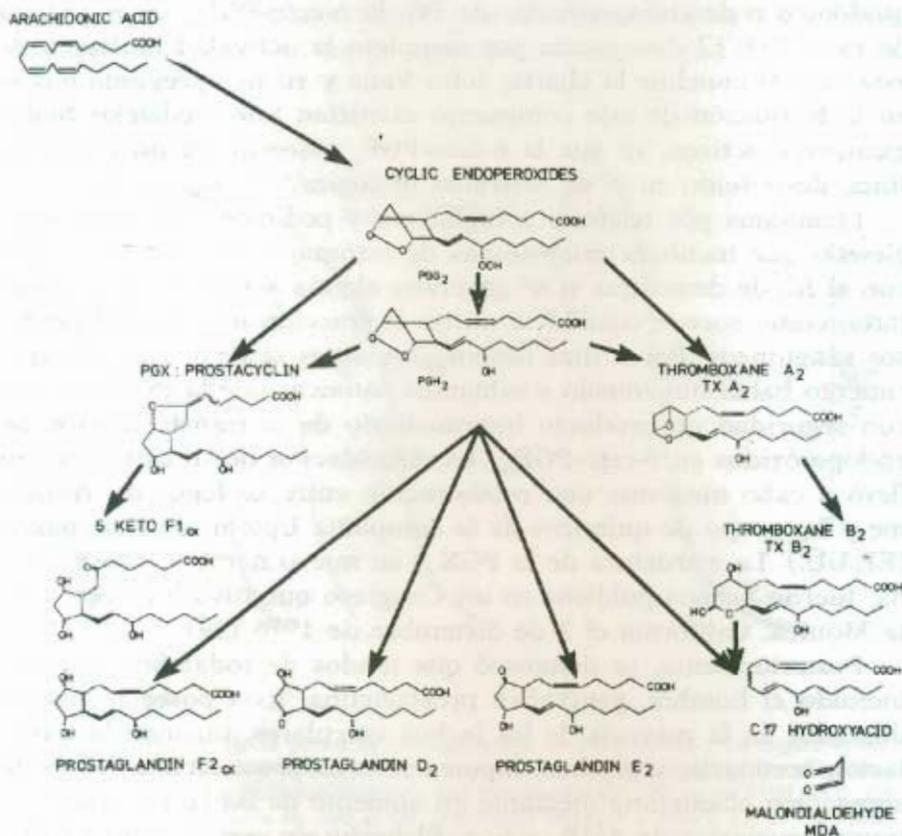


Fig. 8.—Metabolismo del ácido araquidónico por la vía ciclo-oxigenasa.

La aspirina inhibe a la ciclo-oxigenasa de plaquetas en dosis mucho más bajas que las necesarias para producir un efecto analgésico y anti-inflamatorio (30). Este efecto de la aspirina en las plaquetas es de larga duración, debido a que la aspirina, y no los fármacos relacionados, es capaz de acetilar el grupo hidroxilo de la única

serina, en posición 530, de la cadena polipeptídica de la ciclo-oxigenasa, ocasionando su inhibición irreversible (31, 32). Las plaquetas son incapaces de sintetizar proteínas (33) y no pueden reemplazar la ciclo-oxigenasa, por lo tanto la inhibición sólo puede ser superada cuando nuevas plaquetas entran en la circulación, a partir de megacariocitos cuya ciclo-oxigenasa no ha sido inhibida.

Por otra parte, experimentos realizados *in vitro* demostraron que la ciclo-oxigenasa de la pared vascular es menos sensible que la de las plaquetas a la acción inhibidora de la aspirina (34). Por otra parte, estudios en animales mostraron que dosis bajas de aspirina reducen la formación de TXA_2 , en forma más importante que la de prostaciclina (35). En esa época nosotros demostramos que una dosis única y baja de aspirina (0.3 g) producía un aumento del tiempo de sangría en el hombre, mientras que dosis altas (3.9 g) carecían de efecto (36). Además, la aspirina administrada oralmente sufre una hidrólisis pre-sistémica, por lo tanto, las plaquetas que pasan por el intestino están expuestas a una mayor concentración de aspirina que en la circulación periférica (37). Por consiguiente, la aspirina posee cualidades únicas de acción prolongada en muy pequeñas cantidades que no poseen otras drogas anti-inflamatorias de origen no-esteroide. Estos datos promovieron la búsqueda de una dosis de aspirina capaz de inhibir la formación de TXA_2 en el hombre, sin afectar la producción de prostaciclina, para lo cual se utilizaron dosis pequeñas, administradas diariamente, o bien dosis altas a intervalos semanales, solas o en combinación con otros agentes antitrombóticos (38). Análisis recientes demuestran que el tratamiento a largo plazo con una dosis baja de aspirina (75 a 325 mg) tiene claros efectos beneficiosos para pacientes con aterosclerosis establecida (39, 40).

La prostaciclina y sus derivados estables (tales como carbaciclina o iloprost) pueden ser beneficiosos en un gran número de enfermedades circulatorias, debido a sus propiedades vasodilatadoras y antiagregantes, como también por sus acciones citoprotectoras y antiproliferativas. La prostaciclina también protege la cuenta plaquetaria cuando se utiliza en sistemas de circulación extracorpórea en animales o en el hombre. Se ha empleado en hemodiálisis, circunvalación cardiopulmonar y hemoperfusión con carbón activado (41). Tanto la prostaciclina como el iloprost han mostrado efectos beneficiosos en pacientes con enfermedad vascular periférica, con mejoras significativas en lo que se refiere a alivio del dolor, cura-

ción de úlceras y tasa de amputación (42). Se han reportado efectos similares en el tratamiento de úlceras y flujo vascular periférico en sujetos con síndrome de Raynaud, donde los efectos beneficios persisten largo tiempo tras el término de la infusión. Esto último ha sido atribuido a un efecto citoprotector cuya naturaleza continúa sin ser esclarecida (43).

Es posible que prostaciclina pueda ser útil en el tratamiento del accidente cerebrovascular. Se necesita, sin embargo, un mayor número de ensayos clínicos para establecer definitivamente su eficacia (44). Es posible que los futuros análogos de la prostaciclina con actividad selectiva antiplaquetaria, puedan ser eficaces en el tratamiento de la enfermedad coronaria inestable, ya sean solos o en combinación con otras terapias (45).

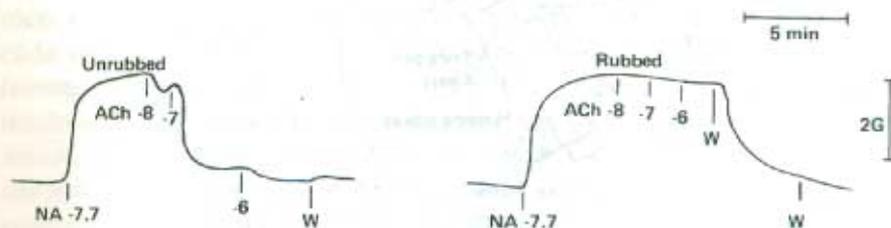
Los datos clínicos son limitados en lo que concierne a los efectos beneficiosos de la prostaciclina o sus análogos en la hemodinámica de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (46).

En los últimos años, la prostaciclina se ha convertido en la prostaglandina más empleada como vasodilatador pulmonar (47). Uno de los principales usos es el mantenimiento de la luz del ductus en los casos de circulación sistémica o pulmonar dependientes de esta estructura. La prostaciclina causa respuestas hemodinámicas y sintomáticas positivas en pacientes con hipertensión pulmonar primaria severa y con síndrome de distrés respiratorio. Asimismo, prolonga el tiempo de supervivencia de aquellos pacientes con hipertensión pulmonar en espera de un trasplante cardiopulmonar. Aunque la prostaciclina no es un vasodilatador selectivo de los vasos pulmonares, tiene la ventaja de poseer pocos efectos colaterales (véase 47).

DEL FACTOR RELAJANTE DE ORIGEN ENDOTELIAL (EDRF) AL OXIDO NITRICO: EL SISTEMA VASCULAR

En 1980, mientras le dábamos los toques finales a nuestro descubrimiento de la prostaciclina, Furchgott y Zawadzki publicaron un artículo en el que demostraban que el endotelio vascular era necesario para la acción vasorelajante de ciertos vasodilatadores (48, fig. 9). Ellos denominaron a este fenómeno relajación vascular dependiente del endotelio, y además demostraron que dicha relajación dependía de la liberación de una substancia inestable, conocida posteriormente como factor relajante derivado del endotelio (en-

dothelium-derived relaxing factor EDRF). La existencia de este fenómeno fue confirmada posteriormente por diversos grupos, esclareciéndose algunos de los aspectos de la acción de este misterioso compuesto (véase 49-52). Se encontró que el EDRF produce relajación vascular por activación de la enzima soluble guanilato ciclasa en las células del músculo liso vascular (53). Dos compuestos que inhiben dicha enzima, azul de metileno y hemoglobina, también inhiben los efectos del EDRF (54), el que mostraba una extraordinaria inestabilidad, con una vida media de 3-5 segundos (55, 56).



NA = noradrenaline

W = washout

Doses ACh expressed as log of cumulative molar concentrations.

Furchgott et al (1981). In 'Vasodilation', p 49-66, Raven Press, New York,

FIG. 9.—Pérdida de la respuesta relajante a la acetilcolina (ACh), en anillos aorticos de conejo desprovistos de endotelio. Los registros se hicieron en el mismo cilindro aortico antes y 30 min. después de eliminar el endotelio. El tejido fue precontraído con noradrenalina (NA). W = lavado. Las concentraciones están expresadas como logaritmo de la concentración molar. Figura tomada de la referencia 48.

En la década del 70 habíamos adquirido gran experiencia en las técnicas de bioensayo de sustancias inestables, como la prostaciclina y el TXA₂. Fue esta experiencia la que nos permitió trabajar con rapidez una vez que decidimos incorporarnos a este campo de investigación en el verano de 1985. Para la realización de este proyecto formé equipo con Richard Gryglewski, que nos visitaba con motivo de su sabático y con Richard Palmer.

Decidimos desarrollar un bioensayo que fuera capaz de generar cantidades considerables de EDRF con el fin de poder llevar a cabo estudios farmacológicos detallados y, con suerte, esclarecer su es-

estructura. En vez de utilizar anillos vasculares en baño de órganos, como hacían otros investigadores, nosotros recurrimos una vez más al bioensayo en cascada como sistema detector, empleando células endoteliales cultivadas sobre microtransportadores como sistema generador (fig. 10). Los experimentos iniciales, confirmaron la po-

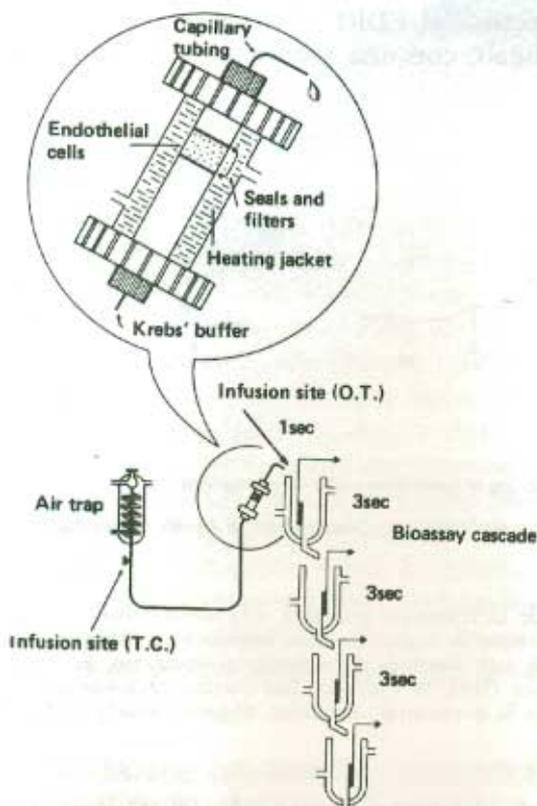


FIG. 10.—Representación esquemática de la cascada de bioensayo y de la columna con las células endoteliales. Los tejidos utilizados fueron tiras espirales de arteria coronaria bovina, celíaca o mesentérica de conejo, y aorta torácica de conejo. El retraso entre cada tejido en la cascada fue de 3 segundos. Figura tomada de la referencia 57.

sibilidad de llevar a cabo un bioensayo simultáneo de prostaciclina y EDRF (57). Con posterioridad adoptamos una cascada consistente en tres tiras de aorta de conejo desprovistas de endotelio, ya que

éste es un tejido carente de respuesta a la prostaciclina, pero se relaja muy eficientemente con EDRF. Estos estudios demostraron que el EDRF se generaba en gran cantidad dependiendo del número de células endoteliales en los micotransportadores. Además, constatamos que al menos parte de la inestabilidad del EDRF en la cascada se debía a su interacción con aniones superóxido (O_2^-), ya que el tratamiento con superóxido dismutasa (SOD) incrementaba su vida media (58).

Estaban ya descritos compuestos capaces de inhibir el EDRF; estos incluían antioxidantes y reactivos con grupos sulfidriilo, así como inhibidores de fosfolipasa, lipo-oxigenasa de ácido araquidónico y de enzimas dependientes del citocromo P-450. La acción de cada uno de los compuestos había dado origen a una hipótesis diferente sobre la naturaleza del EDRF (55, 59-61). Yo estaba incómodo al observar inhibidores con estructuras y con mecanismos de acción tan diversos. Esto me hizo pensar que debía existir un mecanismo de acción común para todos ellos; sin embargo, dicho mecanismo no resultaba de modo alguno obvio. Investigamos las acciones que éstos ejercían sobre la liberación de EDRF por las células endoteliales, y encontramos que las curvas de inhibición resultaban erráticas. Pensé que esto podría deberse a una interferencia del O_2^- y sugerí que determinásemos las curvas de inhibición en presencia de SOD. Para nuestra sorpresa, en estas condiciones todos los inhibidores perdieron su actividad. El misterio estaba resuelto: el mecanismo común de acción de estos compuestos está basado en sus propiedades redox, por las que son capaces de generar O_2^- , que a su vez destruye el EDRF (62). Con el fin de apoyar nuestra hipótesis, probamos otra sustancia capaz de interactuar con O_2^- , como es el citocromo c, el cual se comportó como la SOD. Además, decidimos investigar si un generador de O_2^- , aún no conocido previamente como inhibidor de EDRF, podría actuar como tal. Este compuesto —el pirogalol— se comportó como habíamos predicho y sus acciones fueron antagonizadas no sólo por SOD sino también por citocromo c (62). Estos resultados representaron un avance importante en la comprensión de las propiedades del EDRF, pues clarificaron no sólo el mecanismo por el cual estos compuestos actúan como inhibidores de la acción de esta sustancia, sino también sus diferencias con la hoemoglobina, que se comporta como inhibidor atrapando EDRF directamente (63).

