



Disfunción endotelial en trasplante renal

M. Crespo y J. M. Campistol

Unidad de Trasplante Renal. Hospital Clínic. IDIBAPS (Institut d'Investigació Biomediques Agusti Pi i Sunyer). Barcelona.

FUNCIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL: CONCEPTOS Y RELEVANCIA

El endotelio es la monocapa celular heterogénea que recubre de forma continua la pared interna de los vasos del organismo de los mamíferos. Constituye una barrera selectiva expuesta a efectos mecánicos (flujo, presión y distensión) y químicos (hipoxia, isquemia, agentes oxidantes). Posee propiedades de secreción de sustancias vasoactivas, que además participan en el control del crecimiento, la hemostasia y la interacción de la pared vascular con las células sanguíneas. Interviene en la regulación de los lípidos plasmáticos y en la modulación del fenotipo del músculo liso vascular también por mecanismos no paracrinos^{1,2}.

La disfunción endotelial o ruptura del equilibrio entre los diversos factores endoteliales con función contrapuesta supone la pérdida de su función homeostática y, a veces, una alteración morfológica, en respuesta a agresiones diversas o como manifestación de patología primaria. Revisiones monográficas recogen múltiples aportaciones científicas en la relación hipertensión arterial-disfunción endotelial^{1,2}. Algunos estudios en pacientes con hipertensión arterial esencial sitúan la disfunción endotelial en el origen de la patología, y de forma específica la producción o la degradación del óxido nítrico (NO)³. Por otro lado, muchos estudios muestran que el endotelio constituye un órgano diana, ya que por su extensión y localización sufre los efectos no sólo de la hipertensión arterial, sino del envejecimiento, la arteriosclerosis, la hiperglucemia, la dislipemia y otras patologías o factores de riesgo cardiovascular, y puede contribuir a la perpetuación del daño⁴⁻⁶. Otros autores sugieren que se trata probablemente de un factor de riesgo cardiovascular interrelacionado con los clásicos, ya que algún estudio no objetiva la existencia de disfunción endotelial en enfermos con las patologías referidas. Es decir, su

presencia identificaría individuos con mayor riesgo de morbi-mortalidad cardiovascular^{4,7}.

Más allá del papel de causa o efecto de la disfunción endotelial, es importante señalar que la disfunción endotelial está implicada en el desarrollo del daño orgánico asociado a la hipertensión arterial, y a otros factores de riesgo cardiovascular. Por tanto, es importante establecer medidas terapéuticas, que no sólo normalicen la tensión arterial, la cifra de glucemia o de lípidos, sino que contribuyan a reparar o mejorar la función endotelial. De hecho algunos de los fármacos que hoy usamos como antihipertensivos confieren una protección orgánica superior a la que se desprendería del mero descenso de las cifras de tensión arterial, y esto podría ser debido a una mejoría intrínseca de la función endotelial⁸.

ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN HUMANOS

La disfunción endotelial es un tema relevante y cada vez más presente en las publicaciones científicas que estudian la morbi-mortalidad cardiovascular. La pérdida del equilibrio funcional del endotelio supone una alteración de sus funciones de barrera y de secreción reguladora del tono vasomotor, crecimiento muscular, hemostasia e interacción celular¹.

Se han ideado diversas estrategias para acercarse al conocimiento de la disfunción de este «órgano regulador». Sin embargo, la mayor parte de los estudios se han centrado en explorar la capacidad de respuesta vasomotora dependiente del endotelio, así como la capacidad secretora de sustancias (tabla I). Hasta el momento, el estudio en humanos se encuentra relativamente limitado por el difícil acceso al endotelio y la ausencia de marcadores bioquímicos aplicables a diferentes patologías y territorios vasculares.

La *determinación de sustancias* derivadas o expresadas por el endotelio (NO sintasa, nitritos y nitra-

Correspondencia: Dr. Josep M. Campistol
Unidad de Trasplante Renal
Hospital Clínic de Barcelona
C/ Villarroel, 170
08036 Barcelona
E-mail: jmcampis@clinic.ub.es

El presente proyecto ha sido financiado parcialmente por una ayuda del Instituto de Salud Carlos III (FIS 01/1513).

