
Aspectos fisiológicos y fisiopatológicos del óxido nítrico en los tejidos mamíferos.

Mariela Molero-Leal.

Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Apartado 526, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Óxido nítrico (ON), tejidos mamíferos, sintasa de óxido nítrico (SON), sistema cardiovascular, sistema nervioso, inmunología.

Resumen. En los últimos años el óxido nítrico (ON), una molécula sencilla pero altamente reactiva, ha sido el centro de una gran cantidad de investigaciones. Es sintetizado en los tejidos mamíferos a partir del aminoácido L-arginina por una reacción enzimática catalizada por la sintasa de óxido nítrico (SON), produciendo L-citrulina y ON. El ON tiene una media vida muy corta, es liposoluble, reacciona fácilmente con un gran número de sistemas enzimáticos, y es producido por una amplia variedad de células. La enzima SON existe en, al menos, tres formas: dos isoformas son calcio dependientes y están continuamente presentes en células específicas, llamadas SON constitutivas (cSON). De éstas, una isoforma está presente en el citosol de las células neuronales (nSON), mientras la otra isoforma está presente en forma de proteína ligada a las membranas en las células endoteliales (eSON). Las cSON producen pequeñas cantidades de ON, después de que ocurre una estimulación por agonistas específicos. El ON producido por las cSON frecuentemente media señales celulares y comunicación celular. Una tercera isoforma de SON es calcio-independiente, no está presente en células no estimuladas y produce grandes cantidades de ON siguiendo a la estimulación de células apropiadas con citoquinas o lipopolisacáridos. Esta isoforma es llamada SON inducible (iSON). El ON es un mediador tanto de procesos fisiológicos como patológicos. Actúa directamente en sus blancos celulares, de los cuales el más importante es la guanilatociclasa, y produce una gran variedad de efectos biológicos, que van desde citoprotección a citotoxicidad. Es motivo de la presente revisión un análisis de la bioquímica y fisiología del ON, así como de sus acciones biológicas y posibles implicaciones terapéuticas

Physiological and pathophysiological aspects of nitric oxide in mammalian tissues.

Invest Clin 1998; 39(2): 125 - 154.

Key words: Nitric oxide(NO), mammalian tissues, nitric oxide sintase (NOS), cardiovascular system, nervous system, immunology.

Abstract. In recent years, nitric oxide (NO), a single but highly reactive molecule has become known as the central point of many researchs. NO is synthesized by the enzyme nitric oxide synthase (NOS) in mammals from the amino-acid L-arginine. The products of L-arginine oxidation by NOS are L-citrulline and NO. Nitric oxide has a very short half life, is lipid soluble, reacts easily with several enzymatic systems, and is produced by a wide amount of cells. At least, three kinds of enzymes NOS have been described: two of them are calcium-dependent and continuously present in select cells (constitutive NOS, cNOS). One cNOS isoform is present in the cytosol of neuronal cells, while the other isoform is present in membrane-bound form, in endothelial cells. cNOS produces small quantities of NO, following stimulation by specific agonist. NO produced by cNOS frequently mediates cellular communications and cellular signaling. A third isoform is calcium-independent, is not present in unstimulated cells, and produces large quantities of NO following stimulation of the appropriate cell with cytokines or LPS (inducible NOS, iNOS). NO is a mediator of both physiological and pathological process. It acts directly on its targets, one of them, maybe the most important, is the soluble guanylate cyclase, and produces a variety of biological effects, ranged from cytoprotection to cytotoxicity. An analysis of the biochemistry and physiology of NO is the focus of this review, together with its biological actions and potential therapeutical implications.

Recibido: 12-9-97. Aceptado: 3-2-98.

INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico (ON) es un gas incoloro, relativamente estable, que es liposoluble y medianamente soluble en agua, y pertenece a una familia de compuestos, los óxidos de nitrógeno, que difieren marcadamente unos de otros en estructura y reactividad. El ON es capaz de formarse en el ambiente por la unión del oxí-

geno (O₂) y el nitrógeno (N₂) a altas temperaturas, como cuando ocurre un relámpago. Pero no fue sino hasta mediados de la década pasada cuando se estableció que el ON es una molécula que puede ser biológicamente sintetizada en los tejidos mamíferos. Desde hace algunos años, el ON se ha convertido en uno de los tópicos más estudiados en los campos de la biología y la química.

Antes de 1981 se pensó que la biosíntesis del óxido nítrico estaba restringida a las bacterias que participan en las reacciones de nitrificación o desnitrificación. Pero en 1987, la demostración de la formación de ON por una enzima en el endotelio vascular abrió una nueva área en la investigación biológica (1). El ON es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por una enzima, la sintasa de óxido nítrico (SON). En las primeras investigaciones resultaba claro que existían al menos dos tipos de esta enzima. Una constitutiva, citosólica, dependiente de calcio y calmodulina, y que libera óxido nítrico por cortos períodos en respuesta a un receptor o a estimulación física. La otra es inducida después de la activación de los macrófagos, células endoteliales, y otras células por citoquinas, y una vez expresada, sintetiza ON por largos períodos de tiempo. Esta enzima, además es independiente de calcio y su inducción es inhibida por glucocorticoides (1). Hoy en día se sabe que existen tres tipos de sintasas de óxido nítrico, las cuales serán estudiadas en detalle en otra sección de esta revisión.