Estos fueron los resultados que presenté en una reunión sobre

Mecanismos de Vasodilatación que tuvo lugar en Rochester, Minnesota, en 1986. Allí tuve la oportunidad de escuchar la nueva hipótesis presentada por Bob Furchgot e independientemente por Lou Ignarro, proponiendo que EDRF podría ser el óxido nítrico (NO) o una molécula relacionada (64, 65). Para muchos de los presentes, esto sonaba como una herejía, pero yo pensé que se trataba de una posibilidad muy atractiva que merecía ser investigada.

Decidimos investigar si el EDRF era realmente NO y, si éste era el caso, averiguar si el NO satisfacía los criterios establecidos en los años 30 por Henry Dale para la identificación de un mediador biológico. Decidimos abordar el problema de dos maneras: primero estudiando la farmacología comparativa del auténtico gas NO y el EDRF y, en segundo lugar, intentando desarrollar una forma de medir la liberación de NO por las células endoteliales vasculares. En vez de emplear nitrito acidificado (NO_2^-) que da origen a la formación de NO de manera impredecible y difícil de cuantificar, Richard Palmer y yo decidimos emplear NO gas, obtenido comercialmente. Para ello se requería desarrollar un modo de diluir NO en agua deoxigenada para evitar la formación de NO_2^- .

Tras los primeros experimentos con el bioensayo en cascada, mi experiencia con esta técnica me convenció de que el EDRF y el NO eran la misma sustancia (fig. 11). A continuación, con la ayuda del Departamento de Ciencias Físicas de Wellcome, desarrollamos una técnica de quimioluminiscencia que nos permitió la medición del NO liberado por las células endoteliales en cultivo. Los resultados combinados de la farmacología comparativa y la medición directa del NO liberado por estas células, demostraron que el NO es responsable de la actividad biológica del EDRF (66).

El origen bioquímico del NO continuaba siendo un misterio. Intentamos estimular a las células endoteliales para generar NO a partir de diferentes posibles precursores, que incluían nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), amoníaco y varios aminoácidos, pero todos nuestros esfuerzos resultaron en vano. Por casualidad, sin embargo, nos encontramos con artículos de John Hibbs y de Michael Marletta y sus colegas en los que describían en macrófagos activados la formación de NO_2^- y NO_3^- a partir de L-arginina (67, 68). Ello nos instó a intentar, sin éxito, «alimentar» las células endoteliales con L-arginina para que produjeran NO. Unas semanas más tarde, mientras considerábamos nuestro fracaso, advertimos que era posible que la L-arginina presente en el medio de cultivo estuviera «inundando» el

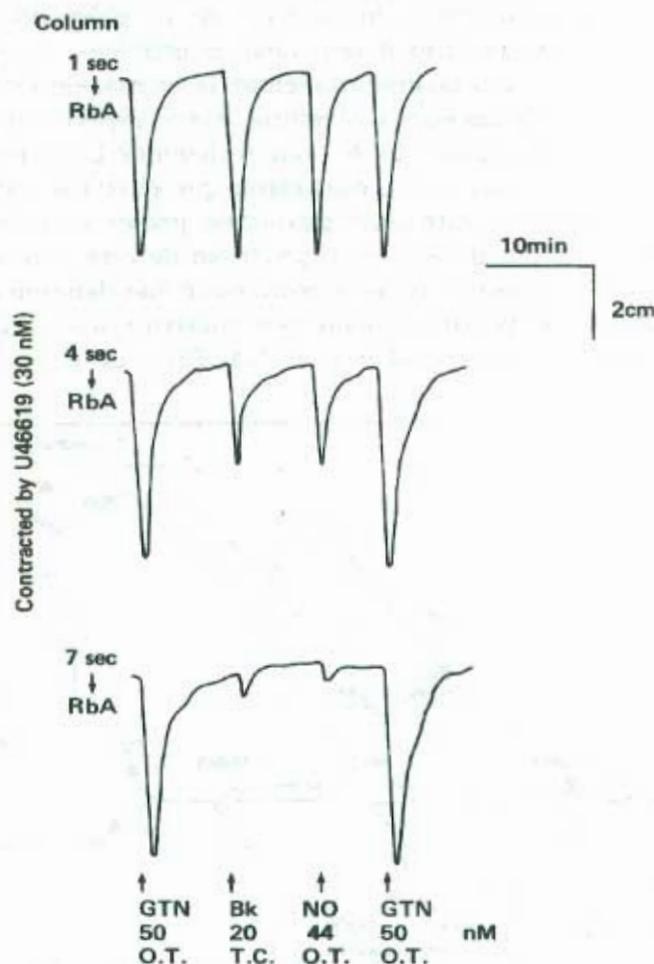


FIG. 11.—Relajación de la aorta de conejo inducida por el factor relajante derivado de endotelio (EDRF) y óxido nítrico (NO). Una columna empaquetada con células endoteliales cultivadas en microtransportadores (véase figura 10) fue perfundida con Krebs-buffer (5 ml/min.). El efluente se utilizó para superfundir tres tiras aórticas de conejo (RbA) desprovistas de endotelio, en una cascada. Los tejidos fueron contraídos en forma submáxima, mediante una infusión continua de 9-11-dideoxi-9 α , 11 α metano epoxi-prostaglandina F_{2a} (U46619; 30 nM) y se colocaron separados de las células por 1, 4 y 7 segundos de retraso respectivamente. La sensibilidad del bioensayo fue estandarizada por la administración de trinitroglicerina (GTN; 50 nM) sobre los tejidos (O.T.). EDRF fue liberado de las células mediante la infusión de bradiquinina (Bk, 20 nM) durante 1 min. a través de la columna (T.C.). NO (0.22 nmol) fue disuelto en agua deoxigenada con helio y administrado como infusión durante 1 min.

Figura tomada de la referencia 66.

sistema. Por lo tanto, decidimos cultivar a las células en un medio libre de L-arginina durante 24 horas antes de la realización del experimento. Ello nos permitió desentrañar el problema puesto que, en estas condiciones, era posible aumentar la formación de NO por las células, proporcionándoles L-arginina. Estos experimentos, junto con otros más sofisticados en los que utilizamos L-arginina marcada y espectrometría de masa, mostraron que el NO se sintetiza a partir de los átomos de nitrógeno guanidino presente en la L-arginina (69), y que la citrulina es otro producto de esta reacción (fig. 12). La enzima responsable de esta conversión fue denominada NO sintasa, y caracterizada parcialmente por nuestro grupo, encontrándose ser constitutiva, dependiente de NADPH y de Ca^{2+} (70).

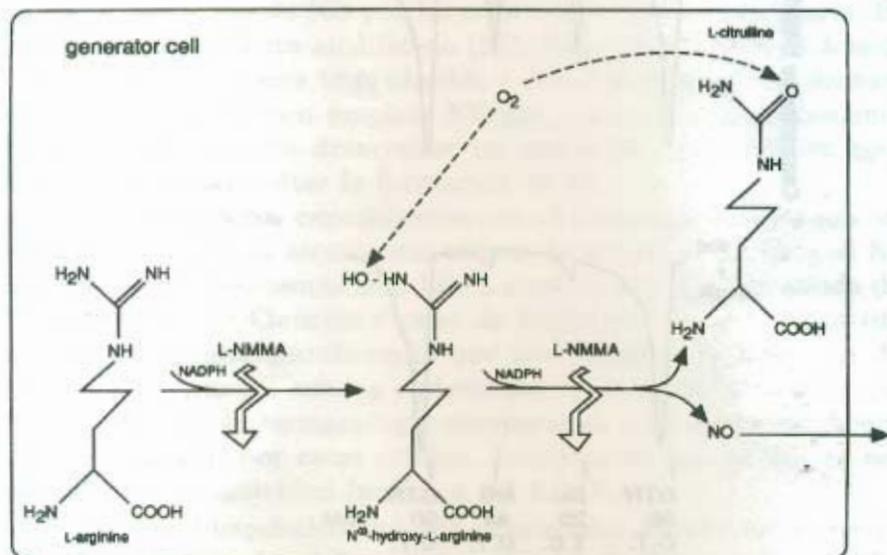


FIG. 12.—Síntesis de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina. N^G -hidroxi-L-arginina es un producto intermedio inestable, L-citrulina se forma como coproducto. La reacción requiere NADPH y oxígeno molecular y es inhibida por N^G monometil-L-arginina (L-NMMA). El NO, una vez formado, difunde desde la célula generadora para actuar en una célula receptora de la vecindad.

Otro hallazgo adicional de trascendencia fue la evaluación de N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA) como inhibidor de la síntesis de NO. Este análogo de la L-arginina había sido empleado previa-

mente por John Hibbs y sus colaboradores para inhibir la conversión de L-arginina a NO_2^- y NO_3^- en macrófagos activados (68). En nuestros ensayos demostró ser un inhibidor eficaz y selectivo, tanto de la generación de NO por las células endoteliales en cultivo, como de la relajación dependiente de endotelio en anillos de aorta de conejo (64). Aún más, producía una contracción en el anillo vascular, que era endotelio-dependiente y proporcional a la concentración, indicando que no sólo inhibía la producción basal de NO sino que este NO era responsable del mantenimiento de un tono vasodilatador en el tejido (71). Además, observamos que la L-arginina revertía, en una forma dosis-dependiente, el efecto del inhibidor (fig. 13).

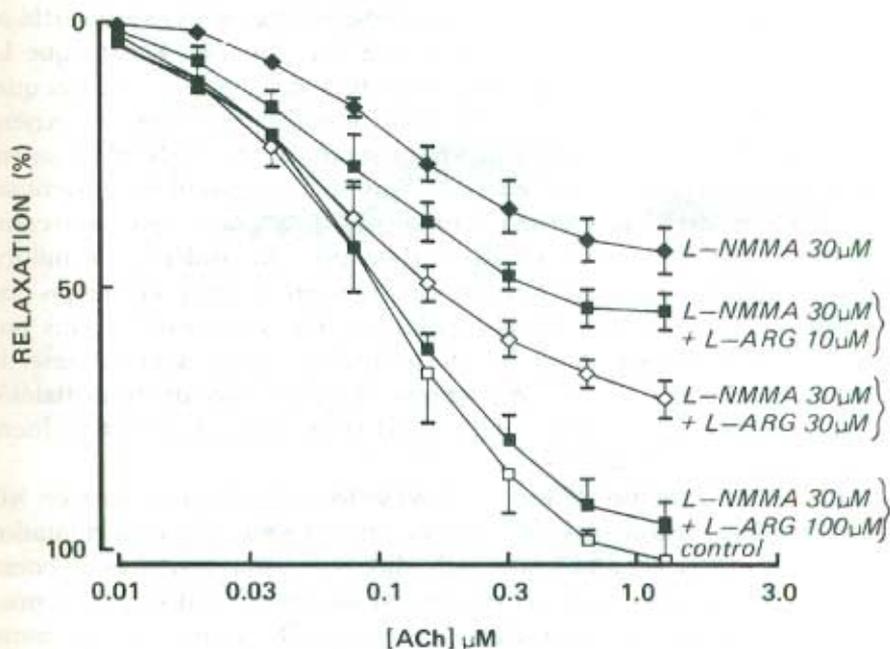


FIG. 13.—Reversión por L-arginina (L-Arg) del efecto inhibitorio de N^G monometil-L-arginina (L-NMMA) sobre la relajación inducida por acetilcolina (ACh) en cilindros aórticos desprovistos de endotelio. Cada punto es la media de tres experimentos. Figura tomada en la referencia 71.

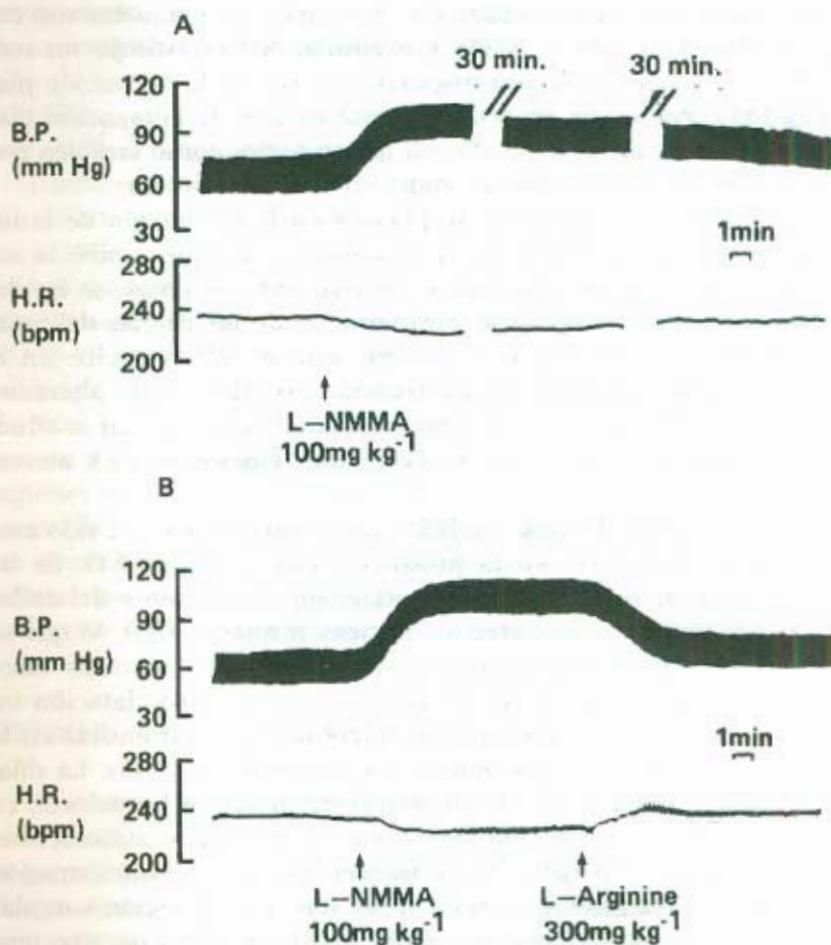
A partir de esta información decidimos estudiar si L-NMMA era capaz de inducir vasoconstricción en un órgano perfundido. Haciendo

do uso de corazones aislados y perfundidos demostramos que L-NMMA causaba un incremento de la presión de perfusión coronaria dependiendo de la concentración, y que era capaz de inhibir las acciones vasodilatadoras de la acetilcolina. Estos efectos también se atenuaban con L-arginina (72, 73). En suma, la formación de NO a partir de L-arginina en la circulación coronaria desempeñaba un papel, al menos en el corazón aislado perfundido, como regulador del tono vascular y como mediador de la vasodilatación inducida por acetilcolina.