Tabla I. Estudio de la disfunción endotelial en humanos

<i>Determinaciones analíticas:</i>		
Sustancias derivadas del endotelio.		
Genes involucrados en la producción de sustancias.		
Marcadores indirectos.		
<i>Estudio del tono vasomotor:</i>		
<i>In vivo:</i>	Técnicas no invasivas	Doppler Onda del pulso
	Técnicas invasivas	Pletismografía Angiografía
<i>Ex vivo:</i>	Miógrafo de alambre	
	Miógrafo de perfusión	

tos, superóxidodismutasa, preproendotelina, PAI-1) trata de aclarar el papel que juegan el déficit funcional de la vía del NO, prostaglandinas o el exceso relativo de endotelina. La búsqueda de marcadores indirectos de disfunción endotelial (factor de Von Willebrand, microalbuminuria) es un camino prometedor y más cercano a la práctica clínica^{1,2,9}.

Los métodos más aceptados hoy en el estudio de la disfunción endotelial son los que exploran el *tono vasomotor* en relación con la liberación de sustancias derivadas del endotelio *in vivo* o *ex vivo*, en arterias de conducción o en arterias de resistencia. A continuación comentaremos de manera resumida una serie de técnicas utilizadas hoy en día en el estudio de la disfunción endotelial en humanos. Todas ellas se basan fundamentalmente en el conocido fenómeno de la vasodilatación endotelio-dependiente¹⁰. El endotelio libera óxido nítrico como sustancia vasodilatadora en respuesta a diversos estímulos, entre ellos acetilcolina o flujo sanguíneo^{11,12}. El NO difunde a través de la pared de los vasos hacia la capa muscular, donde incrementa la concentración de GMP cíclico y provoca vasodilatación¹³.

Evaluación de los cambios en el tono vasomotor *in vivo*

Hoy en día contamos con diversas técnicas, más o menos complejas, que permiten evaluar la función endotelial utilizando fundamentalmente los cambios de flujo ocasionados por estímulos dependientes o independientes de la integridad de la monocapa endotelial. Estos estudios habitualmente se realizan en unas condiciones «ideales» de reposo y temperatura, y evidentemente en pacientes cuidadosamente seleccionados.

Técnicas no invasivas

Entre las técnicas no invasivas, en general basadas en el uso de ultrasonidos, se ha utilizado la ecografía doppler para medir la respuesta vasodilatadora en arterias de conducción (arteria braquial o femoral) frente a distintos estímulos. Habitualmente miden la vasodilatación endotelio-dependiente desencadenada por hiperemia post-isquemia tras la colocación de un esfigmomanómetro proximal durante varios minutos; y la vasodilatación endotelio-independiente en respuesta a la administración sistémica de donadores de NO, por ejemplo nitroglicerina sublingual. El ecógrafo registra el diámetro arterial y la velocidad de flujo, habitualmente en la parte final de la fase de diástole cardíaca^{14,15}. Se ha utilizado el láser doppler para estudiar la función endotelial en la microcirculación cutánea. Gracias al efecto doppler es posible analizar la captación de la luz reflejada por las células sanguíneas de estos lechos vasculares. Los fármacos se administran (acetilcolina, nitroprusiato, etc.) de forma tópica actuando por iontoforesis, y se mide la perfusión en el lecho elegido^{16,17}.

El estudio *de la onda del pulso* recupera una técnica antigua incruenta, rápida y económica para el estudio de la elasticidad vascular. La técnica utiliza un monitor con software integrado que se coloca superficialmente en la zona de mayor pulso de la arteria radial para registrar la onda del pulso. El análisis de la onda del pulso permite derivar la curva de presión aórtica a partir de la onda de presión de la arteria radial. En la curva registrada se obtienen el índice de distensibilidad de grandes arterias y el índice de distensibilidad de pequeños vasos. Una alteración de este último sugiere la existencia de disfunción endotelial¹⁸.

Técnicas invasivas

Las técnicas invasivas, aunque suponen un riesgo mayor, son las más sensibles. El estudio de la función endotelial usando la pletismografía consiste en la determinación de la respuesta vascular a la infusión de diversos fármacos en la arteria humeral. Se coloca un catéter en la arteria humeral, a través del cual se administran acetilcolina, nitroprusiato u otras sustancias. Un manguito de mercurio conectado a un pletismógrafo registra cambios porcentuales de volumen, y los almacena en una tarjeta electrónica. La presión arterial se registra de forma invasiva a través del catéter, y la resistencia vascular se obtiene dividiendo la presión arterial media entre el flujo arterial¹⁹. Esta técnica se realiza de tal manera que la infusión de fár-

macos no alcanza la circulación general en una concentración adecuada como para activar mecanismos sistémicos. De esta manera se puede estudiar la acción intrínseca de los mismos sobre el músculo liso vascular en el territorio de la arteria humeral.