Una vez sintetizado en los tejidos mamíferos, contrariamente al mecanismo de acción convencional de las moléculas que intervienen en la transmisión de bioseñales, quienes actúan ligándose a una molécula receptora específica, el ON manifiesta sus acciones biológicas a través de un amplio rango de acciones químicas. La familia de sintasas de óxido nítrico que intervienen en su

formación catalizan la oxidación de uno de los dos nitrógenos guanidínicos en el sustrato L-arginina para formar óxido nítrico (2). Este proceso involucra dos reacciones de monooxigenación sucesivas, con una reacción inicial que da como resultado el N^G-hidroxi-L-arginina, como intermediario (3), y una reacción final, que origina ON y citrulina (2) (Fig. 1).

Es bien conocida la reacción del ON en la fase gaseosa con el O₂, para dar dióxido de nitrógeno (NO₂). En los medios acuosos, el ON se disuelve de manera limitada, formando una solución saturada de una concentración aproximada de 2mM, a temperatura y presión estándar. Esta hidrofobicidad del ON resulta en una alta capacidad de permeabilidad en los sistemas biológicos, permitiendo su fácil difusión a las membranas celulares, y se ha podido detectar en vivo en la fase gaseosa del pulmón (4). Estudios de las acciones del ON en los sistemas biológicos, han sugerido que el ON es altamente inestable, con una media vida aparente de 6 a 60 segundos, reaccionando rápidamente con el O₂ y el anión superóxido (O₂⁻) (5), para formar peroxinitrito (ONOO⁻). Así, la formación de O₂⁻ en las células de los mamíferos, y la alta proporción de su reacción con el ON, convierte la formación del peroxinitrito en un posible producto del metabolismo del ON (6):

$$\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$$

El peroxinitrito puede dañar las células por oxidación de sus lípidos a tioles, por ejemplo. El ON también interactúa con el hierro en los cen-

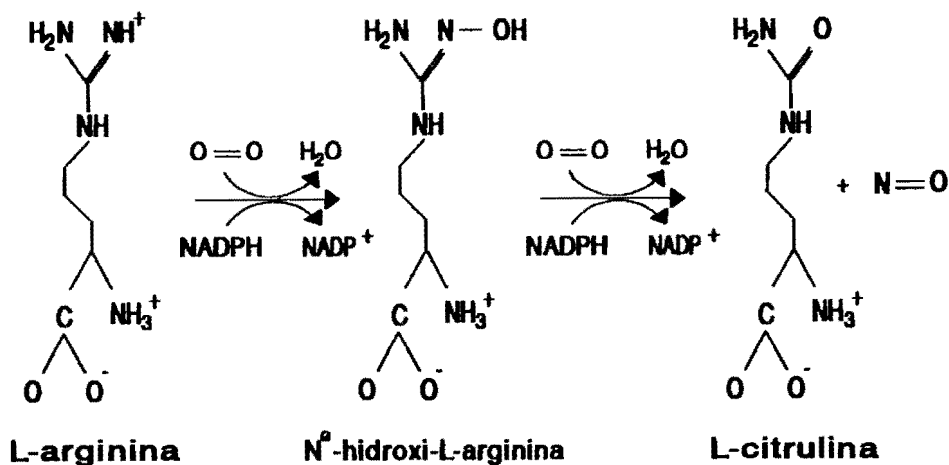


Fig. 1. La conversión de L-arginina en L-citrulina y ON catalizada por la sintasa de ON es una oxidación de cinco electrones de uno de los nitrógenos guanidinos de la L-arginina. El primer paso, una oxidación de dos electrones, es una hidroxilación que forma N^G-hidroxi-L-arginina como intermediario. El segundo paso, una oxidación de 3 electrones, involucra la remoción de un electrón, inserción de O₂ y escisión de un enlace carbono-nitrógeno para formar L-citrulina y el radical libre NO. El mismo donador de electrones, nicotinamin-adenin-dinucleótido-fosfato (NADPH), se requiere para ambos pasos. Los átomos de oxígeno que son incorporados en el óxido nítrico y la L-citrulina derivan de distintas moléculas de oxígeno, lo cual significa que la enzima liga y utiliza dos moléculas de oxígeno durante un recambio catalítico para generar óxido nítrico.

tros sulfuro-ferrosos de varias enzimas. Se ha sugerido que algunas acciones biológicas pueden ser mediadas a través de sus formas oxidadas o reducidas (7).

SINTASAS DE ÓXIDO NÍTRICO

Las células de los mamíferos están dotadas con al menos tres genes que encodan distintas isoformas de sintasas de óxido nítrico (SON), por lo cual la biosíntesis del ON parece producirse en la mayoría de es-

tas células. Los ADN de estas enzimas han sido clonados molecularmente, y se ha encontrado que comparten entre ellos un 50-60% de homología a nivel de nucleótidos y aminoácidos (8). Por el año de 1992, los investigadores describieron dos enzimas que están expresadas constitutivamente. Una está aparentemente restringida al endotelio, la sintasa de óxido nítrico endotelial (eSON ó SONI), y la otra se encuentra en neuronas del Sistema Nervioso Central y Periférico y en