El hallazgo principal de esta serie de experimentos fue realizado unos meses más tarde cuando estudiamos el efecto de L-NMMA en la presión arterial de conejos anestesiados. En este modelo constatamos que la inhibición de la síntesis de NO conduce a una respuesta hipertensiva prolongada que, interesantemente, se revertía al inyectar L-arginina por vía intravenosa (fig. 14, 74). Puesto que L-NMMA no posee actividad vasoconstrictora directa, ello sugería que, en el sistema vascular, existe un tono vasodilatador que es dependiente de NO. Posteriormente demostramos que L-NMMA causa vasoconstricción marcada en todos los lechos vasculares examinados, incluyendo el antebrazo humano (75); además, que este compuesto es activo cuando se administra por vía oral (76), e induce en los animales una hipertensión significativa durante el tiempo que es ingerido (77). Todos estos resultados han sido confirmados por muchos laboratorios alrededor del mundo y constituyen la base de nuestra propuesta que, en el sistema vascular, hay un tono fisiológico vasodilatador dependiente del NO sobre el cual actúan, influencias vasoconstrictoras (78).

El descubrimiento de este tono vasodilatador dependiente de NO también desentrañó la existencia de un sistema nitrovasodilatador endógeno cuyas acciones son imitadas por compuestos tales como el trinitrato de glicerina y el nitroprusiato sódico, sustancias conocidas hace mucho por su eficacia clínica (78) y que actúan como resultado de su conversión en NO (79). La reacción del NO con el átomo de Fe^{2+} presente en el grupo prostético hemo de la guanilato-ciclase soluble, produce un incremento de más de 50 veces en la velocidad de síntesis de GMP cíclico, lo que origina la relajación vascular (80).

Además de sus propiedades vasodilatadoras, el NO inhibe la agregación plaquetaria a través de un mecanismo dependiente de GMP cíclico. Además tiene una acción sinérgica con la acción antiagre-



From Rees, Palmer and Moncada, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. 86, 3375-3378.

Fig. 14.—A) Efecto de N^G monometil-L-arginina (L-NMMA; 100 mg/kg i.v.) sobre la presión sanguínea (BP) y la frecuencia cardíaca (H.R.). El trazo mostrado es representativo de tres experimentos en los cuales la duración del efecto de L-NMMA, duró entre 60 y 90 min. B) Reversión del efecto de L-NMMA (100 mg/kg i.v.) sobre BP y H.R. por L-arginina (300 mg/kg i.v.). Figura tomada de la referencia 74.

gante de la prostaciclina que actúa incrementando la concentración de AMP cíclico. A diferencia de ésta, el NO es también un potente

inhibidor de la adhesión plaquetaria. Aún más, las plaquetas son capaces de sintetizar NO, y la vía L-arginina: NO constituye un mecanismo de retroalimentación negativo que regula la activación plaquetaria (81). Por tanto, es probable que *in vivo* la agregación plaquetaria esté regulada por el NO intraplaquetario, como también por el NO y la prostaciclina que el endotelio vascular libera.

El NO puede a la vez estar implicado en la regulación de la interacción entre leucocitos y la pared vascular, ya que inhibe la activación leucocitaria *in vitro* (82) e *in vivo* (83). Además, se ha demostrado que el NO modula la proliferación de las células del músculo liso (84). Por lo tanto, es posible que el NO participe en el control homeostático general del sistema vascular y que alteraciones en su liberación o en sus acciones puedan contribuir a situaciones patológicas tales como hipertensión, vasoespasmo y aterosclerosis.

Un gran número de enfermedades cardiovasculares han sido asociadas a una alteración en la producción vascular de NO. Se ha observado una disminución de la relajación dependiente del endotelio en anillos de arterias ateroscleróticas humanas (85), lo que se acompaña por un incremento en la respuesta a sustancias vasoconstrictoras. Aún más, se ha encontrado que la vasodilatación inducida por flujo sanguíneo y por acetilcolina está disminuida en la circulación coronaria de pacientes con aterosclerosis (86). La dilatación mediada por flujo está también disminuida en fumadores, en niños con hipercolesterolemia familiar y en pacientes con enfermedad coronaria (87). Un hallazgo de interés, es que la administración intravenosa de L-arginina normaliza no sólo la disfunción vascular en humanos (88, 89) y animales (90) hipercolesterolémicos, sino que, además, es capaz de disminuir el grosor de las lesiones ateroscleróticas (90).

La actividad relajante dependiente del endotelio parece también estar disminuida en pacientes con hipertensión esencial (91). En efecto, la respuesta del flujo sanguíneo del antebrazo a L-NMMA, pero no a noradrenalina, está disminuida en pacientes con hipertensión esencial, lo que hace pensar que un déficit en la síntesis de NO podría contribuir a la génesis de esta patología (92). Por otra parte, el tratamiento con L-arginina previene el desarrollo de hipertensión en animales propensos a esta enfermedad (93) y también causa una rápida reducción de la presión sistólica y diastólica cuando se infunde en voluntarios sanos y en pacientes con hipertensión

esencial (94, 95). En otros experimentos se ha observado que los vasos sanguíneos de animales diabéticos demuestran una disminución de la relajación dependiente de endotelio, en forma similar a aquellos pacientes sometidos a trasplante de corazón-pulmón por enfermedad pulmonar crónica terminal (véase 96).

Estudios recientes sugieren aplicaciones clínicas del NO en algunas alteraciones pulmonares, ya que la inhalación de NO gaseoso en animales (97, 98) y humanos (99) puede revertir la vasoconstricción pulmonar debida a hipoxia o a hipertensión pulmonar. Se ha encontrado, además, que la inhalación de bajas concentraciones de NO (5-40 ppm) protege contra el síndrome de distrés respiratorio del adulto (ADRS) (100, 101). Aún más, la administración prolongada de NO (7 días) resulta en una mejoría sostenida de la función pulmonar. El NO inhalado dilata de manera selectiva los vasos de las regiones pulmonares ventiladas, produciendo una mejoría del cociente ventilación: perfusión, con la ventaja de estar desprovisto de efectos hemodinámicos sistémicos (100). En este contexto, es interesante señalar que el aire exhalado por animales y humanos contiene NO endógeno en concentraciones entre 5 y 20 ppb (102).

OXIDO NITRICO Y SISTEMA NERVIOSO

Un avance de gran trascendencia en el conocimiento de la acción biológica del NO surgió a raíz de nuestro descubrimiento de la generación de NO a partir de L-arginina en el cerebro. Este hallazgo ocurrió como consecuencia de haber encontrado dos observaciones en la literatura, realizadas hacía ya 10 años, que adquirían nueva relevancia a la luz de nuestros hallazgos en el endotelio. Deguchi y sus colaboradores habían descrito en homogeneizados de cerebro una sustancia de bajo peso molecular capaz de estimular la guanilato ciclasa soluble (103), que identificaron posteriormente como L-arginina (104). Además, Miki y sus colegas habían encontrado que la guanilato ciclasa soluble del cerebro podía ser estimulada con NO gaseoso (105). Nuestros experimentos empleando sinaptosomas de cerebro de rata, pusieron de manifiesto la formación de NO y citrulina acompañada de un incremento del GMP cíclico, siendo ambos dependientes de Ca^{2+} (fig. 15) e inhibidos por L-NMMA (106). La publicación de este artículo fue precedida unos meses antes por la descripción de John Garthwaite y su grupo de

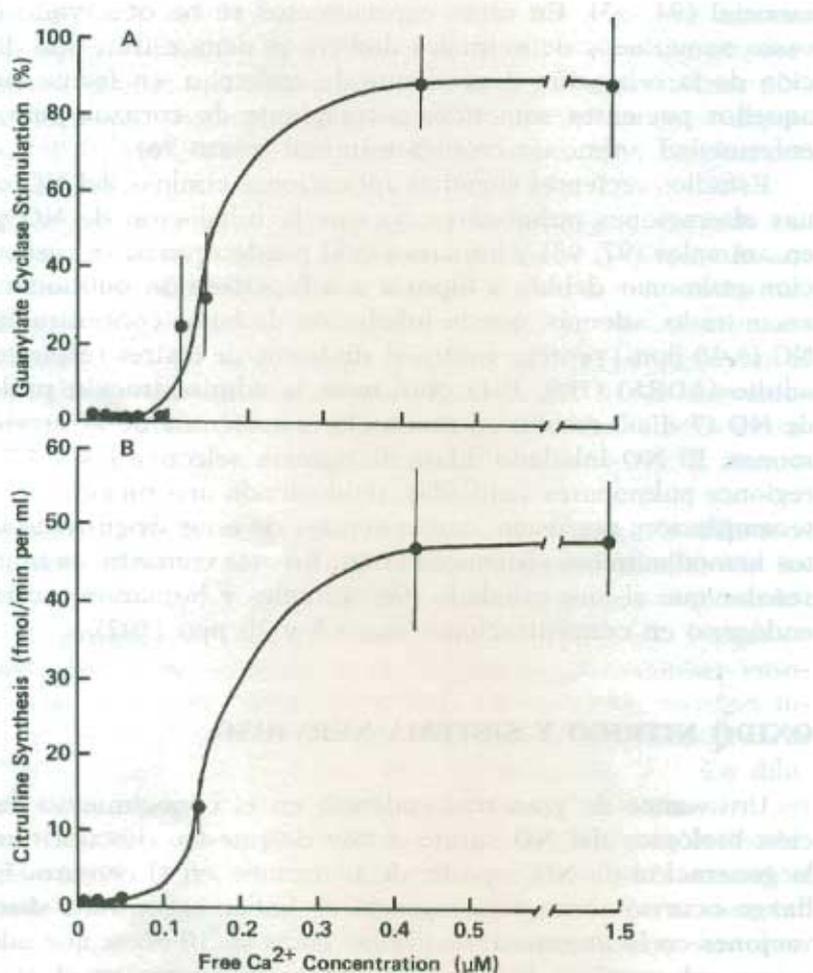


FIG. 15.—Dependencia de calcio (Ca^{2+}) para la síntesis de NO y citrulina a partir de L-arginina en citosol sinaptosómico de rata. La velocidad de síntesis de NO a partir de $100 \mu\text{M}$ de L-arginina, a diferentes concentraciones de calcio libre. La formación de NO fue determinada por la estimulación de guanilato-ciclasa (A) o por la velocidad de síntesis de ^3H -citrulina a partir de $0.2 \mu\text{M}$ de L- ^3H -arginina (B). La actividad de guanilato-ciclasa es expresada como porcentaje de aquella producida por $10 \mu\text{M}$ de S-nitroso-N-acetil penicilamina a cada concentración de Ca^{2+} libre. Figura tomada de la referencia 106.

la liberación de una sustancia con propiedades de EDRF a partir de células de cerebelo de rata cuando éstas eran estimuladas con

N-metil-D-aspartato (NMDA), agonista para un subtipo de receptor de glutamato (107). Posteriormente se demostró que el incremento de los niveles de GMP cíclico que resultan de la estimulación del receptor de NMDA, son potenciados por L-arginina y antagonizados por L-NMMA y otros inhibidores de la NO sintasa. De este modo, se ponía en evidencia que, efectivamente, el NO es el mecanismo de transducción de la activación inducida por la estimulación del receptor de glutamato (véase 50, 108). Todo esto nos condujo a formular la hipótesis de que la generación de NO a partir de L-arginina es un mecanismo general para la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (50).

Desde entonces, este campo de investigación ha florecido. Se ha detectado la actividad de la NO sintasa, en cantidades variables, en todas las áreas del cerebro examinadas, hallándose la actividad máxima en cerebelo y bulbo olfatorio (véase 109, 110). Utilizando anticuerpos específicos anti-NO sintasa de cerebro de rata, se ha estudiado la distribución de esta enzima en diversos tejidos animales mediante técnicas inmunohistoquímicas, poniéndose de manifiesto que dicha actividad está ampliamente distribuida (111). Así, se ha demostrado que en cerebro humano, la NO sintasa se halla presente en corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo, cerebelo, bulbo raquídeo y médula espinal, localizándose principalmente en neuronas (112). Más recientemente, hemos realizado un estudio sistemático de inmunohistoquímica en el cerebro de la rata que demuestra en detalle la distribución muy amplia de la NO sintasa (113).

Progresivamente se ha acumulado evidencia que sugiere que el NO juega un papel en la formación de memoria (114-117). Datos obtenidos *in vitro* indican que, tras estimulación específica del receptor de glutamato, el NO es liberado de una fuente postsináptica para actuar presinápticamente en una o probablemente más neuronas. Ello conduce a un aumento de la liberación de glutamato y, como resultado, a una elevación estable de la transmisión sináptica, fenómeno conocido como potenciación a largo plazo, que se cree implicado en la formación de memoria (118). Experimentos realizados con animales parecen apoyar la idea de que el NO desempeña un papel en la memoria puesto que han demostrado que la inhibición de la síntesis de NO *in vitro* altera el aprendizaje (119).

Es posible que el NO tenga un papel fisiológico en la regulación de la circulación cerebral (120, 121). Efectivamente el NO puede ser

el factor, por tanto tiempo buscado, que conecta la actividad neuronal con aumentos locales en el flujo sanguíneo (122). Otras funciones en las que se ha propuesto un papel para el NO generado en el sistema nervioso central incluyen el comportamiento alimentario (123), la hiperalgesia (124) y la tolerancia a la morfina (125).