En el campo de la cardiología, y fundamentalmente del trasplante cardíaco, se ha empleado la *angiografía* cuantitativa (coronariografía) post-infusión local de fármacos para evaluar la disfunción endotelial²⁰. También en este campo, varios estudios combinan *angiografía* y *doppler* en un intento de obtener una información más precisa. Valoran la reserva funcional de flujo coronario mediante doppler intravascular introducido a través de un catéter colocado en un vaso coronario y la modificación del diámetro de los vasos epicárdicos frente a estímulos endotelio-dependientes o endotelioindependientes con angiografía²¹⁻²³. Se ha utilizado también esta metodología para explorar la función endotelial en vasos grandes de músculo esquelético²⁴.

Evaluación de los cambios en el tono vasomotor *ex vivo*: miógrafo de alambre y miógrafo de perfusión

El desarrollo del *miógrafo de alambre* por el grupo de Mulvany en Dinamarca en los años 70 marcó el inicio del estudio *in vitro* de los vasos de resistencia. En un principio, la atención se centró en el estudio de la estructura de estos vasos y en la respuesta al uso de potasio o vasoconstrictores, como noradrenalina, y angiotensina^{25,26}. Un mejor conocimiento del endotelio y la identificación del NO han permitido expandir sus posibilidades en el estudio de la disfunción endotelial. Al margen del estudio del tono vasomotor en respuesta a sustancias vasodilatadoras dependientes e independientes de NO, se explora la respuesta frente a inhibidores de NO, nuevos vasoconstrictores (análogos), y estímulos eléctricos²⁷. Si bien inicialmente se utilizaron vasos de resistencia en animales, diversos grupos están evaluando pequeños vasos de resistencia de grasa subcutánea humana con esta técnica²⁸.

El miógrafo de alambre adapta la técnica de estudio de anillos vasculares —generalmente anillos de aorta abdominal— en baño de órganos y permite estudiar segmentos vasculares de 100-400 micras de diámetro —u otras estructuras tubulares de pequeño tamaño— y un máximo de 2 mm de longitud. En la luz de estos segmentos se disponen dos alambres de tungsteno, uno de ellos unido a un transductor de fuerza, que registra los cambios de tensión producidos, y el otro a un tornillo micrométrico que permi-

te modificar el diámetro del vaso. Se escoge un diámetro basal para realizar medidas y experimentos con la adición de fármacos a las cámaras²⁵. Un polígrafo o un programa informático registra las curvas en que el transductor transforma los cambios de tensión en la pared del vaso en respuesta a estímulos variados.

En comparación con el estudio *in vivo* de grandes-medios vasos por medio de pletismografía, el miógrafo permite aislar de forma relativamente atraumática vasos de resistencia y estudiarlos en condiciones isométricas fijadas por el investigador. Es decir, aislados de otras variables de confusión relacionadas con la fisiología humana y controlando adecuadamente la administración de fármacos²⁹.

El *miógrafo de perfusión* con cámara de presurización permite estudiar estos segmentos vasculares de resistencia en condiciones más fisiológicas y evita manipular el endotelio. Consta de dos cánulas de vidrio: una distal fija y una proximal móvil conectada a un transductor de presión. La presión transmural es producida por una columna de solución fisiológica conectada a la microcánula distal. Se fija una presión intraluminal óptima para estudios funcionales y se administran los fármacos escogidos. Esta técnica se ha usado fundamentalmente para la realización de estudios morfológicos^{27,30}.

PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR EN TRASPLANTE RENAL

El trasplante renal se ha ido afianzando gracias a los avances técnicos y farmacológicos, y constituye hoy en día la terapéutica de elección en la insuficiencia renal crónica terminal. Sin embargo la supervivencia del injerto a largo plazo no ha experimentado la misma mejoría que los resultados a corto plazo^{31,32}. Las causas de pérdida del injerto a largo plazo son, en orden de incidencia, la nefropatía crónica del injerto y la muerte del paciente con injerto funcionante, en su mayor parte debida a patología cardio-vascular. Estos dos procesos comparten mecanismos etiopatogénicos comunes y los factores de riesgo cardio-vascular juegan un papel fundamental en el desarrollo de ambas patologías. A los factores de riesgo, clásicos, hoy en día debemos añadir la disfunción endotelial existente en el paciente trasplantado renal.