otros tipos celulares, como células β de los islotes pancreáticos(9), músculo liso (10) y células epiteliales del pulmón (11), estómago y útero (12), la sintasa de óxido nítrico neuronal (nSON ó SONIII). Otra clase de sintasa de ON es expresada en muchos tipos celulares después de ser estimuladas con agentes inmunológicos o inflamatorios. Esta no es expresada constitutivamente, sino es inducible, es la sintasa de óxido nítrico inducible (iSON ó SONII) (8). Así, la nueva proteína iSON es sintetizada en la célula siguiendo un periodo de inducción de 2 a 6 horas, durante el cual el gen es transcrito y el ARN mensajero, sintetizado (13). Ejemplos de células que contienen iSON incluyen células musculares lisas, células endoteliales, hepatocitos, macrófagos y células de Kupffer (2,14). Aunque todas las isoformas de SON necesitan ligar calmodulina para su actividad, solo la iSON tiene una alta afinidad por la calmodulina, permaneciendo ligada a ésta a niveles tan bajos de calcio como los encontrados en células en reposo, confiriéndole a la iSON una actividad catalítica completa independiente de la elevación del calcio y de calmodulina exógena (15,16). Así, se piensa que tanto la eSON como la nSON producen pequeñas y fisiológicas descargas de ON en respuesta a elevaciones transitorias de calcio intracelular, que permiten mantener la calmodulina unida a ellas, liberando ON durante sólo algunos minutos (17), mientras que la iSON produce un cuantioso y continuo flujo de ON, siendo su única limi-

tante la ausencia de sustrato. Por consiguiente, se cree que la iNOS -enzima calcio-independiente- más que las cSON -enzimas constitutivas- es la isoforma que produce las grandes cantidades de NO que puede resultar en daño del tejido, o muerte. Sin embargo, en algunas circunstancias, como por ejemplo durante la isquemia tisular, una elevación sostenida en el calcio intracelular puede ocasionar que las cSON produzcan cantidades citotóxicas de ON (18,19). La mayor diferencia entre la actividad de las cSON y la iSON no reside en la concentración del ON generado por la enzima, sino en la duración de la producción del ON (20).

Todas las isoformas de las sintasas de óxido nítrico contienen cuatro grupos prostéticos : Flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín adenín mononucleótido (FMN), protoporfirina-férrica IX (hemo) y tetrahidrobiopterina (BH₄). Los grupos flavín son usados para enviar los electrones del donador de electrones NADPH al grupo hemo en la catálisis de la SON (21-23), la función de la BH₄, un cofactor activo redox para hidrolasas de aminoácidos aromáticos (24), aún no ha sido esclarecida. Cuando la calmodulina se une a la SON, produce una rápida abertura del canal para el flujo de electrones a través del sitio activo de la NOS. Los electrones atraviesan de la flavina reducida al grupo hemo, iniciando de esta manera la síntesis de ON (25). En presencia de calmodulina, cuando están limitados, o bien la L-arginina o la BH₄, la SON

utiliza dioxígeno como aceptor final de electrones (26,27) y consume NADPH a una velocidad desacoplada de la síntesis de ON. El resultado es la formación de anión superóxido, el cual a su vez puede reaccionar con el ON para formar otros óxidos de nitrógeno (28,29) que son extremadamente reactivos y potencialmente citotóxicos.

Se han descrito una serie de inhibidores de la síntesis de óxido nítrico, los cuales han sido de gran utilidad en los estudios realizados para determinar las implicaciones fisiológicas y fisiopatológicas de este compuesto. Entre ellos tenemos los inhibidores competitivos de la SON, como la L-N^G-metil-monoarginina (L-NMMA), L-N^G-arginina (L-NA) y su metil éster (L-NAME), L-N^G-amino-L-arginina (L-NAA) (14), los cua-

les son análogos de la L-arginina y actúan por competencia con el sustrato por la enzima (Fig.2). Por otra parte, los glucocorticoides, dexametasona, hidrocortisona y cortisol inhiben la inducción, pero no la actividad de la iNOS, después de la estimulación de las células con lipopolisacáridos (LPS) ó con citoquinas (14).

BLANCOS BIOLÓGICOS DEL ÓXIDO NÍTRICO

Antes de entrar a discutir cuáles son los blancos potencialmente biológicos del ON en la célula, debe ser discutido un asunto aún no resuelto. Mientras la enzima neuronal (nSON) es una proteína ligada a la membrana, la enzima endotelial (eSON) y la inducible (iSON) están

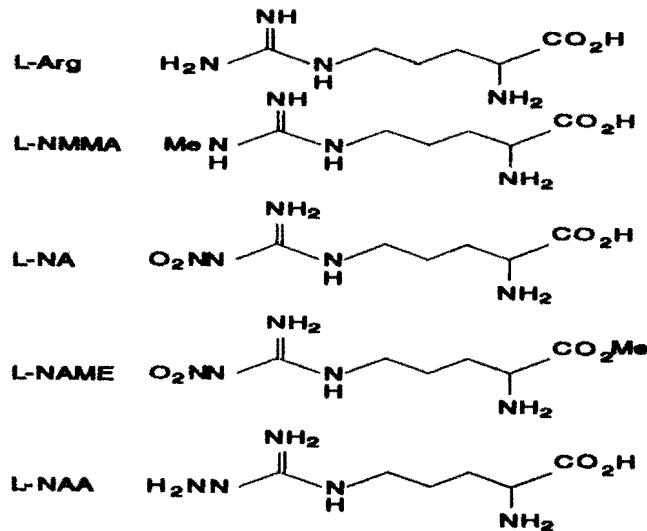


Fig. 2. Fórmula estructural de la L-arginina y sus análogos que inhiben la síntesis de óxido nítrico.