La liberación excesiva de aminoácidos excitatorios tales como el glutamato está asociada a la aparición de convulsiones y algunas formas de neurotoxicidad. El nexo entre la estimulación del receptor, por estos aminoácidos y la activación de la NO sintasa llevó a sugerir que la producción excesiva de NO podría estar implicada en condiciones tales como la epilepsia y la isquemia cerebral (50). La evidencia que apoya esta hipótesis a partir de modelos de epilepsia e infarto cerebral se ha obtenido tanto *in vitro* como *in vivo* (126-128). En algunos modelos *in vivo*, sin embargo, los inhibidores de la NO sintasa aumentan el daño (129). Estos resultados aparentemente contradictorios quizá puedan atribuirse a que los inhibidores disponibles son incapaces de reducir la liberación neuronal de NO sin afectar otros mecanismos dependientes de esta molécula, tales como el flujo sanguíneo y la agregación plaquetaria. Un hallazgo interesante es que el NO contribuye a la neurotoxicidad inducida por virus en células corticales cultivadas (130) e *in vivo* (131).

La actividad enzimática NO sintasa copurifica a homogeneidad con la actividad NADPH diaforasa (132), una enzima que se halla presente en aproximadamente el 2 por 100 del total de las neuronas de la corteza cerebral. Esta localización se corresponde en el cerebro como también en el sistema el nervioso periférico (133). Se sabe que las neuronas que contienen esta enzima son resistentes a sufrir degeneración en procesos tales como el ataque cerebral isquémico, corea de Huntington o la enfermedad de Alzheimer, así como en modelos experimentales de isquemia. Ello hace pensar que las neuronas con capacidad de liberar NO son resistentes a las acciones citotóxicas de éste. Si éste fuera el caso, esta observación puede proveer importantes pistas para la comprensión de la fisiopatología de diversos desórdenes neurodegenerativos.

Ciertas células del sistema nervioso central, tales como las células de microglía, pertenecientes a la estirpe de los monocitos/macrófagos, pueden expresar la forma inducible de la NO sintasa (134). Está demostrado que la microglía activada produce cantidades de NO suficientes para matar neuronas cerebrales en cocultivo (135). La microglía ha sido implicada en la patogénesis de un buen nú-

mero de enfermedades que incluyen la esclerosis múltiple, las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson y la demencia asociada al SIDA.

El NO se encuentra asimismo en varios nervios periféricos donde puede jugar un papel en la transmisión sensorial (136) y actuar como transmisor o modulador en al menos algunos nervios descritos hasta ahora como no-adrenérgicos, no-colinérgicos (NANC) (137, 138).

En el tracto gastrointestinal, el NO parece ser responsable de las relajaciones mediadas por estimulación NANC del fondo gástrico de la rata (139) y de la relajación adaptativa del estómago en respuesta a la presión intragástrica (140). Puede a la vez estar involucrado en la inhibición NANC del esfínter esofágico inferior (141), la función motora del esfínter de Oddi (142) y la regulación de la motilidad de la vesícula biliar (143). La estimulación de nervios NANC presentes en la unión ileocolónica canina libera un factor con las características del NO (144). Los inhibidores de la NO sintasa reducen la relajación NANC en la *taenia coli* (145) y en el músculo del esfínter interno anal humano (146). En el colon humano la inmunotinción con antisuero anti-NO sintasa del cerebro de rata ha demostrado la presencia de la enzima constitutiva en los plexos mientéricos y submucosos, tanto en los cuerpos neuronales como en sus fibras (112). Un trabajo en el cual se estudió la distribución histoquímica de la NADPH diaforasa en biopsias obtenidas de niños con estenosis pilórica hipertrófica, sugiere que la carencia de NO sintasa en el tejido pilórico puede ser la responsable del espasmo pilórico característico de esta alteración (147). Nosotros hemos demostrado recientemente usando anticuerpos específicos anti-NO sintasa que en los plexos mientéricos de pacientes con acalasia tampoco hay NO sintasa (148).

Merece la pena destacar que en algunas de estas preparaciones gastrointestinales *in vitro* e *in vivo* (149), la inhibición de la síntesis de NO desencadena un efecto contráctil (fig. 16), semejante al aumento de la presión arterial que se observa al inhibir la NO sintasa en el sistema vascular. Este hecho sugiere que en ambos sistemas existe un tono dilatador dependiente de NO que es crucial para su función fisiológica y que proporciona una base sobre la cual actúan las influencias contráctiles.

La vía L-arginina: NO desempeña un papel fundamental en la relajación del cuerpo cavernoso humano (150). La relajación provo-

EFFECT OF L-NAME ON JEJUNAL INTRALUMINAL PRESSURE IN THE RAT

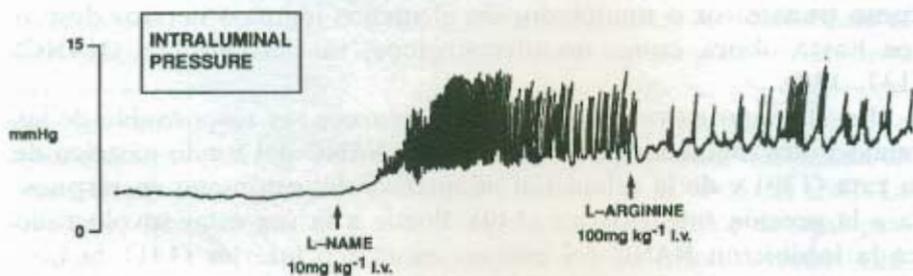


FIG. 16.—Efecto de la administración de N^G -nitro-L-arginina, metil-éster (L-NAME), sobre la presión intraluminal en yeyuno de rata anestesiada. El incremento de la presión y contracción muscular inducida por L-NAME (10 mg/kg i.v.) es reducido por L-arginina (100 mg/kg i.v.). Figura tomada de la referencia 149.

cada por la estimulación eléctrica de estos tejidos *in vitro*, se previene con inhibidores de la NO sintasa y se imita con donadores de NO (150-152). Asimismo, se ha encontrado evidencia inmunohistoquímica de la presencia de NO sintasa en nervios del pene de rata, perro y hombre. La enzima se ubica en neuronas del pene que inervan el cuerpo cavernoso y en plexos neuronales de la capa adventicia de las arterias del pene (152). Dosis pequeñas de NG-nitro-L-arginina, otro inhibidor de la síntesis de NO, inhiben la erección del pene inducidas por estimulación eléctrica en la rata (153). En suma, estos datos demuestran que el NO es el mediador común final de la erección del pene.

Se ha demostrado, además, el papel del NO en otros órganos con inervación NANC (121, 138), tales como tiras de arterias basilar y cerebral de perro y mono, además de arteria basilar de cerdo. A esto se añade que en la arteria cerebral media de la oveja, se ha demostrado que la vasodilatación, inducida por el péptido intestinal vasoactivo, se debe a la liberación de NO por los nervios NANC. Recientemente se ha demostrado que el NO contribuye a la relajación inducida por estimulación NANC del músculo traqueal de co-

bayo (154) y humano (155). Más aún, la inhibición de la síntesis de NO en ratas induce hiperactividad de la vejiga (156).

En suma, en todo el cuerpo existe un amplio sistema de nervios que utilizan NO como mediador o como modulador de la neurotransmisión. Estos nervios son tan importantes como los nervios adrenérgicos, colinérgicos y peptidérgicos y su disfunción puede determinar la aparición de varios desórdenes, entre otros, la impotencia masculina.

OXIDO NITRICO Y EL SISTEMA INMUNE

Otra vertiente contribuyó al descubrimiento del NO. Esta comienza en 1916, al encontrarse que los mamíferos, incluyendo el hombre, excretan NO_3^- en la orina y que el origen de éste es endógeno (157). En principio se creyó que la generación de NO_3^- se trataba de un sub-producto del metabolismo de la flora intestinal; pero en 1981, Steven Tannenbaum y sus colaboradores demostraron, empleando ratas libres de gérmenes, que el NO_3^- era de origen mamífero (158). Posteriormente Mike Marletta y Dennis Stuehr constataron que los niveles sanguíneos y la excreción urinaria de NO_3^- se elevan tras la exposición a lipopolisacárido (LPS) bacteriano (67) y que macrófagos de peritoneo de ratón activados con LPS e interferón- γ sintetizan NO_2^- y NO_3^- (159). Casi simultáneamente, John Hibbs demostró que los macrófagos activados ejercían una acción citotóxica contra células tumorales y que ésta dependía de la presencia de L-arginina (160). Se demostró además que L-arginina era transformada a L-citrulina, y que L-NNMA inhibía esta conversión, a la vez que prevenía las acciones citotóxicas de los macrófagos (68). Puesto que NO_2^- y NO_3^- no tienen propiedades citotóxicas, nosotros propusimos que el NO debía ser el compuesto citotóxico generado por los macrófagos activados (50). Esto fue demostrado más tarde por tres grupos independientes (161-163).

El NO producido de esta manera es citotóxico o citostático frente a células tumorales y a microorganismos intracelulares como *Micobacterium tuberculosis* y la *Leishmania major*, así como frente a hongos y helmintos cuyo tamaño es demasiado grande para ser fagocitados. Entre ellos se encuentran *Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni* y *Plasmodium falciparum* (ver 164, 165). La base bioquímica de la citotoxicidad inducida por

NO depende de la combinación del NO con enzimas claves del ciclo respiratorio y de la ruta biosintética de ADN (ver 164). Este NO se genera también por una NO sintasa, esta vez inducible, que es capaz de producir grandes cantidades de NO por períodos largos (ver 166).

Tres conceptos importantes surgieron de este trabajo: la enzima que sintetiza NO en macrófagos activados es diferente de aquella presente en el endotelio y en el sistema nervioso, ya que no se expresa constitutivamente sino que es inducida por endotoxinas o ciertas citoquinas. Esta inducción, como descubrimos posteriormente con Marek Radomski y Massimo Di Rosa, es inhibida por glucocorticoides anti-inflamatorios (167, 168). En segundo lugar, es posible que el NO no sólo posea propiedades citotóxicas *per se*, sino que además puede interactuar con otras moléculas, como O_2^- , para formar productos con mayor citotoxicidad (169). Esta hipótesis, que es aún controvertida, es, sin duda, de gran interés. Por último, el hallazgo de la generación de NO por la enzima inducible podría explicar el fenómeno de la inmunidad no específica, el cual no se restringiría sólo a las células del sistema reticuloendotelial, como se ha pensado, sino que también tendría lugar en muchas otras células somáticas, incluyendo el endotelio vascular y el músculo liso vascular (166). Inducción de la NO sintasa ha sido demostrada en muchas células del organismo, incluyendo hepatocitos murinos (170), y en humanos, en hepatocitos, y condrocitos (véase 171).

La inducción de la NO sintasa en el endotelio vascular y en las células del músculo liso posee una especial significación, ya que ha ayudado a esclarecer la hipotensión y la hiporeactividad a vasoconstrictores, características del choque séptico y de la terapia con citoquinas (véase 96, 172). El hecho de que la NO sintasa se induzca en miocardio y tejido venoso sugiere que la relajación venosa y la disfunción cardíaca observadas en estas condiciones también pueden deberse a NO (172).

Las sintasas de NO constituyen una familia de isoenzimas que contienen el grupo hemo y requieren múltiples cofactores para su actividad, por lo tanto poseen dominios de unión a cofactores de óxido-reducción (ver 173). Hasta ahora, estas enzimas se han purificado a partir de varias fuentes, incluyendo el cerebelo humano (174). Los genes para las enzimas constitutivas de cerebro (175), y de endotelio vascular (176), además de la forma inducible de ma-

crófagos (177) han sido clonados y secuenciados. Las enzimas constitutivas de diferentes tejidos poseen pesos moleculares semejantes, que varían desde 135 kDa para la enzima endotelial hasta 155 kDa para la enzima neuronal. Las enzimas nativas son un homodímero de tales sub-unidades (178). La sub-unidad de la enzima inducible de macrófago posee un peso molecular de 130 kDa, cercano a aquél de la enzima endotelial constitutiva. Si bien la secuencia peptídica de las enzimas constitutivas del cerebro de mamíferos presenta grandes similitudes (aprox. 90 %), sólo existe un 60 % de homología entre las enzimas constitutivas procedentes de cerebro de rata y células endoteliales bovinas. Es interesante notar la homología existente (36 % de secuencia idéntica) entre la citocromo P-450 reductasa y diferentes NO sintasas (para referencia, ver 177). Aún más, la NO sintasa endotelial, pero no la neuronal ni la de macrófagos, contiene una secuencia de consensus para la miristoilación del aminoácido terminal, lo que puede explicar que una alta proporción de la forma endotelial esté asociada a la membrana (175, 177).

Tanto la enzima constitutiva como la inducible tienen sitios de reconocimiento para NADPH, flavinadeninucleótido (FAD) y flavinmonucleótico (FMN), así como también sitios de fosforilación y una secuencia de consenso para la unión de calmodulina. Todas las isoformas de NO sintasa requieren de tetrahidrobiopterina (179).

En humanos, se han identificado tres genes que codifican NO sintasas. El gene de la enzima endotelial se ubica en el cromosoma 7, el correspondiente a la enzima neuronal se encuentra en el cromosoma 12 y aquél para el tipo inducible está localizado en el cromosoma 17 (ver 173).

La clasificación actual de las NO sintasas se ha basado en el hecho de que las enzimas de cerebro y de endotelio son constitutivas y activadas por Ca^{2+} /calmodulina mientras que las isoforma de macrófagos es inducible e independiente de Ca^{2+} . Sin embargo, recientemente se ha encontrado que las tres formas poseen secuencias para la fijación de calmodulina (175-177), y que existe calmodulina unida fuertemente a la enzima inducible del macrófago (180). Además, en el intestino de ratas se induce una NO sintasa también dependiente de Ca^{2+} tras el tratamiento con endotoxina (181) e IL-1 induce una NO sintasa también dependiente de Ca^{2+} en condrocitos de conejo (182). Por otro lado, la expresión de la enzima constitutiva puede ser inducida en diversos tejidos por estrógeno (183), y en el cerebro tras el tratamiento con cloruro de litio y tacrina

(184). En suma, hay una mayor variedad de isoenzimas de lo que se había supuesto inicialmente, y en el futuro se necesitará una clasificación más exhaustiva.