Factores de riesgo cardiovascular clásicos

Múltiples factores de riesgo cardiovascular influyen en la evolución del injerto y del receptor de trasplante renal: edad, hipertensión arterial, dislipe-

mia, diabetes mellitus, obesidad o tabaquismo³³. Estos factores están ya presentes en la etapa previa de insuficiencia renal y diálisis, pero algunos de ellos se acentúan post-trasplante debido al tratamiento inmunosupresor.

El *incremento de la edad* de los enfermos que inician tratamiento sustitutivo con diálisis y también de los que reciben un trasplante renal ha llevado además aparejado un cambio en la etiología de la insuficiencia renal. Predominan hoy en día la enfermedad vascular renal ligada a hipertensión arterial y la diabetes³¹. También ha aumentado la edad de los donantes de órganos, ha cambiado la etiología de su muerte y la presencia de patología. Estos últimos factores condicionan con frecuencia una cierta *insuficiencia renal* desde el inmediato post-trasplante y una mayor incidencia de hipertensión³⁴. La alta prevalencia de *hipertensión arterial* post-trasplante renal (> 75%) viene sobre todo condicionada por el tratamiento inmunosupresor con inhibidores de la calcineurina y esteroides, pero también por la presencia de disfunción renal, la pre-existencia de hipertensión o de riñones nativos presores. La *dislipemia*, habitualmente hipercolesterolemia con leve hipertrigliceridemia, es también muy frecuente (40-60%) en el trasplantado renal. La pre-existencia de dislipemia, la obesidad, la aparición de proteinuria, la diabetes o el tratamiento con inhibidores de la calcineurina (sobre todo ciclosporina), corticoides o rapamicina influyen en el desarrollo de dislipemia. La *diabetes mellitus* es relativamente más frecuente en aquellos enfermos obesos y/o los que reciben tratamiento con corticoides y tacrólimus. Los corticoides y un mayor bienestar favorecen también la *obesidad*. El *hábito tabáquico* incide como en la población general, pero su efecto negativo, dada la asociación con los factores de riesgo comentados, es aún mayor³⁵.

Estos factores de riesgo no son sólo más frecuentes que en la población general, sino que se hayan estrechamente interrelacionados y muy condicionados por la medicación inmunosupresora.

Disfunción endotelial en trasplante renal

La mayor parte de los factores de riesgo cardiovascular, previamente comentados, se han relacionado con la existencia de disfunción endotelial. Algunos estudios han evaluado la presencia de disfunción endotelial en el enfermo con trasplante renal, destacando por su interés y posible intervención aquellos que tratan de analizar el papel del tratamiento inmunosupresor en el desarrollo de disfunción endotelial.

De forma aislada, la *presencia de uremia* puede ser causa de disfunción endotelial. Diversos estudios han explorado la participación de la disfunción endotelial en nefritis agudas mediadas inmunológicamente o en el fracaso renal agudo de etiología variada³⁶. Sin embargo, es la influencia de la disfunción endotelial asociada a insuficiencia renal crónica (IRC) la que nos interesa en el campo del trasplante renal. En este sentido, Aaljkaer y cols. no encontraron afectación de la estructura vascular o de la respuesta vasomotora frente a calcio, angiotensina II o noradrenalina en enfermos en hemodiálisis sin hipertensión, y sí en aquellos enfermos con hipertensión y uremia³⁷. Morris y cols. estudiaron *ex vivo* arterias de resistencia subcutáneas con miógrafo de alambre y demostraron una menor respuesta a la acetilcolina en 12 enfermos con IRC frente a controles sanos, sin diferencias en la respuesta frente a nitroprusiato, sugiriendo una menor disponibilidad de NO en estos enfermos³⁸. Se ha encontrado una disminución en la producción de NO en grupos de enfermos con IRC sin tratamiento dialítico, aunque algunos de ellos presentaban una severa arteriosclerosis³⁹. Otra teoría, sugiere que la disfunción endotelial es la que predispone a una arteriosclerosis acelerada, que a su vez, participa en la patogénesis de la hipertensión arterial en la IRC. Hipótesis varias tratan de explicar la generación de la disfunción endotelial en este tipo de enfermos: disminución de la actividad de la NOS, aumento de la degradación por stress oxidativo, etc. Este tema ha sido comentado más ampliamente en otro de los capítulos de este monográfico (Casos y cols.).