localizadas en el citosol. Así, ¿cómo escapa el ON producido por estas dos últimas isoformas del citosol de su célula productora, la cual contiene estos mismos blancos intracelulares sin causar efecto en ella misma?. Se han propuesto algunos transportadores intracelulares para el NO, pero aún no han sido probados (30) (Tabla 1). Una vez sintetizado el ON, es capaz de actuar sobre sus blancos intracelulares, que son :

Hemoproteínas

A bajas concentraciones, el ON reacciona con el hierro de las hemoproteínas para provocar muchas de sus acciones biológicas. En los casos de la guanilatociclasa (31,32) y la ciclooxigenasa (29), la interacción con el ON activa la enzima. Por otra parte, se ha observado que el ON inhibe una gran cantidad de otras hemoproteínas involucradas en la síntesis de mediadores bioactivos o eventos de señales celulares redox, tales como : citocromo P450 (33), lipoxigenasa (34), catalasa y peroxidasa. La hemoglobina en los eritrocitos y la mioglobina en el músculo esquelético y cardíaco parecen ser blancos biológicos que secuestran ON, pero el grupo hemo de la forma soluble de la guanilatociclasa es claramente uno de los más sensibles

e importantes sitios de acción del ON, basado en el papel bien establecido del GMP cíclico en muchas respuestas mediadas por el ON (35).

Proteínas que contienen tioles

Algunas proteínas esenciales que contienen tioles indispensables para su función, deben ser consideradas como blancos para la acción del ON, y podrían contribuir a la citotoxicidad mediada por ON. Dentro de este grupo se incluyen proteínas que intervienen en las señales de transducción, como lo son : receptores (36,37), proteína G (38), protein cinasas (9,39), protein fosfatasas (40), factores que activan transcripción (9,40-42) y proteasas (43). El mecanismo de acción del ON en este caso parece ser vía Adenosín difosfato ribosa cíclico (ADPRc), a través de ribosilación del ADP por proteínas específicas (44).

Uno de los mejores candidatos para la regulación de proteínas que funcionan como receptor, a través de formación de nitrosotiol, es el receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA) (37). Un exceso en la estimulación de este receptor por NMDA ocasiona neurotoxicidad, disparada por producción simultánea de ON y O_2^- , el cual forma especies reactivas de $ONOO^-$ (45) y OH^* asociado (46).

TABLA I

FORMAS PROBABLES DE TRANSPORTE INTRACELULAR DE ÓXIDO NÍTRICO

Dinitrosyl - iron (II) complex (DNIC's)
 NG-hydroxy-L-arginine -NO adduct
 Glutathione - NO complex

MECANISMO DE ACCIÓN

Aunque el óxido nítrico una vez en la célula actúa sobre los diferentes blancos biológicos descritos con anterioridad, un mecanismo general de acción, que involucra calcio intracelular ha sido propuesto como el clásico mecanismo de acción del óxido nítrico (47,48). Según éste, el ON interactúa con la guanilatociclasa, activándola y aumentando los niveles de GMP cíclico, el cual a su vez fosforila una enzima, la ADP ribosil ciclasa, responsable de la formación de un metabolito derivado del Nicotín adenín dinucleótido (NAD), el cual es llamado ADP Ribosa cíclico (ADPRc). Este es capaz de abrir los canales para el calcio de los compartimientos intracelulares, incrementando así la concentración de calcio intracelular. Por otra parte, existe otra vía mediante la cual el ON activa la ADP ribosil hidrolasa, encargada de degradar el ADPRc, disminuyendo los niveles de este metabolito, cerrando de esta forma los canales para el calcio en los compartimientos intracelulares. El continuo flujo de calcio hacia el retículo endoplasmático por la ATPasa de calcio, contribuye a disminuir notablemente los niveles de calcio intracelular (Fig.3). Hasta la fecha no se sabe cual o cuales son los otros elementos involucrados en esta última vía (47).

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el ON es capaz de modular los niveles de calcio intracelular, tanto incrementando o disminuyéndolo. Aún no se conoce cual es el

mecanismo que regula esta dualidad de efecto del ON..

EFFECTOS BIOLÓGICOS

La existencia de inhibidores competitivos de la síntesis de óxido nítrico ha sido una herramienta importante para investigar y conocer la relevancia del ON en los procesos biológicos. El sistema donde fue estudiado en principio el efecto del ON es el sistema cardiovascular, donde el ON actúa como un vasodilatador fisiológico que contribuye a mantener el tono vascular, lo cual es esencial para regular el flujo sanguíneo y la presión (49). El flujo sanguíneo y la presión arterial son determinados por una integración de mecanismos de control vascular, humoral y reflejo. Robert Furchgott, en 1980 fue pionero al reportar que el endotelio libera una sustancia vasodilatadora en respuesta a la acetilcolina, cuyas acciones son imitadas por compuestos tales como nitroglicerina y nitroprusiato de sodio. Estos compuestos, cuya eficiencia clínica ha sido reconocida por largo tiempo, actúan después de su conversión en óxido nítrico (50) (Fig.4). Según un reciente estudio fue comprobado que el nitroprusiato de sodio, 3-morfolinossilnomina y 3-nitroso-N-acetilpenicilamina son drogas vasodilatadoras que actúan vía formación de ON. Sin embargo, el mecanismo de acción del gliceriltrinitrato puede involucrar la formación de algún nitrosiol más que ON propiamente dicho (10).