El hecho de que el NO, un simple gas resultado de la combinación de los dos gases más comunes en la atmósfera, desempeñe el papel de un importante mediador biológico nos hizo pensar que su aparición en el reino animal debía tener un origen evolutivo muy temprano (166). Así, encontramos que el cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*), una especie cuya existencia alcanza 500 millones de años, sintetiza NO a partir de L-arginina con el fin de evitar la agregación de hemocitos en circulación (185; fig. 17). Posteriormente

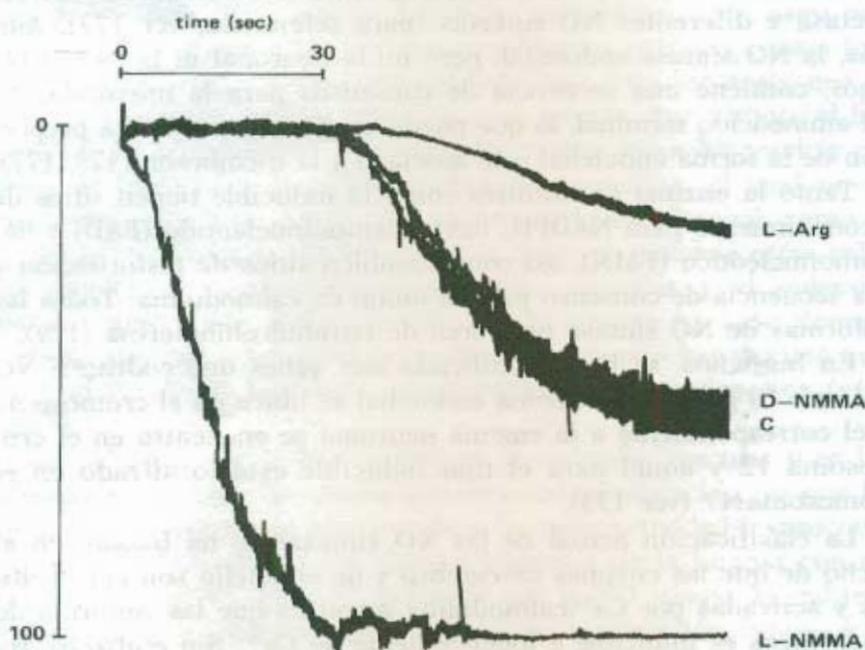


FIG. 17.—Efecto de L-arginina (L-arg) y N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA) sobre la agregación ex vivo de hemocitos del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). La agregación de hemocitos control (c) tiene lugar con un retardo de aproximadamente 30 segundos y alcanza 72 ± 11 por 100 de la máxima transmisión de luz. Este valor no fue significativamente diferente del obtenido en muestras de cangrejos tratados con D-NMMA, el isómero inactivo de L-NMMA ($66 \pm 12\%$ $p > 0.05$; $n = 3$). Sin embargo, la agregación de hemocitos procedentes de cangrejos tratados con L-NMMA, apareció inmediatamente y fue máxima. Por el contrario, hemocitos obtenidos de cangrejos tratados con L-arg. mostraron una agregación disminuida ($19 \pm 11\%$ $n = 3$).

Figura tomada de la referencia 185.

te, se ha demostrado que un insecto hemófago, *Rhodnius prolixus*, inyecta NO unido a Fe^{3+} en la sangre de su presa para producir vasodilatación, inhibir la agregación plaquetaria y facilitar la aspiración de sangre (186), y que la estrella de mar, un equinodermo, se vale del NO como mediador neuronal de su motilidad intestinal (187). Todos estos datos sugieren que la vía L-arginina: NO es un sistema primitivo pero altamente funcional, que ha sido mantenido a través de la evolución del reino animal como señal de comunicación celular.

Quisiera concluir diciendo que los últimos veinte años han sido inmensamente estimulantes en relación a lo que denomino «casualidad, diseño, casualidad». Hemos tropezado con hallazgos que han constituido la base de desarrollos lógicos, sólo para volver a tropezar con lo inesperado. Si alguna guía he observado, ha sido la de mantener una visión amplia mientras analizamos sistemáticamente las hipótesis que constantemente lanzamos como redes. Así, hemos obtenido información acerca de una diminuta parcela de realidad previamente desconocida.

El rasgo más distintivo de todo este proceso ha sido la interacción humana y la manera en la cual tanta gente ha contribuido en forma positiva. De mis primeros días de formación en la Facultad de Medicina de El Salvador puedo distinguir la clara influencia de muchos, sobre todo la de María Isabel Rodríguez y Augusto Campos. De mis días en el Colegio Real de Cirujanos, tanto John Vane como Sergio Ferreira fueron una importante influencia. Durante los últimos 15 años, cuatro personas han contribuido en gran medida a mi investigación: Richard Palmer, Marek Radomski, Gillian Henderson y Annie Higgs. Quisiera también expresar mi agradecimiento al apoyo y colaboración que me han brindado mis colegas y estudiantes de España, entre ellos: Pedro Lorenzo Velázquez, Juan Esplugues, Francisco Guarner, José Ramón Berrazueta, María Angeles Moro, Ignacio Lizasoain, Eduardo Nava, Marisabel Mourelle, Eduardo Salas, Alfredo Martínez y José Rodrigo.

He dicho.

BIBLIOGRAFIA

1. HELME, T. A.: «Contributions to the physiology of the uterus and the physiological action of drugs upon it». *Reports of the Laboratory of the Royal College of Physicians*, Edinburgh, 1891; III, 70-105.
2. GADDUM, J. H.: «The technique of superfusion». *Brit. J. Pharmacol.*, 1953; 8, 321-326.
3. VANE, J. R.: «The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood». *Brit J. Pharmacol.*, 1964; 23, 360-373.
4. VANE, J. R.: «Adventures and excursions in bioassay: the stepping stones to prostacyclin», 1983. *Les Prix Nobel en 1982*. The Nobel Foundation 181-206.
5. MONCADA, S., FLOWER, R. J. & VANE, J. R.: «Prostaglandins, prostacyclin, and thromboxane A_2 ». In *The Pharmacological basis of Therapeutics*, eds. L. S. Goodman and A. Gilman. MacMillan Publishing Co. Inc. New York, 6th edition 1980; 668-681.
6. VANE, J. R.: «Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs». *Nature*, 1971; 231, 232-235.
7. FERREIRA, S. H., MONCADA, S. & VANE, J. R.: «Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen». *Nature*, 1971; 231, 237-239.
8. SMITH, J. B. & WILLIS, A. L.: «Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets». *Nature*, 1971; 231, 235-237.
9. FERREIRA, S. H., MONCADA, S. & VANE, J. R.: «Some effects of inhibiting endogenous prostaglandin formation on the responses of the cat spleen». *Br. J. Pharmac.*, 1973; 47, 48-58.
10. FERREIRA, S. H., MONCADA, S. & VANE, J. R.: «Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs». *Br. J. Pharmacol.*, 1973; 49, 86-97.
11. FERREIRA, S. H., MONCADA, S. & VANE, J. R.: «Prostaglandins and the signs and symptoms of inflammation». In *Prostaglandin synthetase Inhibitors*, eds. H. J. Robinson and J. R. Vane, Raven Press, New York, 1974; 175-187.
12. MONCADA, S.: «Inhibition by aspirin-like drugs of prostaglandin release in the spleen and its effects on the functioning of efferent and afferent nervefibres». *Doctoral Thesis*, University of London, 1974.
13. MONCADA, S. & VANE, J. R.: «Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A_2 and prostacyclin». *Pharmacological Reviews*, 1979; 30, 293-331.
14. PICOT, D., LOLL, P. J. & GARAVITO, R. M.: «The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H_2 synthase-1». *Nature*, 1994; 367, 243-249.
15. XIE, W., ROBERTSON, D. L. & SIMMONS, D. L.: «Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs». *Drug Devel Res*, 1992; 25, 249-265.
16. SINGER, R.: «Acetylsalicylic acid, a probable cause for secondary post-tonsillectomy hemorrhage». *Arch. Otolaryng*, 1945; 42, 19-20.

17. PIPER, P. J. & VANE, J. R.: «Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs». *Nature*, 1969; 223, 29-35.
18. WILLIS, A. L., VANE, F. M., KUHN, D. C., SCOTT, C. G. & PETRIN, M.: «An endoperoxide aggregator (LASS) formed in platelets in response to thrombotic stimuli». *Prostaglandins*, 1974; 8, 453-507.
19. HAMBERG, M., SVENSSON, J., WAKABAYASHI, T. & SAMUELSSON, B.: «Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1974; 71, 345-349.
20. HAMBERG, M., SVENSSON, J. & SAMUELSSON, B.: «Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1974; 71, 3824-3828.
21. HAMBERG, M., SVENSSON, J. & SAMUELSSON, B.: «Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1975; 72, 2994-2998.
22. NEEDLEMAN, P., MONCADA, S., BUNTING, S., VANE, J. R., HAMBERG, M. & SAMUELSSON, B.: «Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A_2 from prostaglandin endoperoxides». *Nature*, 1976; 261, 558-560.
23. MONCADA, S., BUNTING, S., MULLANE, K. M., THOROGOOD, P., VANE, J. R., RAZ, A. & NEEDLEMAN, P.: «Imidazole: A selective potent antagonist of thromboxane synthetase». *Prostaglandins*, 1977; 13, 611-618.
24. MORRISON, F. S. & BALDINI, M. G.: «Antigenic relationship between blood platelets and vascular endothelium». *Blood*, 1969; 33, 46-57.
25. MONCADA, S., NEEDLEMAN, P., BUNTING, S. & VANE, J. R.: «Prostaglandin endoperoxides and thromboxane generating systems and their selective inhibition». *Prostaglandins*, 1976; 12, 323-325.
26. BUNTING, S., MONCADA, S. & VANE, J. R.: «The effects of prostaglandin endoperoxides and thromboxane A_2 on strips of rabbit coeliac artery and certain other smooth muscle preparations». *Br. J. Pharmac.*, 1976; 57, 462P-463P.
27. MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTING, S. & VANE, J. R.: «An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation». *Nature*, 1976; 263, 663-665.
28. PACE-ASCIAK, C.: «Isolation, structure and biosynthesis of 6-keto prostaglandin F_{10} in the rat stomach». *J. Am. Chem. Soc.*, 1976; 98, 2348-2349.
29. JOHNSON, R. A., MORTON, D. R., KINNER, J. H., GORMAN, R. R., MCGUIRE, J. R., SUN, F. F., WHITTAKER, N., BUNTING, S., SALMON, J. A., MONCADA, S. & VANE, J. R.: «The chemical structure of prostaglandin X (prosta-cyclin)». *Prostaglandins*, 1976; 12, 915-928.
30. BURCH, J. W., STANFORD, N. & MAJERUS, P. W.: «Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin». *J. Clin. Invest.*, 1978; 61, 314-319.
31. ROTH, G. J. & MAJERUS, P. W.: «The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein». *J. Clin. Invest.*, 1975; 56, 624-632.
32. ROTH, G. J. & SIOK, C. J.: «Acetylation of the NH_2 -terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin». *J. Biol. Chem.*, 1978; 253, 3782-3784.

33. MARCUS, A. J.: «The role of lipids in platelet function with particular reference to the arachidonic acid pathway». *J. Lipid Res.*, 1978; 19, 793-826.
34. BAENZIGER, N. L., DILLENDER, M. J. & MAJERUS, P. W.: «Cultured human skin fibroblasts and arterial cells produce a labile platelet-inhibitory prostaglandin». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977; 78, 294-301.
35. AMEZCUA, J.-L., PARSONS, M. & MONCADA, S.: «Unstable metabolites of arachidonic acid, aspirin and the formation of the haemostatic plug». *Thromb. Res.*, 1978; 13, 477-488.
36. O'GRADY, J. & MONCADA, S.: «Aspirin: A paradoxical effect on bleeding time». *Lancet*, 1978; ii, 780.
37. PEDERSEN, A. K. & FITZGERALD, G. A.: «Dose-related kinetics of aspirin». *N. Eng. J. Med.*, 1984; 311, 1206-1211.
38. PATRONO, C.: «Aspirin and human platelets: from clinical trials to acetylation of cyclooxygenase and back». *Trends Pharmacol. Sci.*, 1989; 10, 453-458.
39. ANTIPLATELET TRIALISTS' COLLABORATION: «Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy. I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients». *Br. Med. J.*, 1994; 308, 81-106.
40. ANTIPLATELET TRIALISTS' COLLABORATION: «Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy. II: Maintenance of vascular graft or arterial patency by antiplatelet therapy». *Br. Med. J.*, 1994; 308, 159-168.
41. GIMSON, A. E. S., MARTIN, J. F. & GREAVES, M.: «Prostaglandins in liver disease, organ transplantation and extracorporeal circulation». In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 251-264.
42. SINZINGER, H.: «Prostaglandins in ischaemic peripheral vascular disease». In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 209-218.
43. BELCH, J. J. F.: «Prostaglandins in Raynaud's phenomenon». In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 219-239.
44. GRYGLEWSKI, R. J.: «Prostanoids in cerebral ischaemia and stroke». In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 240-250.
45. WENNMALM, A.: «Prostaglandins in myocardial infarction and angina». In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 160-174.
46. COOPER, C. L., CROW, J. W., WHEELER, W. S. & LONG, W. A.: «Prostaglandins in congestive heart failure». In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 187-197.
47. BUTT, A. Y., HIGENBOTTAM, T. W. & WALLWORK, J.: «Prostaglandins and primary pulmonary hypertension». In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 198-208.
48. FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V.: «The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine». *Nature*, 1980; 288, 373-376.