El papel del NO en el período inmediato post-trasplante

El NO es una molécula inmunológicamente activa, que participa en procesos citotóxicos de inmunidad celular y de inmunorregulación que se desarrollan post-trasplante. Así *durante el rechazo agudo*, la activación celular estimula la producción de citoquinas, y éstas la producción de NO a partir de la iNOS. Diversos estudios han demostrado un incremento en la producción de NO medido por determinación de nitritos y nitratos, expresión de iNOS en biopsias y NO exhalado, en rechazo agudo post-trasplante renal, hepático, cardíaco, pulmonar e incluso trasplante experimental de islotes, pancreáticos⁴⁰⁻⁴⁵. En un estudio reciente, Romero y cols. encontraron una disminución en la expresión de iNOS en respuesta al tratamiento del rechazo con corticoides⁴⁶. Devlin y cols. observaron una menor producción de NO e incidencia de rechazo agudo

en enfermos tratados con FK506, en comparación con aquellos que recibían una inmunosupresión basada en ciclosporina⁴⁰. Por el contrario, en un estudio realizado con ratas, la asociación de L-arginina en el inmediato post-trasplante producía efectos protectores: menor inflamación, oclusión vascular y trombosis⁴⁷. La producción de NO parece ser reflejo de la actividad inmune secundaria a la aparición de mecanismos inmunológicos de rechazo agudo.

Datos de disfunción endotelial en etapas posteriores tras el trasplante renal

En el trasplante renal es importante saber si a largo plazo predomina la acción potencialmente citotóxica del NO, que favorecería el desarrollo del daño vascular, o sus propiedades de protección vascular.

En un modelo de rechazo crónico en trasplante de aorta Shears y cols. demostraron que la estimulación de la iNOS protegía frente a la arteriosclerosis. El tratamiento con inhibidores de la iNOS provocaba un significativo engrosamiento de la neointima, y sin embargo la transferencia del gen de la iNOS disminuía la hiperplasia intimal. En este estudio observaron también que la administración de ciclosporina a 10 mg/kg/día disminuía la expresión de iNOS y por tanto permitía un mayor engrosamiento de la íntima en respuesta a la agresión del vaso por angioplastia⁴⁸. Además la administración de fármacos donantes de NO en modelos de rechazo crónico de trasplante de aorta parece reducir la vasculopatía⁴⁹.

Otros estudios han intentado evaluar la disfunción endotelial de causa no inmune, con la intención de contribuir a clarificar el papel que juega la disfunción endotelial en la morbilidad cardiovascular en este tipo de enfermos y en la nefropatía crónica del injerto. Hausberg y cols. encontraron una alteración de la función endotelial y una distensibilidad de la arteria braquial reducida —medidas por doppler— en 16 trasplantados renales en tratamiento con ciclosporina en comparación con 16 controles sanos. Sin embargo, no existían diferencias en la vasodilatación endotelio-dependiente, lo cual descartaba que las diferencias pudieran ser atribuidas a una menor capacidad vasodilatadora arterial en los trasplantados renales. En este estudio encontraron también disfunción endotelial en ocho trasplantados que no recibían ciclosporina en su esquema inmunosupresor. Las alteraciones presentes se mantuvieron una vez ajustados los resultados por función renal, colesterol, y tensión arterial⁵⁰. En un modelo de rechazo crónico en ratas, Vaskonen y cols. observaron una menor vasodilatación endotelio-dependiente en arterias mesentéricas de ratas trasplantadas en trata-

miento con ciclosporina-corticoides-azatioprina, y en aquellas uninefrectomizadas con el tratamiento previo, frente a ratas controles. En los dos primeros grupos se objetivó un aumento de tensión arterial tras la introducción del tratamiento inmunosupresor, más marcada en el grupo trasplantado⁵¹. Es decir, la ciclosporina induce la aparición de hipertensión y el rechazo crónico también; y estos tres factores se asocian con disfunción endotelial.

Existen factores muy difícilmente modificables (uremia previa), y sin embargo parece posible moderar o suprimir el efecto de otros. En la mayor parte de los estudios, el tratamiento inmunosupresor con inhibidores de la calcineurina parece involucrado en la disfunción endotelial. Un estudio holandés encuentra una mejoría o disminución en los niveles de factor von Willebrand y de p-selectina, utilizados como marcadores de disfunción endotelial, en 15 trasplantes renales en cuyo régimen inmunosupresor se sustituyó la ciclosporina por mofetil micofenolato⁵². Morris y cols. demostraron con pletismografía una producción menor de NO basal y estimulada en trasplantados renales tratados con ciclosporina frente a aquellos que recibían azatioprina o sujetos control⁵³.