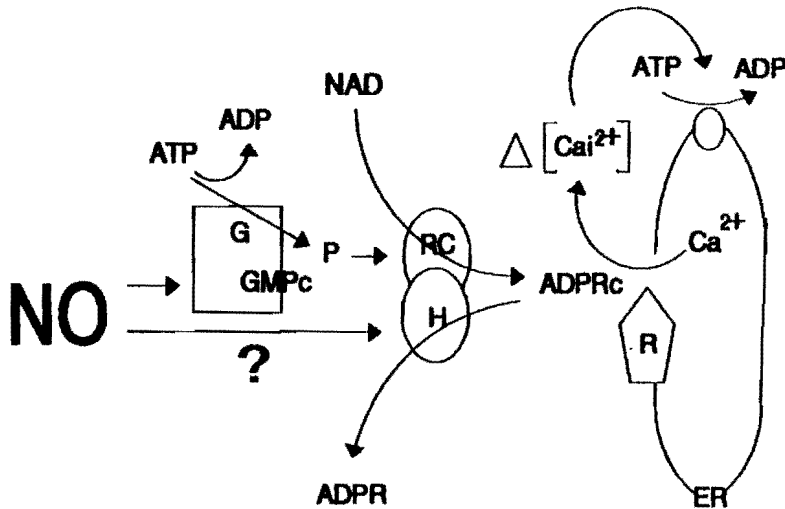


Fig. 3. Vías clásicas de acción del ON en las células de los mamíferos. El ON activa la guanilato ciclasa (GC), aumentando los niveles de GMPc, quien fosforila la enzima ADP ribosil ciclasa (RC), para formar ADP ribosa cíclico (ADPRc) a partir de NAD. Este metabolito abre los canales para el Calcio (Ca) en el retículo endoplasmático (RE), incrementando de esta manera los niveles de calcio intracelular. Por otra vía aún no muy bien conocida, el ON es capaz de activar la ADP ribosil hidrolasa (H), quien se encarga de degradar el ADPRc, con la consecuente disminución de los niveles de calcio intracelular, por un continuo efecto de la ATPasa de calcio en el RE.

Se conoce también que el ON inhibe la agregación plaquetaria, al parecer por un mecanismo que involucra AMP cíclico (13), al igual que la adhesión plaquetaria. Como las plaquetas son capaces de producir ON, éste actúa como un mecanismo de retroalimentación negativo para inhibir la activación plaquetaria (13,51). Los cambios en la actividad de esta vía en las plaquetas puede tener una significancia fisiológica, fisiopatológica y terapéutica.

En pacientes con arteriosclerosis (52), hipercolesterolemia familiar y fumadores (53), la vasodilatación

inducida por acetilcolina se encuentra alterada. La administración de L-arginina normalizó esta disfunción vascular en animales y pacientes con hipercolesterolemia (54-56). La relajación dependiente del endotelio también está disminuida en pacientes con hipertensión esencial (57). El tratamiento con inhibidores de la síntesis del ON indujo una respuesta hipertensiva en animales (58). Por otro lado, el tratamiento con arginina previno el desarrollo de hipertensión en animales propensos a padecer esta enfermedad (59), y también causó una reducción rápida de las