49. FURCHGOTT, R. F.: «Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor». *Acta Physiol. Scand.*, 1990; 139, 257-270.
50. MONCADA, S., PALMER, R. M. J. & HIGGS, E. A.: «Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication». *Biochem. Pharmacol.*, 1989; 38, 1709-1715.
51. VANHOUTTE, P. M.: «Endothelium and control of vascular function». *Hypertension*, 1989; 13, 658-667.
52. IGNARRO, L. J.: «Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide». *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1990; 30, 535-560.
53. RAPOPORT, R. M. & MURAD, F.: «Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP». *Circ. Res.*, 1983; 52, 352-357.
54. MARTIN, W., VILLANI, G. M., JOTHIANANDAN, D. & FURCHGOTT, R. F.: «Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1985; 232, 708-716.
55. GRIFFITH, T. M., EDWARDS, D. H., LEWIS, M. J., NEWBY, A. C. & HENDERSON, A. H.: «The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor». *Nature* 1984; 308, 645-647.
56. COCKS, T. M., ANGUS, J. A., CAMPBELL, J. H. & CAMPBELL, G. R.: «Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture». *J. Cell. Physiol.*, 1985; 123, 310-320.
57. GRYGLEWSKI, R. J., MONCADA, S. & PALMER, R. M. J.: «Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells». *Br. J. Pharmacol.*, 1986; 87, 685-694.
58. GRYGLEWSKI, R. J., PALMER, R. M. J. & MONCADA, S.: «Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor». *Nature*, 1986; 320, 454-456.
59. SINGER, H. A. & PEACH, M. J.: «Endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. Relaxation stimulated by arachidonic acid». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1983; 226, 790-795.
60. FURCHGOTT, R. F.: «The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs». *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1984; 24, 175-197.
61. PINTO, A., ABRAHAM, N. G. & MULLANE, K. M.: «Cytochrome P-450-dependent monooxygenase activity and endothelial-dependent relaxations induced by arachidonic acid». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1986; 236, 445-451.
62. MONCADA, S., PALMER, R. M. J. & GRYGLEWSKI, R. J.: «Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1986; 83, 9164-9168.
63. GIBSON, Q. H. & ROUGHTON, F. J. W.: «The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin». *J. Physiol.*, 1957; 136, 507-526.
64. FURCHGOTT, R. F.: «Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide». In *Vasodilatation: Vascular*

- smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*, ed. by P. M. Vanhoutte, Raven Press New York 1988, 401-414.
65. IGNARRO, L. J., BYRNS, R. E. & WOOD, K. S.: «Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical». In *Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*, ed. by P. M. Vanhoutte, Raven Press, New York 1988; 427-436.
 66. PALMER, R. M. J., FERRIGE, A. G. & MONCADA, S.: «Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor». *Nature*, 1987; 327, 524-526.
 67. STUEHR, D. J. & MARLETTA, M. A.: «Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon- γ ». *J. Immunol.*, 1987; 139, 518-525.
 68. HIBBS, J. B. JR., TAINTOR, R. R. & VAVRIN, Z.: «Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite». *Science*, 1987; 235, 473-476.
 69. PALMER, R. M. J., ASHTON, D. S. & MONCADA, S.: «Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine». *Nature*, 1988; 333, 664-666.
 70. PALMER, R. M. J. & MONCADA, S.: «A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989; 158, 348-352.
 71. REES, D. D., PALMER, R. M. J., HODSON, H. F. & MONCADA, S.: «A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation». *Br. J. Pharmacol.*, 1989; 96, 418-424.
 72. AMEZCUA, J. L., DUSTING, G. J., PALMER, R. M. J. & MONCADA, S.: «Acetylcholine induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide, the endogenous nitrovasodilator». *Br. J. Pharmacol.*, 1988; 95, 830-834.
 73. AMEZCUA, J. L., PALMER, R. M. J., DE SOUZA, B. M. & MONCADA, S.: «Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit». *Br. J. Pharmacol.*, 1989; 97, 1119-1124.
 74. REES, D. D., PALMER, R. M. J. & MONCADA, S.: «Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1989; 86, 3375-3378.
 75. VALLANCE, P., COLLIER, J. & MONCADA, S.: «Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man». *Lancet*, 1989; ii, 997-1000.
 76. GARDINER, S. M., COMPTON, A. M., BENNETT, T., PALMER, R. M. J. & MONCADA, S.: «Regional haemodynamic changes during oral ingestion of N^G-monomethyl-L-arginine or N^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats». *Br. J. Pharmacol.*, 1990; 101; 10-12.
 77. GARDINER, S. M., COMPTON, A. M., BENNETT, T., PALMER, R. M. J. & MONCADA, S.: «Persistent haemodynamic changes following prolonged infusions of N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) in conscious rats». In *Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system*, eds. S. Moncada & E. A. Higgs, Elsevier, Amsterdam, 1990, 489-491.

78. MONCADA, S., PALMER, R. M. J. & HIGGS, E. A.: «The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator». *Hypertension*, 1988; 12, 365-372.
79. FEELISCH, M.: «The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions». *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1991; 17, S25-S33.
80. WALDMAN, S. A. & MURAD, F.: «Cyclic GMP synthesis and function». *Pharmacol. Rev.*, 1987; 39, 163-196.
81. RADOMSKI, M. W. & MONCADA, S.: «Biological role of nitric oxide in platelet function». In: *Clinical relevance of nitric oxide in the cardiovascular system*, eds. S. Moncada, E. A. Higgs, J. R. Bertrazueta. EDICOMPLET S. S., Madrid, 1991, 3-28.
82. BATH, P. M. W., HASSALL, D. G., GLADWIN, A. M., PALMER, R. M. J. & MARTIN, J. F.: «Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium *in vitro*». *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1991; 11, 254-260.
83. KUBES, P., SUZUKI, M. & GRANGER, D. N.: «Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1991; 86, 4651-4655.
84. GARG, U. C. & HASSID, A.: «Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells». *J. Clin. Invest.*, 1989; 83, 1774-1777.
85. FORSTERMANN, U.: «Properties and mechanisms of production and action of endothelium-derived relaxing factor». *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1986; 8, S45-S51.
86. COX, D. A., VITA, J. A., TREASURE, C. B., FISH, R. D., ALEXANDER, R. W., GANZ, P. & SELWYN, A. P.: «Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans». *Circulation*, 1989; 80, 458-465.
87. CELERMAJER, D. S., SORENSEN, K. E., GOOCH, V. M., SPIEGELHALTER, D. J., MILLER, O. I., SULLIVAN, I. D., LLOYD, J. K. & DEANFIELD, J. E.: «Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis». *Lancet*, 1992; 340, 1111-1115.
88. DREXLER, H., ZEIHNER, A. M., MEINZER, K. & JUST, H.: «Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients». *Lancet*, 1991; 338, 1546-1550.
89. CREAGER, M. A., GALLAGHER, S. J., GIRERD, X. J., COLEMAN, S. M., DZAU, V. J. & COOKE, J. P.: «L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans». *J. Clin. Invest.*, 1992; 90, 1248-1253.
90. COOKE, J. P. & TSAO, P.: «Cellular mechanisms of atherogenesis and the effects of nitric oxide». *Current Opinion in Cardiology*, 1992; 7, 799-804.
91. PANZA, J. A., QUYYUMI, A. A., BRUSH, J. E., EPSTEIN, S. E.: «Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension». *N. Engl. J. Med.*, 1990; 232, 22-27.
92. CALVER, A., COLLIER, J., MONCADA, S. & VALLANCE, P.: «Effect of local intra-arterial N^G-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal». *J. Hypertension*, 1992; 10, 1025-1031.

93. CHEN, P. Y. & SANDERS, P. W.: «L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats». *J. Clin. Invest.*, 1991; 88, 1559-1567.
94. NAKAKI, T., HISHIKAWA, K., SUZUKI, H., SARUTA, T. & KATO, R.: «L-arginine-induced hypotension». *Lancet*, 1990; 336, 696.
95. PETROS, A. J., HEWLETT, A. M., BOGLE, R. G. & PEARSON, J. D.: «L-arginine-induced hypotension». *Lancet*, 1991; 337, 1044-1045.
96. MONCADA, S. & HIGGS, A.: «The L-arginine-nitric oxide pathway». *N. Engl. J. Med.*, 1993; 329, 2002-2012.
97. FRATACCI, M.-D., FROSTELL, C. G., CHEN T.-Y., WAIN, J. C., ROBINSON, D. R. & ZAPOL, W. M.: «Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator of heparin-protamine vasoconstriction in sheep». *Anesthesiology*, 1991; 75, 990-999.
98. FROSTELL, C., FRATACCI, M.-D., WAIN, J. C., JONES, R. & ZAPOL, W. M.: «Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction». *Circulation*, 1991; 83, 2038-2047.
99. PEPKE-ZABA, J., HIGENBOTTAM, T. W., DINH-XUAN, A. T., STONE, D. & WALLWORK, J.: «Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension». *Lancet*, 1991; 338, 1173-1174.
100. ROSSAINT, R., FALKE, K. J., LÓPEZ, F., SLAMA, K., PISON, U. & ZAPOL, W. M.: «Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome». *N. Engl. J. Med.*, 1993; 328, 399-405.
101. GERLACH, H., PAPPERT, D., LEWANDOWSKI, K., ROSSAINT, R. & FALKE, K. J.: «Long-term inhalation with evaluated low doses of nitric oxide for selective improvement of oxygenation in patients with adult respiratory distress syndrome». *Intensive Care Med.*, 1993; 19, 443-449.
102. GUSTAFSSON, L. E., LEONE, A. M., PERSSON, M. G., WIKLUND, N. P. & MONCADA, S.: «Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991; 181, 852-857.
103. DEGUCHI, T.: «Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal-soluble fraction of rat brain». *J. Biol. Chem.*, 1977; 252, 7617-7619.
104. DEGUCHI, T. & YOSHIOKA, M.: «L-arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells». *J. Biol. Chem.*, 1982; 257, 10147-10152.
105. MIKI, N., KAWABE, Y. & KURIYAMA, K.: «Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide». *Biochem Biophys Res. Commun.*, 1977; 75, 851-856.
106. KNOWLES, R. G., PALACIOS, M., PALMER, R. M. J., & MONCADA, S.: «Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1989, 86, 5159-5162.
107. GARTHWAITE, J., CHARLES, S. L. & CHESS-WILLIAMS, R.: «Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain». *Nature*, 1988; 336, 385-388.
108. GARTHWAITE, J.: «Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system». *Trends in Neurosciences*, 1991; 14, 60-67.

109. GARTHWAITE, J.: «Nitric oxide signalling in the nervous system». *The Neurosciences*, 1993; 5, 171-180.
110. FORSTERMANN, U., GORSKY, L. D., POLLOCK, J. S., SCHMIDT, H. H., HELLER, M. & MURAD, F.: «Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain». *Biochem Biophys Res. Commun.*, 1990; 168, 727-732.
111. BREDET, D. S., HWANG, P. M. & SNYDER, S. H.: «Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide». *Nature*, 1990; 347, 768-770.
112. SPRINGALL, D. R., RIVEROS-MORENO, V., BUTTERY, L., SUBURO, A., BISHOP, A. E., MERRETT, M., MONCADA, S. & POLAK, J. M.: «Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms». *Histochemistry*, 1992; 98, 259-266.
113. RODRIGO, J., SPRINGALL, D. R., UTTENTHAL, O., BENTURA, M. L., ABADIA-MOLINA, F., RIVEROS-MORENO, V., MARTINEZ-MURILLO, R., POLAK, J. M. & MONCADA, S.: «Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain». *Philosophical Transactions B*, The Royal Society, 1994, 345, 175-221.
114. SHIBUKI, K., OKADA, D.: «Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum». *Nature*, 1991; 349, 326-328.
115. BOHME, G. A., BON, C., STUTZMANN, J.-M., DOBLE, A. & BLANCHARD, J.-C.: «Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation». *Eur. J. Pharmacol.*, 1991; 199, 379-381.
116. O'DELL, T. J., HAWKINS, R. D., KANDEL, E. R. & ARANCIO, O.: «Test of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 1991; 88, 11285-11289.
117. SCHUMAN, E. M. & MADISON, D. V.: «A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation». *Science*, 1991; 254, 1503-1506.
118. COLLINGRIDGE, G. L., KEHL, S. J. & MCLENNAN, H.: «Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus». *J. Physiol.*, 1983; 334, 33-46.
119. CHAPMAN, P. F., ATKINS, C. M., ALLEN, M. T., HALEY, J. E. & STEINMETZ, J. E.: «Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning». *NeuroReport.*, 1992; 3, 567-570.
120. TOGASHI, H., SAKUMA, I., YOSHIOKA, M., KOBAYASHI, T., YASUDA, H., KITABATAKE, A., SAITO, H., GROSS, S. S. & LEVI, R.: «A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992; 262, 343-347.
121. TODA, N. & OKAMURA, T.: «Regulation by nitroxidergic nerve of arterial tone». *News Physiol. Sci.*, 1992; 7, 148-152.
122. GALLY, J. A., READ, P., MONTAGUE, P. R., REEKE, JR. G. N. & EDELMAN, G. M.: «The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 1990; 87, 3547-3551.
123. MORLEY, J. E. & FLOOD, J. F.: «Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice». *Life Sciences*, 1991; 49, 707-711.

124. McMAHON, S. B., LEWIN, G. R. & WALL, P. D.: «Central hyperexcitability triggered by noxious inputs». *Current Opinion in Neurobiol.*, 1993; 3, 602-610.
125. KOLESNIKOV, Y. A., PICK, C. G. & PASTERNAK, G. W.: «N^G-nitro-L-arginine prevents morphine tolerance». *Eur. J. Pharmacol.*, 1992; 221, 399-400.
126. DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., LONDON, E. D., BREDT, D. S. & SNYDER, S. H.: «Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1991; 88, 6368-6371.
127. MOLLACE, V., BAGETTA, G. & NISTICO, G.: «Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide». *Neuro Report*, 1991; 2, 269-272.
128. NOWICKI, J. P., DUVAL, D., POGNET, H. & SCATTON, B.: «Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse». *Eur. J. Pharmacol.*, 1991; 204, 339-340.
129. SANCESARIO, G., IANNONE, M., D'ANGELO, V., NISTICO, G. & BERNARDI, G.: «N^ω-nitro-L-arginine-methyl ester inhibits electrocortical recovery subsequent to transient global brain ischemia in mongolian gerbil». *Funct Neurol.*, 1992, 7, 123-127.
130. DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., UHL, G. R. & SNYDER, S. H.: «Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1993; 90, 3256-3259.
131. KOPROWSKI, H., ZHENG, Y. M., HEBER-KATZ, E., FRASER, N., RORKE, L., FU, Z. F., HANLON, C. & DIETZSCHOLD, B.: «In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1993; 90, 3024-3027.
132. HOPE, B. T., MICHAEL, G. J., KNIGGE, K. M. & VINCENT, S. R.: «Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1991; 88, 2811-2814.
133. DAWSON, T. M., BREDT, D. S., FETUKI, M., HWANG, P. M. & SNYDER, S. H.: «Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1991; 88, 7797-7801.
134. ZIELASEK, J., TAUSCH, M., TOYKA, K. V., HARTUNG, H.-P.: «Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages». *Cellular Immunol.*, 1992; 141, 111-120.
135. BOJE, K. M. & ARORA, P. K.: «Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death». *Brain. Res.*, 1992; 587, 250-256.
136. DUARTE, I. D. G., LORENZETTI, B. B. & FERREIRA, S. H.: «Acetylcholine induces peripheral analgesia by the release of nitric oxide». In *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*, eds. S. Moncada and E. A. Higgs, Elsevier, Amsterdam, 1990; 165-170.
137. GILLESPIE, J. S., LIU, X., MARTIN, W.: «The neurotransmitter of the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves to smooth muscle of the genital system». In *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*, eds. S. Moncada and E. A. Higgs, Elsevier, Amsterdam, 1990; 147-164.