En la disfunción endotelial del trasplantado renal se ha analizado el efecto de la administración de fármacos, que en estudios clínico-patológicos han demostrado una cierta protección frente a la nefropatía crónica del injerto. En enfermos portadores de trasplante renal e hipertensión se ha estudiado la influencia comparada del tratamiento con lisinopril frente a nifedipina. En un estudio con doppler de la función endotelial a nivel microvascular en 40 enfermos con tratamiento prolongado con este antagonista del calcio se observó una vasodilatación endotelio-dependiente significativamente menor que en los 35 enfermos que recibían lisinopril. Estos últimos presentaron una vasodilatación endotelio-dependiente similar a la de diez controles normotensos y sanos⁵⁴. Williams y cols. encontraron una mejor función endotelial tras la administración de 2 g de vitamina C en un estudio cruzado doble ciego de 13 pacientes randomizados para recibir vitamina C o placebo⁵⁵. Un estudio prospectivo —basal y a los seis meses— en dos grupos de 18 trasplantados renales con presiones arteriales semejantes que recibieron fluvastatina o placebo mostró una mejoría de la vasodilatación endotelio-dependiente en los enfermos que recibían tratamiento con estatinas⁵⁶.

En resumen, en el enfermo trasplantado renal confluyen varios factores de riesgo cardio-vascular clásicos, a los que actualmente sabemos que se suma la disfunción endotelial. No se conoce con exactitud

si la disfunción endotelial es una patología primaria o bien secundaria a la presencia de otros factores de riesgo cardio-vascular. Es difícil aislar unos factores de otros en este tipo de enfermos, que además suelen tener una historia de patología previa (IRC, hipertensión, dislipemia). Parece evidente que, entre los fármacos inmunosupresores, los inhibidores de la calcineurina son más tóxicos a nivel endotelial. También existen fármacos protectores, como los antioxidantes, los inhibidores del sistema renina-angiotensina y las estatinas. Sin embargo, la mayor parte de los estudios han sido realizados con un número limitado de enfermos, la mayor parte de las veces en estudios transversales, con escasas experiencias comparando distintos inmunosupresores y en general mediante la aplicación de una técnica *in vivo*. Nosotros nos proponemos estudiar un grupo homogéneo de trasplantados renales y subgrupos de pacientes en función del esquema inmunosupresor. Utilizaremos técnicas de estudio de disfunción endotelial *in vivo* y *ex vivo*, de forma prospectiva y seguimiento con objeto de conocer mejor este fenómeno en el trasplantado renal, así como evaluar la posible reversibilidad de la disfunción endotelial asociada a la uremia.