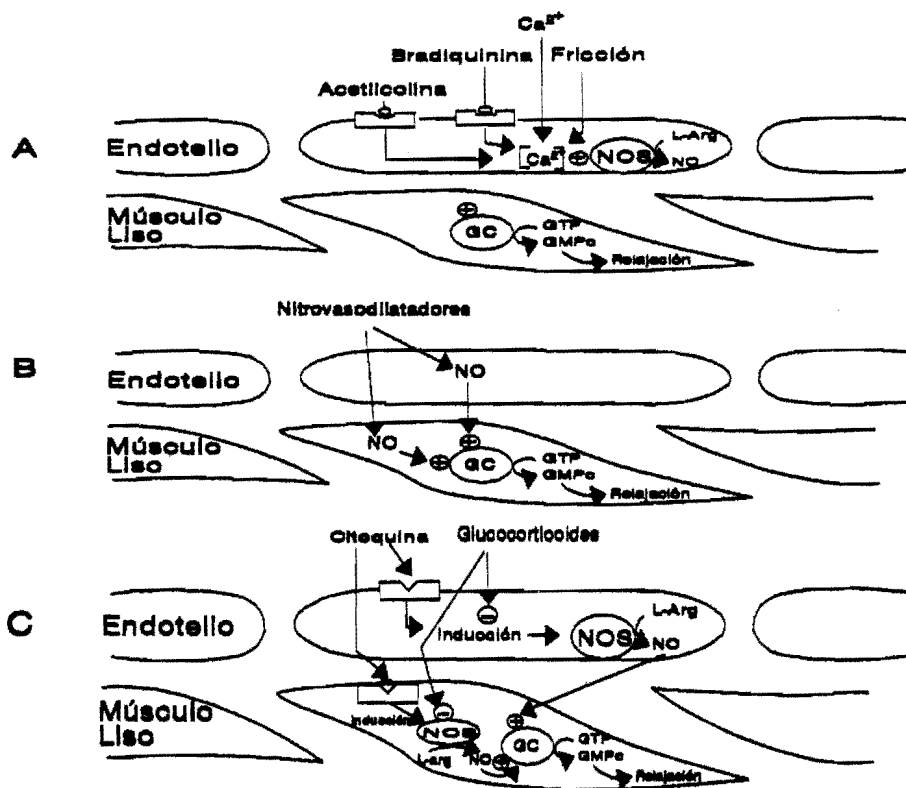


Fig. 4. A) La fricción o la activación de receptores del endotelio vascular por bradiquinina o acetilcolina provoca un influjo de calcio. El consecuente incremento en el calcio intracelular estimula la SON constitutiva. El ON formado a partir de la L-arginina por esta enzima, difunde a las células musculares lisas vecinas, en las cuales estimula a la guanilatociclase (GC), lo cual resulta en un aumento de la síntesis de GMP cíclico (GMPc) a partir del guanosintrifosfato (GTP). Este aumento del GMPc en la célula muscular lisa conduce a su relajación. B) Los nitrovasodilatadores, tales como nitroprusiato de sodio y nitroglicerina, liberan óxido nítrico, bien sea espontáneamente, o a través de una reacción enzimática. El ON liberado estimula la GC en la célula muscular lisa vascular, resultando en relajación. C) La interacción de citoquinas con sus receptores tanto en células endoteliales como en células musculares lisas, resulta en la inducción de la sintasa de NO calcio-independiente. Esta inducción puede ser inhibida por glucocorticoides. Una vez inducida, La iSON produce ON continuamente, resultando en una activación sostenida de la guanilatociclase y conlleva a una relajación prolongada del músculo liso, respuesta reducida a los vasoconstrictores y posible daño tisular.

presiones sistólica y diastólica, cuando se administró a sujetos saludables y a pacientes con hipertensión esencial (60,61). Igualmente, son conocidos los efectos beneficiosos del ejercicio sobre el sistema cardiovascular, y se ha mostrado que en animales el ejercicio es capaz de incrementar la producción de ON y la expresión del gen que codifica la enzima endotelial que lo sintetiza (eSON) (62), contribuyendo así con los beneficios que produce el ejercicio sobre el sistema cardiovascular. En los últimos años, con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, como ADN recombinante, se ha tratado de aprovechar el hecho de que la expresión del gen de la eSON aumenta la producción de ON en la pared del vaso sanguíneo, lográndose una primera transferencia exitosa y funcional del gen recombinante de la eSON en las arterias cerebrales de perro (63), lo cual abre una puerta a un nuevo campo en la terapia de las enfermedades vasculares. El ON también interviene en los procesos de angiogénesis y curación de heridas en el endotelio, teniendo un papel permisivo en la migración de las células endoteliales, interactuando de esta manera con los mediadores angiogénicos, como las endotelinas (64). Igualmente, se ha establecido la relación entre el ON y las moléculas de adhesión, ya que la inhibición de la síntesis de ON incrementó la expresión del P-selectina, un miembro de la familia de glicoproteínas de adhesión que media la interacción de plaquetas y células endoteliales vasculares con

neutrófilos y monocitos., aumentando así el empaquetamiento de los leucocitos y la adherencia en las vénulas postcapilares de rata (65).

El óxido nítrico puede ser útil en pacientes con algunas condiciones pulmonares, ya que inhalado puede revertir la hipertensión pulmonar (12). Además, bajas concentraciones de ON inhalado (18 a 36 ppm) protegen contra el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (66), y esto último parece estar en relación con el efecto del ON de inhibir la adhesión y la agregación plaquetaria (67). Resulta interesante saber que el NO endógeno se forma en los bronquiolos terminales (4).

Se ha mostrado que el ON interviene en los cambios fisiológicos observados durante el embarazo. Las tres isoenzimas del óxido nítrico (tanto constitutivas como inducible) han sido encontradas en las vellosidades, observándose la mayor actividad en el primer trimestre del embarazo, decreciendo hasta hacerse bajas al final del mismo (68). En embarazos de pacientes con preeclampsia, y en pacientes gestantes con crecimiento retardado del producto, se aprecia una alteración en el metabolismo del ON en la placenta. En las mujeres fumadoras ocurre lo mismo, sugiriendo ésto que el metabolismo del ON podría estar ligado a estos problemas (69). Durante la gestación normal, aumenta la influencia vasodilatadora del endotelio como mecanismo compensatorio para los cambios hemodinámicos que ocurren en este estado, y se

piensa que el mediador de esta adaptación es el ON (68,70,71). Con respecto al papel del ON en la fisiología de la preeclampsia, hay suficiente evidencia que indica que existe una alteración en el metabolismo del ON en las pacientes con hipertensión inducida por el embarazo (72,73), al igual que hay alteración en la expresión de la enzima endotelial (eSON) en la vasculatura fetoplacentaria en esta entidad patológica (74). Pero aún existe controversia sobre este punto, por lo cual hace falta un mayor número de investigaciones al respecto.