138. RAND, M. J.: «Nitrgergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission». *Clin. Exper. Pharmacol. & Physiol.*, 1992; 19, 147-169.
139. LI, C. G. & RAND, M. J.: «Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus». *Eur. J. Pharmac.*, 1990; 191, 303-309.
140. DESAI, K. M., SESSA, W. C. & VANE, J. R.: «Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid». *Nature*, 1991; 351, 477-479.
141. TOTTRUP, A., SVANE, D. & FORMAN, A.: «Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter». *Am. J. Physiol.*, 1991; 260, G385-G389.
142. MOURELLE, M., GUARNER, F., MONCADA, S. & MALAGELADA, J.-R.: «The arginine: nitric oxide pathway relaxes the sphincter of Oddi and modulates its motor activity». *Gastroenterology*, 1993; 105, 1299-1305.
143. MOURELLE, M., GUARNER, F., MOLERO, X., MONCADA, S. & MALAGELADA, J.-R.: «Regulation of gall bladder motility by the arginine-nitric oxide pathway in guinea pig». *Gut.*, 1993; 34, 911-915.
144. BULT, H., BOECKXSTAENS, G. E., PELCKMANS, P. A. & JORDAENS, F. H., VAN MAERCKE, Y. M. & HERMAN, A. G.: «Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter». *Nature*. 1990; 345, 346-347.
145. TAM, F. S.-F. & HILLIER, K.: «The role of nitric oxide in mediating non-adrenergic non-cholinergic relaxation in longitudinal muscle of human taenia coli». *Life Sciences*, 1992; 51, 1277-1284.
146. BURLEIGH, D. E.: «N^G-nitro-L-arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxation of human gut». *Gastroenterology*, 1992; 102, 679-683.
147. VANDERWINDEN, J.-M., MAILLEUX, P., SCHIFFMANN, S. N., VANDERHAEGHEN, J.-J. & DE LAET, M.-H.: «Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis». *N. Engl. J. Med.*, 1992; 327, 511-515.
148. MEARIN, F., MOURELLE, M., GUARNER, F., SALAS, A., RIVEROS-MORENO, V., MONCADA, S. & MALAGELADA, J.-R.: «Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction». *Eur. J. Clin. Invest.*, 1993; 23, 724-728.
149. CALIGNANO, A., WHITTLE, B. J. R., DI ROSA, M. & MONCADA, S.: «Involvement of endogenous nitric oxide in the regulation of rat intestinal motility *in vivo*». *Eur. J. Pharmacol.*, 1992; 229, 273-276.
150. HOLMQUIST, F., HEDLUND, H. & ANDERSSON, K.: «L-N^G-nitro arginine inhibits non-adrenergic noncholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum». *Acta Physiol. Scand.*, 1991; 141, 441-442.
151. RAJFER, J., ARONSON, W. J., BUSH, P. A., DOREY, F. J. & IGNARRO, L. J.: «Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic noncholinergic neurotransmission». *N. Eng. J. Med.*, 1992; 326, 90-94.
152. KIM, N., AZADZOI, K. M., GOLDSTEIN, I. & DE TEJADA, I. S.: «A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle». *J. Clin. Invest.*, 1991; 88, 112-118.

153. BURNETT, A. L., LOWENSTEIN, C. J., BREDDT, D. S., CHANG, T. S. K. & SNYDER, S. H.: «Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection». *Science*, 1992; 257, 401-403.
154. LI, C. G. & RAND, M. J.: «Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide». *Br. J. Pharmacol.*, 1991; 102, 91-94.
155. BELVISI, M. G., STRETTON, C. D., YACOB, M. & BARNES, P. J.: «Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans». *Eur. J. Pharmacol.*, 1992; 210, 221-222.
156. PERSSON, K., IGAWA, Y., MATTIASSON, A. & ANDERSSON, K.-E.: «Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat lower urinary tract *in vivo* and *in vitro*». *Br. J. Pharmacol.*, 1992; 107, 178-184.
157. MITCHELL, H. H., SHOHLER, K. A. & GRINDLEY, H. S.: «The origin of the nitrates in the urine». *J. Biol. Chem.*, 1916; 24, 461-490.
158. GREEN, L. C., TANNENBAUM, S. R. & GOLDMAN, R.: «Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat». *Science*, 1981; 212, 56-58.
159. STUEHR, D. J. & MARLETTA, M. A.: «Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1985; 82, 7738-7742.
160. HIBBS, J. B. JR., VAVRIN, Z. & TAINTOR, R. R.: L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells». *J. Immunol.*, 1987; 138, 550-565.
161. MARLETTA, M. A., YOON, P. S., IYENGAR, R., LEAF, C. D. & WISHNOK, J. S.: «Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate». *Biochemistry*, 1988; 27, 8706-8711.
162. HIBBS, J. B. JR., TAINTOR, R. R., VAVRIN, Z. & RACHLIN, E. M.: «Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule». *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 1988; 157, 87-94.
163. STUEHR, D., GROSS, S., SAKUMA, I., LEVI, R. & NATHAN, C.: «Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide». *J. Exp. Med.*, 1989; 169, 1011-1020.
164. HIBBS, J. B. JR., TAINTOR, R. R., VAVRIN, Z., GRANGER, D. L., DRAPIER, J.-C., AMBER, I. J. & LANCASTER, J. R. JR.: «Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron». In *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*, eds. S. Moncada and E. A. Higgs, Elsevier, Amsterdam, 1990, 189-223.
165. NATHAN, C. F. & HIBBS, J. B. JR.: «Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity». *Current Opinion in Immunology*, 1991; 3, 65-70.
166. MONCADA, S., PALMER, R. M. J. & HIGGS, E. A.: «Nitric oxide; physiology, pathophysiology and pharmacology». *Pharm. Revs.*, 1991; 43, 109-142.
167. RADOMSKI, M. W., PALMER, R. M. J. & MONCADA, S.: «Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1990; 87, 10043-10047.

168. DI ROSA, M., RADOMSKI, M., CARNUCCIO, R. & MONCADA, S.: «Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990; 172, 1246-1252.
169. BECKMAN, J. S., BECKMAN, T. W., CHEN, J., MARSHALL, P. A. & FREEMAN, B. A.: «Apparent hydroxy radical production by peroxyxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1990; 87, 1620-1624.
170. CURRAN, R. D., BILLIAR, T. R., STUEHR, D. J., HOFMANN, K. & SIMMONS, R. L.: «Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products from Kupffer cells». *J. Exp. Med.*, 1989; 170, 1769-1774.
171. VALLANCE, P. & MONCADA, S.: «Nitric oxide-from mediator to medicine». *J. Royal College of Physicians*, 1994; 28, 209-219.
172. VALLANCE, P. & MONCADA, S.: «The role of endogenous nitric oxide in septic shock». *New Horizons*, 1993; 1, 77-86.
173. KNOWLES, R. G. & MONCADA, S.: «Nitric oxide synthases in mammals». *Biochem. J.*, 1994; 298, 249-258.
174. SCHMIDT, H. H. H. W. & MURAD, F.: «Purification and characterization of a human NO synthase». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991; 181, 1372-1377.
175. BREDT, D. S., HWANG, P. M., GLATT, C. E., LOWENSTEIN, C., REED, R. R. & SNYDER, S. H.: «Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase». *Nature*, 1991; 351, 714-718.
176. LAMAS, S., MARSDEN, P. A., LI, G. K., TEMPST, P. & MICHEL, T.: «Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1992; 89, 6348-6352.
177. XIE, Q., CHO, H. J., CALAYCAY, J., MUMFORD, R. A., SWIDEREK, K. M., LEE, T. D., DING, A., TROSO, T., NATHAN, C.: «Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages». *Science*, 1992; 256, 225-228.
178. FORSTERMANN, U., SCHMIDT, H. H. H. W., POLLOCK, J. S., SHENG, H., MITCHELL, J. A., WARNER, T. D., NAKANE, M. & MURAD, F.: «Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types». *Biochem Pharmacol.*, 1991; 42, 1849-1857.
179. KNOWLES, R. G. & MONCADA, S.: «Nitric oxide as a signal in blood vessels». *Trends in Biochemical Sciences*, 1992; 17, 399-402.
180. CHO, J. H., XIE, Q.-W., CALAYCAY, J., MUMFORD, R. A., SWIDEREK, K. M., LEE, T. D. & NATHAN, C.: «Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages». *J. Exp. Med.*, 1992; 176, 599-604.
181. SALTER, M., KNOWLES, R. G. & MONCADA, S.: «Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases». *FEBS Lett.*, 1991, 291, 145-149.
182. PALMER, R. M. J., ANDREWS, T., FOXWELL, N. A. & MONCADA, S.: «Glucocorticoids do not affect the induction by interleukin-1 of Ca²⁺-dependent NO synthase in rabbit chondrocytes». *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 1992; 188, 209-215.

183. WEINER, C. P., LIZASOAIN, I., BAYLIS, S. A., KNOWLES, R. G., CHARLES, I. G. & MONCADA, S.: «Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones». *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1994; 91, 5212-5216.
184. BAGETTA, G., CORASANITI, M. T., MELINO, G., PAOLETTI, A. M., FINAZZI-AGRO, A. & NISTICO, G.: «Lithium and tacrine increase the expression of nitric oxide synthase mRNA in the hippocampus of rat». *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 1993; 197, 1132-1139.
185. RADOMSKI, M. W., MARTIN, J. F. & MONCADA, S.: «Synthesis of nitric oxide by the haemocytes of the American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*)». *Phil. Trans. R. Soc. Lond B*, 1991; 334, 129-133.
186. RIBEIRO, J. M. C., HAZZARD, J. M. H., NUSSENZVEIG, R. H., CHAMPAGNE, D. E. & WALKER, F. A.: «Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect». *Science*, 1993; 260, 539-541.
187. MARTÍNEZ, A., RIVEROS-MORENO, V., POLAK, J. M., MONCADA, S. & SESMA, P.: «Nitric oxide (NO) synthase-immunoreactivity in the starfish *Marthasterias glacialis*». *Cell and Tissue Res.*, 1994; 275, 599-603.

LAUDATIO

Excmo. Sr. D. PEDRO SÁNCHEZ GARCÍA

Académico de Número

Excmo. Sr. Presidente

Exmos. Señores Académicos

Sras. y sres.

I

Esta es una ocasión especial. Hoy un día singular. Vivir este momento un regalo para quien les habla. Por ello ustedes entenderán perfectamente la gratitud que debo a mis compañeros de Academia. Ellos han permitido que yo pronuncie el discurso de presentación, «la laudatio» del profesor Salvador Moncada, que hoy ingresa en nuestra Academia como Académico de Honor. El profesor Moncada es un entrañable y querido amigo mío, una persona ejemplar y un científico de muchos quilates y alcance planetario. ¡Gracias!, pues, Sr. Presidente; ¡gracias!, Sres. Académicos, por el honor que me hacen. Pocas cosas podrían alcanzarme tanto.

Salvador es una persona joven, imaginativa, e ilusionada, que goza del raro privilegio de transmitir su entusiasmo a quienes le rodean. Es de los que *"prefiere el camino a la posada"*. No podía ser menos cuando él ha inaugurado rutas nuevas jamás holladas; ha vivido y descubierto realidades por otros apenas soñadas.

Conocí a Salvador Moncada en su patria de adopción, El Salvador (C.A.), en la década de los sesenta, una luminosa mañana tropical, muy entrada la primavera, cuando se acercó a la Facultad de Medicina, donde yo trabajaba en aquel entonces, para solicitar su admisión como estudiante. Llamó a la puerta de mi despacho. Yo

debía entrevistarle como requisito previo para su ingreso. Aun recuerdo aquel joven, alegre, activo, brillante y soñador. Treinta años más tarde, aún joven, aquella pristina promesa juvenil se ha confirmado. Tenía ya entonces y sigue teniendo la fortaleza, disciplina y carácter de un corredor de fondo. Las cotas que alcanzó dan fe. En todo caso queda mucho por venir. Salvador es de las personas que se maravillan ante las cosas que son y se pregunta porque no han sido las que no son y se pone manos a la obra.

Recibir hoy a una persona con el talento y el talante que posee Don Salvador Moncada, es motivo de particular satisfacción. Méritos a él le sobran, tanto como a mí fervor para ejercer el gozoso derecho de la alabanza.

Se ha dicho que algunos hombres despiertan admiración en razón de sus valores intelectuales; otros, quizás menos, lo hacen por el encanto magnético que emana de su personalidad; cuando ambos atributos se dan juntos en la misma persona, su influencia se hace irresistible. Este hombre es Salvador.

II

Nació Don Salvador Moncada en Tegucigalpa (Honduras) mediados los años cuarenta. Siendo todavía un niño, con poco más de cuatro años, su familia se vio obligada, por razones políticas, a vivir exiliada en El Salvador, un hermoso país también conocido como el Pulgarcito de Centro América. Su padre, don Salvador, luchaba por la libertad de su pueblo. Estas debilidades, entonces, y a veces ahora, solían costar penas, cuando no sangre, sudor y lágrimas. El dictador Tiburcio Arias no debió entender muy bien la tentación democrática de Don Salvador y decretó su exilio. Y fue El Salvador su segunda patria.