BIBLIOGRAFÍA

- Disfunción endotelial (NO/ET) e hipertensión arterial. Aspectos fisiopatológicos y terapéuticos. Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la lucha contra la Hipertensión Arterial, 1999.
- Aleixandre de Artiñano MA, Ortega Mateo AI: Función y disfunción endotelial. Editorial Complutense. Enero, 2000.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka L, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda L, Yasue H, Nakao K: Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Is Positively Associated With Essential Hypertension. *Hypertension* 32: 3-8, 1998.
- Luscher TF: The Endothelium and Cardiovascular Disease. A Complex Relation. *N Engl J Med* 330: 1081-1083, 1994.
- Todd ME: Hypertensive structural changes in blood vessels: do endothelial cells hold the key? *Can J Physiol Pharmacol* 70(4): 536-551, 1992.
- Wayne Alexander R: Hypertension and the Pathogenesis of Atherosclerosis Oxidative Stress and the Mediation of Arterial Inflammatory Response: a New Perspective. *Hypertension* 25: 155-161, 1995.
- Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Benjamin N, Ritter JM: Preserved Endothelium-Dependent Vasodilatation in Patients with Essential Hypertension. *N Engl J Med* 330: 1036-1040, 1994.
- Sharifi AM, Li JS, Endemann D, Schiffrin EL: Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 16(4): 457-465, 1998.
- Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012, 1993.
- Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
- Ignarro U, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G: Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 181-189, 1988.
- Murad F: The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog Horm Res* 49: 239-248, 1994.
- Zenere BM, Arcaro G, Saggiani F, Rossi L, Muggeo M, Lechi A: Noninvasive detection of functional alterations of the arterial wall in IDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes Care* 18(7): 975-982, 1995.
- Arcaro G, Zenere BM, Saggiani F, Zenti MG, Monauni T, Lechi A, Muggeo M, Bonadonna RC: ACE inhibitors improve endothelial function in type 1 diabetic patients with normal arterial pressure and microalbuminuria. *Diabetes Care* 22: 1536-1542, 1999.
- Wardell K, Naver HK, Nilsson GE, Wallin BG: The cutaneous vascular axon reflex in humans characterized by laser Doppler perfusion imaging. *J Physiol (Lond)* 460: 185-199, 1993.
- Asberg A, Midtvedt K, Vassbotn T, Hartmann A: Better microvascular function on long-term treatment with lisinopril than with nifedipine in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 16(7): 1465-1470, 2001.
- Wilkinson IB, Cockcroft JR, Webb DJ: Pulse wave analysis and arterial stiffness. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 (Supl. 1): S33-S37, 1998.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE: Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323(1): 22-27, 1990.
- Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P: Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315(17):1046-1051, 1986.
- Wilson RF, Laughlin DE, Ackell PH, Chilian WM, Holida MD, Hartley CJ, Armstrong ML, Marcus NIL, White CW: Transluminal, subselective measurement of coronary artery blood flow velocity and vasodilator reserve in man. *Circulation* 72: 82-92, 1985.
- Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G: Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 342(7): 454-460, 2000.
- Asberg A, Midtvedt K, Vassbotn T, Hartmann A: Better microvascular function on long-term treatment with lisinopril than with nifedipine in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 16(7): 1465-1470, 2001.
- Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C y cols.: Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 98: 2709-2715, 1998.
- Mulvany MJ, Halpern W: Mechanical properties of vascular smooth muscle cells *in situ*. *Nature* 260(5552): 617-619, 1976.
- Mulvany MJ, Halpern W: Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19-26.
- Mulvany MJ, Aalkjaer C: Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 70(4): 921-961, 1990.