El ON contribuye marcadamente a la regulación de la hemodinámica renal (75,76), y juega un importante papel en la esteroidogénesis de la corteza adrenal, ya que regula el flujo sanguíneo de esta glándula (77).

En el tejido óseo el papel del ON y las enzimas que lo forman ha sido sujeto de investigaciones, encontrándose que éste es capaz de regular la función de los osteoclastos. El ON es un potente inhibidor de la resorción ósea, siendo un regulador autocrino complejo en la actividad resorptiva de los osteoclastos (78). Es posible que el ON también participe en la modulación de la formación ósea mediada por los osteoblastos (78).

En el páncreas, el ON interviene en la regulación neural de la secreción pancreática, siendo esencial para la actividad secretora pancreática inducida por el nervio vago y para el mantener el tono vascular basal de esta glándula (79). El ON re-

gula la secreción de amilasas y la secreción de insulina (80), y está implicado en la fisiopatología de la diabetes mellitus insulino-dependiente (81,82). De hecho, se ha sugerido que el retardo en la curación de las heridas del diabético se debe a la disminución en la síntesis de ON en el lugar de la herida, aunque el mecanismo exacto por el cual el ON sintetizado en la herida regula la acumulación de colágeno en la misma permanece sin determinarse (83).

En el esófago el ON al parecer es un mediador responsable de su relajación (84). En el estómago, el ON participa de manera importante en la regulación del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (85), así como también en la secreción alcalina de esta mucosa (86,87) y de la mucosa duodenal (88), siendo ambas incrementadas, en respuesta a los inhibidores de la síntesis del ON. Con respecto a la secreción de ácido, el panorama es menos claro. Según algunos autores, el ON aumenta la secreción ácida gástrica, efecto mediado, al menos en parte por los cambios en la liberación de gastrina y en el flujo sanguíneo gástrico (89-91). Pero, según otras investigaciones, la secreción ácida es reducida significativamente por el ON en estómagos normales (92) y en mucosa gástrica sometida a stress (93). Igualmente, al abolición de la respuesta ácida secretora observada después de la administración de endotoxinas parece ser mediada por el ON (8, 94). Hacen falta más estudios para de-

terminar cuál es el papel del ON en la secreción ácida gástrica.

Igualmente produce un efecto neto proabsortivo sobre el transporte de iones en el intestino (95), así como también sobre el transporte de fluido intestinal (96). Protege al intestino de la inflamación e injuria producidas por la hipoxia (97), lo cual es de gran importancia en la fisiopatología de la enterocolitis necrotizante.

La producción de ON parece ser la responsable de la vasodilatación arterial y la circulación hiperdinámica que se observa en los pacientes con cirrosis hepática, caracterizada por una resistencia vascular esplácica y sistémica disminuidas, lo cual ocasiona algún grado de hipotensión sistémica y aumento en el gasto cardíaco, con la subsecuente activación de los mecanismos renales que retienen sodio, culminando en la formación de ascitis (6,98). Debido a que existe un aumento en las endotoxinas circulantes en el cirrótico, se creyó que la enzima responsable de la sobreproducción del ON era la inducible (iSON), pero actualmente se sabe que este aumento en la formación de ON producto de la enzima endotelial. Aún se desconoce por qué mecanismo la actividad de la eSON está aumentada y mantiene el estado vasodilatado en la cirrosis (99,100).

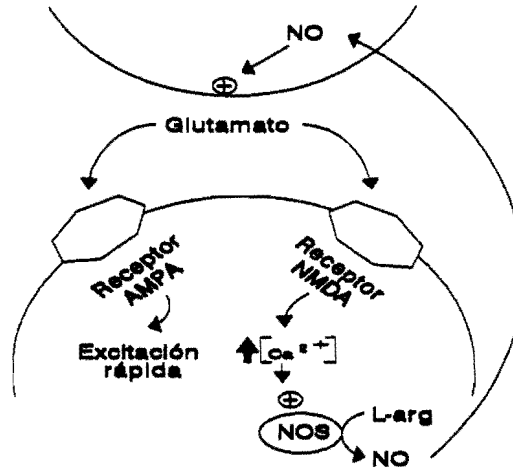
Con respecto al sistema nervioso, se sabe desde hace tiempo que la neurotransmisión mediada por agentes tales como acetilcolina, glutamato y glicina está asociada con niveles elevados de GMP cíclico

(GMPc) en el cerebro, y particularmente en el cerebelo (101). El ON estimula la guanilatoclasa para formar GMPc. El hallazgo de que las células cerebrales de rata, estimuladas con N-metil-D-aspartato (NMDA), un agonista para un tipo específico de receptor de glutamato, liberó un material parecido al factor relajante derivado del endotelio (102), junto con la identificación de una sintasa constitutiva de ON en el tejido cerebral de rata (90), estableció la existencia de la vía L-arginina-óxido nítrico en el Sistema Nervioso Central. La sintasa neuronal de óxido nítrico (nSON) ha sido detectada en diferentes cantidades en todas las áreas del cerebro humano (103). El ON estimuló la liberación de catecolaminas de trozos de hipocampo y estriatum (104,105), así como también inhibió la recaptación de dopamina (106).