«... Hasta donde puedo recordar —me dice— siempre estuve interesado por la Biología y por los experimentos biológicos...». Con no más de 10 años, Salvador recogió algunas hormigas gigantes (Zompopos de Mayo) que aparecen en El Salvador pocos días antes del comienzo de la estación lluviosa y que sólo viven un par de días. Trató de reproducir, en una caja, el ambiente en el que estos insectos se desarrollaban naturalmente, con la idea de mantenerlos vivos durante semanas o meses. Hermoso y crítico experimento juvenil que desgraciadamente falló. Sólo Dios sabe cuanto ayudaron estas pristinas vivencias al desarrollo de su vocación científica. El profesor

Moncada tuvo siempre muy clara la idea de estudiar Medicina y estaba convencido de que su vocación era la Pediatría. Error éste de gran alcance para la Pediatría, pero un regalo singular para la Farmacología. Estarán ustedes de acuerdo.

Esta peripecia vital de infancia y juventud, unida a la vivencia de libertad que respira en el ámbito familiar, a su entusiasmo y apasionamiento, probablemente condicionaron su trayectoria personal y científica. Los psicólogos tienen razón; una infancia así vivida da como resultado hombres adultos libres, equilibrados y que saben de donde vienen y adonde van.

III

Salvador estudió el Bachillerato en el Instituto Nacional de El Salvador. En aquellos años, todavía un adolescente, se da cuenta de la terrible injusticia social que vive su país de adopción, lo mismo que sus hermanos centroamericanos y recuerda con profundo pesar —me dice— las hambres de todo tipo y el sufrimiento del pueblo salvadoreño. Esta vivencia desarrolló en él un sentimiento de solidaridad y el hábito de la lucha, que le hacen rechazar todo tipo de opresión. En este ambiente comienza su carrera en la Facultad de Medicina apenas estrenados los años 60. Le distingue siempre su carácter hondureño de nacimiento y salvadoreño de adopción y de corazón. Allí le conocí yo como alumno.

En la Facultad de Medicina de El Salvador —confiesa— encontró un ambiente intelectualmente muy estimulante. Su paso por aquella querida Facultad, a caballo entre la Doble Vía y el Hospital Rosales y al amor del Parque de Cuscatlán, donde florecen el Arbol de Fuego y los Maquilishuats, fue crítica en la vida de Salvador. En aquel entonces era ya una Facultad modélica, treinta y bastantes años hace; modélica digo, y no es un decir, con lenguaje de Vallejo, en el continente americano. Y ello fue obra de grandes maestros; en particular del profesor Fabio Castillo y de la profesora María Isabel Rodríguez, a quien hoy felizmente tenemos sentada en la Presidencia de esta Real Academia. Para mí, aquello fue una experiencia inolvidable. Con frecuencia acostumbro a decir que nuestra Facultad de Medicina de la UAM, empieza a parecerse a la Facultad de Medicina salvadoreña que yo viví. El propio Salvador me dice: «...Apenas ingresé me sentí fascinado por aquel ambiente. Al final de mi primer año traté de buscar un trabajo durante las vacaciones y me topé con el Dr. Milton Thiago de

Mello trabajando en un proyecto sobre la "Enfermedad de Chagas". Gocé la oportunidad y me envenenó...».

IV

«Los años que estudié Anatomía, Fisiología y Farmacología —cuenta Salvador— fueron los mejores. Al lado de Fabio Castillo, María Isabel Rodríguez y Augusto Campos me sentí atraído por la Farmacología y la Medicina Experimental. Ya no pensé más en ser pediatra.»

«Al margen de ofrecernos un ambiente médico estimulante aquellos años contribuyeron a nuestro desarrollo intelectual —dice—. Allí se discutía de todo, de ciencia, poesía, arte y justicia social. Ello nos permitió entrar en contacto con la obra de Freud, Russel, Ghandi, César Vallejo, León Felipe, Picasso, Vivaldi y finalmente Marx.»

Hablando con Salvador afloran recuerdos de aquellos días. Uno puede escucharle recitar un poema de César Vallejo o León Felipe. Por ejemplo:

*«Qué estará haciendo esta hora
mi andina y dulce Rita de
junco y capulí; ahora que me
asfixia bizancio y dormita
la sangre como flojo cognac dentro de mí»*

(César Vallejo)

*«Que no se acostumbre el pie
a pisar el mismo suelo
ni el tablado de la farsa
ni la losa de los templos»*

(León Felipe)

Los fines de semana trabajaba y soñaba mientras estudiaba con el Dr. Campos el problema del escape vagal, la paradoja cocaínica y otras cosas de menor importancia, que diría César Vallejo. Pero reconoce, con emoción, que su principal influencia científica la recibió de la Dra. M.^a Isabel Rodríguez por su entusiasmo, fortaleza de carácter y su visión y entendimiento de la realidad.

No hace mucho, con ocasión de un seminario en la Fundación Wellcome, al que me invitó el profesor Salvador Moncada, decía yo: *«...Salvador pertenece a esa clase de personas que conoce muy bien sus prerrogativas pero se siente especialmente orgulloso de sus obligaciones. Su gran autoridad, por todos reconocida, radica en saber fo-*

mentar el ambiente adecuado para no tener necesidad de ejercerla...». Pertenece a esa clase de hombres que casi todo lo hacen bien, a quienes todo les sale bien y que a casi todos caen bien. Es de los que abre el apetito de aprender.

V

«Yo vivía —comenta— feliz en El Salvador, inmerso en el mundo intelectual que me rodeaba; pero la injusticia social flagrante en el país me llevó a la política. Después de una intensa actividad debí abandonar rápidamente el país a mitad de los 70. Me vi obligado a vivir separado de mi familia (Doris y Claudia). Entonces conocí, con ocasión de un viaje a Guatemala, al Dr. Fernando Molina, profesor de Fisiología y amigo personal de juventud de Sir John Vane, que me conectó con él para viajar a Inglaterra y trabajar bajo su tutela. Allí obtuve el Doctorado en Farmacología (Ph. D.).»

Salvador llegó al reino Unido en febrero de 1971 y comenzó a trabajar en el grupo de John Vane en el Royal College of Surgeons. John le encargó el estudio de los efectos de la aspirina sobre las respuestas evocadas por ácido araquidónico. El experimento fue un éxito y Salvador se integró en el grupo del propio Vane y Sergio Ferreira, un apasionado, inteligente y original brasileño, que trabajaban juntos con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Este proyecto constituyó una vivencia única de lo que representa la emoción de descubrir en Ciencia y el germen de su tesis para obtener el grado de p.H.D. Los resultados de este trabajo pertenecen ya al acervo mundial de la cultura médica.

VI

Con un gran bagaje científico a la espalda, Salvador decide volver a Honduras, su patria (1974), y allí permanece dos años tratando de sacar del marasmo la ciencia local. La situación de su país era extremadamente pobre tanto física como intelectualmente. No se podía investigar. Un año más tarde es invitado de nuevo por John Vane para trabajar, en los Laboratorios de Investigación de la Fundación Wellcome, sobre los mecanismos de la inflamación en el área de prostanoïdes y sus derivados. Salvador, en colaboración con Philip Needelman y Stuart Bunting, descubrió y purificó a partir de plaquetas humanas un enzima que transforma los endoperoxidos de PGs en TXA₂, enzima conocido como tromboxano-sintetasa. Pero indudablemente la contri-

bución más original y crítica en el área de los prostanoides fue el descubrimiento de la prostaciclina. En colaboración con Riszard, Grygleski y Bunting demuestra la presencia de un compuesto nuevo formado en el endotelio que inicialmente se denominó prostaglandina X y resultó ser uno de los antiagregantes más potentes que se conocen. El Dr. Moncada sugirió que al margen de existir un componente vasoconstrictor y proagregante, el tromboxano A_2 , debía existir y de hecho existía otro vasodilatador y antiagregante. Era la prostaciclina; todavía sin cristianar. Los resultados experimentales fueron contundentes y la hipótesis se confirmó. Salvador comenta que esta fue la vez que más cerca estuvo de correr y gritar ¡Eureka!

La identificación de la estructura de PGX se hizo en colaboración con Laboratorios Upjohn y se anunció en un Congreso Internacional en Santa Mónica (California, USA) el día 3 de diciembre de 1976, cuando Salvador cumplía 32 años.

VII

La aventura del NO

Apenas descubierto el EDRF (factor relajante de origen endotelial) por Robert Furchgott, Moncada comienza a interesarse por este problema (1985). Utilizando técnicas de bioensayo en cascada, rápidamente hace dos descubrimientos fundamentales: 1.º) que el EDRF se destruye por iones superóxido y 2.º) que muchos inhibidores del EDRF, lo hacen a través de este mecanismo. Furchgott pronto reconoció la importancia de estos descubrimientos para el desarrollo posterior de sus ideas sobre EDRF. Así llega el año 1986, cuando Furchgott discute en Minnesota (USA) la posibilidad de que el EDRF pudiera ser óxido nítrico (NO). El doctor Moncada vuelve a Londres, idea un sistema para valorar óxido nítrico y comparar sus efectos con los del EDRF endógeno. Ello le permite concluir que EDRF y NO eran la misma cosa. Para ello, utilizó un ingenioso sistema de chemolimunicencia desarrollado por la industria automovilística para medir óxido nítrico como agente de polución en la atmósfera. Un año más tarde, descubre que el NO es biosintetizado a partir de l-arginina y que no solamente se produce en los vasos, sino también en el cerebro. Estos hechos, conjuntamente con la observación de que la inhibición del enzima que sintetiza óxido nítrico —NO sintasa— da lugar a hipertensión, y que los macrófa-

gos generan NO representan las piedras angulares sobre las que descansa el edificio NO. Hasta qué punto ha llegado es increíble. Visto retrospectivamente parece mentira que de una observación tan sencilla, elegante y hasta cierto punto heterodoxa, como para ser rechazada inicialmente por los editores de Nature cuando el Dr. Robert F. Furchgott envió el trabajo sobre EDRF, se haya llegado a la situación actual. El EDRF de Furchgott y el NO de Moncada andan ya por el mundo solos. Alcanzaron la mayoría de edad; pero todavía viven una placentera juventud. Cuánto les queda y hasta dónde llegarán sólo Dios lo sabe. En todo caso este descubrimiento constituye uno de los más sencillos, espectaculares y elegantes de la segunda mitad de nuestro siglo. Justamente el 18 de diciembre del pasado año el NO fue elegido como la "molécula del año" por la revista Science con el curioso título. "NO news are good news".

VIII

Ustedes lo han visto. Salvador Moncada, hombre joven, sencillo, generoso y apasionado, si los hay, genio y talento a la vez, ha desarrollado una labor farmacológica excepcional y universalmente reconocida.

Pero al margen de su interés estrictamente científico, no debemos dejar de reseñar el profundo impacto que los hallazgos de Salvador han tenido en la práctica médica. Sirvan como ejemplo, al respecto, la aceptación universal del efecto antitrombótico de la Aspirina a pequeñas dosis y su valor en la prevención de accidentes cardio y cerebrovasculares; la dieta a base de pescado en la prevención de accidentes vasculares, y sus contribuciones a la fisiopatología del asma, reacciones anafilácticas, shock y comunicación intercelular.

IX

Pero Salvador no es sólo un científico excepcional; es algo más. Vive profundamente la realidad social y política de su tiempo. Le preocupa la libertad y el respeto a la dignidad humana, el desarrollo cultural y el bienestar de su pueblo y de todos los pueblos de este planeta. *Se ha dicho que si bien inicialmente la política puede condicionar el desarrollo científico, en última instancia es la Ciencia quien condiciona la política, la libertad y el desarrollo de los pueblos.* Por ello trabaja activa e ilusionadamente para mejorar el nivel cien-

tífico de los países hispanoamericanos. Su tesón y entusiasmo constituyen ejemplo digno de imitar. Con este fin ha participado en numerosos programas de Educación e Investigación Médica y sanitaria y como asesor a través de la OPS, en Méjico, Venezuela, República Dominicana, Brasil, Argentina, Cuba, etc. ¿Y qué decir de su respeto y amor por nuestra tierra? Acostumbra a decir que España es su casa y tiene razón. Muchos de nuestros jóvenes científicos han tenido el privilegio de formarse en su laboratorio.

X

El profesor Salvador Moncada ha recibido numerosos galardones y el reconocimiento y gratitud de la comunidad científica internacional. No podía por menos de ser así. *Quien* descubrió el mecanismo de acción de la aspirina y de otros antiinflamatorios no esteroideos; *quien* por vez primera barrunta y descubre la prostaciclina; *quien* fue capaz de vislumbrar y demostrar, utilizando grandes dosis de ingenio, que el EDRF es simplemente NO (óxido nítrico); *quién* además de todo esto goza con alegría de las cosas buenas que esta vida ofrece; *quien* ama y goza y conoce profundamente la poesía, la pintura y la música de su tiempo; *quien* vive preocupado por los problemas científicos, culturales, sociales y políticos de su pueblo y de todos los pueblos de este planeta, ¡Señores!, además de un científico cabal es algo más; un ser humano excepcional. Por esta razón no puede extrañar que todo el mundo le respete y admire, y que haya recibido las más altas distinciones. Valgan como ejemplo: en España, el Premio Príncipe de Asturias y Doctorados Honoris Causa por varias Universidades, nombramientos como Académico de Honor de Reales Academias de Medicina, además de múltiples reconocimientos en el resto del mundo. Entre ellos, recientemente, el Premio Amsterdam para Medicina concedido por la Real Academia de Artes y Ciencias. Además en su país natal, Honduras, donde se le condecoró con la más alta distinción: la Orden del Mérito «José Cecilio del Valle».

Debo terminar y termino. Querido Salvador: la Real Academia Nacional de Medicina de España se siente orgullosa de recibirte como «Académico de Honor». En nombre propio y de los miembros de esta Academia, templo sagrado del saber médico, ¡bienvenido a su seno! Con un fraternal y fuerte abrazo. ¡Contamos contigo!

He dicho.