28. Schiffrin EL, Deng LY, Larochelle: Blunted effects of endothelin upon small subcutaneous resistance arteries of mild essential hypertensive patients. *J Hypertens* 10(5): 437-44, 1992.
29. Goode GK, Heagerty AM: *In vitro* responses of human peripheral small arteries in hypercholesterolemia and effects of therapy. *Circulation* 91(12): 2898-903, 1995.
30. Falloon BJ, Stephens N, Tulip JR, Heagerty AM: Comparison of small artery sensitivity and morphology in pressurized and wired-mounted preparations. *Am J Physiol* 268(2 Pt 2): H670-678, 1995.
31. Cecka JM: The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 1-21, 1999.
32. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D: Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2; 342(9): 605-612, 2000.
33. Kasiske BL: Cardiovascular disease after renal transplantation. *Semin Nephrol* 20(2): 176-187, 2000.
34. Carter JT, Lee CM, Weinstein RJ, Lu AD, Dafoe DC, Alfrey EL: Evaluation of the older cadaveric kidney donor: the impact of donor hypertension and creatinine clearance on graft performance and survival. *Transplantation* 70(5): 765-771, 2000.
35. Kasiske BL, Klinger D: Cigarette smoking in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 11(4): 753-759, 2000.
36. Orida KN, Lai ChS: Nitric oxide and the renal patient. *Dialysis & Transplantation* 29(4): 174-186, 2000.
37. Aalkjaer C, Pedersen EB, Danielsen H, Fjeldborg O, Jespersen B, Kjaer T, Sorensen SS, Mulvany MJ: Morphological and functional characteristics of isolated resistance vessels in advanced uraemia. *Clin Sci (Colch)* 71(6): 657-663, 1986.
38. Morris ST, McMurray JJ, Spiers A, Jardine AG: Impaired endothelial function in isolated human uremic resistance arteries. *Kidney Int* 60(3): 1077-1082, 2001.
39. Robert W, Peter B, Hijmering M, Stroes E, Verhaar M, Kastelein J, Versluis K, Lagerwerf F, Van Rijn H, Koomans H, Rabelink T: Nitric Oxide Production Is Reduced in Patients With Chronic Renal Failure. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19: 1168-1172, 1999.
40. Devlin J, Palmer RM, Gonde CE, O'Grady J, Heaton N, Tan KC, Martin JF, Moncada S, Williams R: Nitric oxide generation. A predictive parameter of acute allograft rejection. *Transplantation* 58(5): 592-595, 1994.
41. Benvenuti C, Bories PN, Loisanche D: Increased serum nitrate concentration in cardiac transplant patients. A marker for acute allograft cellular rejection. *Transplantation* 61(5): 745-749, 1996.
42. Silkoff PE, Caramori M, Tremblay L, McClean P, Chaparro C, Kesten S, Hutcheon M, Slutsky AS, Zamel N, Keshavjee S: Exhaled nitric oxide in human lung transplantation. A noninvasive marker of acute rejection. *Am J Respir Crit Care Med* 157(6 Pt 1): 1822-1828, 1998.
43. Casanova D, Martino E, Perojo I, Ramos C, Erce C, Rodriguez A, Salas E, Berrazueta JR, Amado A: Is the High Level of Nitric Oxide Metabolites a Marker in Early Rejection After Experimental Islet Pancreas Transplantation? *Transplantation Proceedings* 30 (2): 639-640, 1998.
44. Shannon D, Smith, Marcia A, Wheeler, Marc I, Lorber, Robert M: Weiss Temporal changes of cytokines and nitric oxide products in urine from renal transplant patients. *Kidney Int* 58(2): 829-837, 2000.
45. Albrecht EW, Van Goor H, Tiebosch AT, Moshage H, Tegzess AM, Stegeman CA: Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in acute human renal allograft rejection. *Transplantation* 70(11): 1610-1616, 2000.
46. Romero M, García-Monzón C, Clemente G, Salcedo M, Álvarez E, Majano PL, Moreno-Otero R: Intrahepatic expression of inducible nitric oxide synthase in acute liver allograft rejection: evidence of modulation by corticosteroids. *Liver Transpl Jan* 7(1): 16-21, 2001.
47. Vos IH, Rabelink TJ, Dorland B, Loos R, Van Middelaar B, Grono HJ, Joles JA: Larginine supplementation improves function and reduces inflammation in renal allografts. *J Am Soc Nephrol* Feb; 12(2): 361-367, 2001.
48. Larry L, Shears II, Kawaharada N, Tzeng E, Billiar TR, Simon C, Watkins, Kovesdi I, Lizonova A, Si M: Pham FK409, a Spontaneous Nitric Oxide Releaser, Attenuates Allograft Vasculopathy in a Rat Aortic Transplant Model. *Circulation Research* 87: 66, 2000.
49. Fukada J, Schena S, Tack I, Ruiz P, Kurimoto Y, Pang M, Aitouche A, Abe T, Striker LJ, Si M: Pham FK409, a Spontaneous Nitric Oxide Releaser, Attenuates Allograft Vasculopathy in a Rat Aortic Transplant Model. *Circulation Research* 87: 66, 2000.
50. Hausberg M, Kisters K, Kosch M, Rahn KH, Barenbrock M: Flow-mediated vasodilation and distensibility of the brachial artery in renal allograft recipients. *Kidney Int* 55(3): 1104-1110, 1999.
51. Vaskonen T, Mervaala E, Nevala R, Soots A, Krogerus L, Lahteenmaki T, Karppanen H, Vapaatalo H, Ahonen J: Development of chronic allograft rejection and arterial hypertension in Brown Norway rats after renal transplantation. *Blood Press* 9(2-3): 162-168, 2000.
52. Schrama YC, Van Dam T, Fijnheer R, Hene RJ, De Groot P, Rabelink TL: Cyclosporine is associated with endothelial dysfunction but not with platelet activation in renal transplantation. *Neth J Med* 59(1): 6-5, 2001.
53. Morris ST, McMurray JJ, Rodger RS, Farmer R, Jardine AG: Endothelial dysfunction in renal transplant recipients maintained on cyclosporine. *Kidney Int* 57 (3): 1100-1106, 2000.
54. Williams MJ, Sutherland WH, McCormick MP, De Jong SA, McDonald JR, Walker RJ: Vitamin C improves endothelial dysfunction in renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant* 16 (6): 1251-1255, 2001.
55. Hausberg M, Kosch M, Stam F, Heidenreich S, Kisters K, Rahn KH, Barenbrock M: Effect of fluvastatin on endothelium-dependent brachial artery vasodilation in patients after renal transplantation. *Kidney Int* 59(4): 1473-1479, 2001.