El ON juega un importante papel en un gran número de funciones neuronales, incluyendo aprendizaje y memoria. El ON es liberado de una fuente postsináptica para actuar presinápticamente sobre una o más neuronas. Esto conduce a un aumento posterior en la liberación de glutamato y, como resultado, a un incremento estable en la transmisión sináptica, un fenómeno conocido como potenciación a largo término, lo cual se piensa está asociado a la formación de la memoria (107) (Fig.5). El ON también puede tener implicaciones fisiológicas en la visión, nocicepción y olfato (108-110).

La mayoría de los datos sugieren que el ON ejerce su efecto en el

TERMINAL DE NEURONA PRESINAPTICA



TERMINAL DE NEURONA POSTSINAPTICA

Fig. 5. El glutamato liberado del terminal nervioso presináptico activa diferentes tipos de receptores en las dendritas de la neurona postsináptica. Bajo condiciones normales, el receptor del alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propanoato (AMPA) media la mayoría de los efectos del glutamato. Sin embargo, durante la transmisión sináptica de alta frecuencia, la activación del receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA) resulta en un aumento en el calcio intracelular, el cual estimula la sintasa constitutiva de óxido nítrico (SON). El ON que es producido difunde de regreso a la neurona presináptica, donde aumenta la liberación de glutamato. La liberación incrementada de glutamato conduce a una mayor activación de los receptores postsinápticos de glutamato, aumentando así la efectividad de la sinapsis.

Sistema Nervioso por elevación de los niveles de GMPc, a través de la activación de la guanilatociclasa (111-113). En un estudio reciente con staurosporina y calphostin C, inhibidores de la Proteín cinasa C (PKC), y Forbol 12-miristato 13 acetato (PMA), un activador de PCC, se estableció que la liberación de ON en neuronas en reposo es regulada por la PCC, modulando la sensibili-

dad de la SON a bajas concentraciones de calcio (114).

El mecanismo por el cual el ON y el GMPc modulan las funciones neuronales aún no es conocido. Pero unos estudios recientes muestran que la fosforilación de proteínas mediada por la Proteín kinasa dependiente de GMPc (PCG) juega un papel central, y se piensa que luego de esta fosforilación, los substratos

proteicos ejercen sus acciones (71). El cerebro contiene una gran diversidad de substratos específicos para PCG cuya identidad aún se desconoce. Su futura identificación proveerá nuevos avances que permitirán un mejor entendimiento en el papel de las señales mediadas por la vía ON-GMPc-PCG en las funciones cerebrales.

La vía L-arginina-ON puede también jugar un importante papel en la patología del Sistema Nervioso Central. El influjo de calcio que acompaña a la activación prolongada del receptor del NMDA está asociado con degeneración de las neuronas (115). Altos niveles de GMPc pueden ocasionar también destrucción de las células fotorreceptoras de la retina (116). La liberación excesiva de aminoácidos excitatorios está asociada con convulsiones y neurotoxicidad, y la consecuente producción de ON podría estar asociada con la isquemia cerebral. Existe sustancial evidencia que muestra que los inhibidores de la síntesis de ON mitigan la isquemia cerebral y el edema cerebral ocasionado por la misma, así como el subsecuente infarto cerebral (117-119). También ha sido detectado un aumento de la expresión de las formas constitutivas de la SON en tumores cerebrales (astrocitomas), encontrándose los más altos niveles de expresión en los grados mayores de malignidad (120). Esto sugiere que la producción de ON puede estar asociada con los procesos fisiopatológicos importantes que acompañan a estos tumores.

El ON se encuentra también en nervios periféricos donde puede contribuir a la transmisión nerviosa, y se piensa que es un modulador en los nervios no adrenérgicos-no colinérgicos (NANC) (50). En el tracto gastrointestinal, parece mediar la relajación, incluyendo la dilatación del estómago (50). En el colon, la nSON está presente en los plexos mientéricos y submucosos (103). En estudios histoquímicos de pacientes con estenosis pilórica hipertrófica y con acalasia se observó una pérdida de la nSON en el tejido pilórico y gastroesofágico (121,122). La vía L-arginina-ON es responsable de la relajación de los cuerpos cavernosos y del desarrollo de la erección del pene en humanos (123). También contribuye a la relajación NANC del músculo traqueal (50,124). Así, hay un amplio sistema de nervios que utilizan el ON como neurotransmisor, y su disfunción puede conducir a una variedad de desórdenes, incluyendo impotencia masculina.

En relación a los efectos inmunológicos mediados por ON, la vía L-arginina-ON ha sido propuesta como un mecanismo de defensa primario contra los microorganismos intracelulares y contra patógenos tales como hongos y helmintos que son demasiado grandes para ser fagocitados (11). Hay evidencia que sugiere que la inmunidad no específica está asociada con la inducción de la iSON, e involucra no sólo al sistema retículo endotelial, sino también a células tales como hepatocitos (125), musculares lisas vasculares (126) y endotelio vascular

(127), en donde se ha detectado la enzima inducible.

Las citoquinas, como el factor de necrosis tumoral (FNT), los LPS de bacterias y, según recientes reportes, los micoplasmas (128), son capaces de inducir la síntesis de ON, actuando éste como un potente mediador de mecanismos de defensa antimicrobiano. Se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de ON mediada por citoquinas está asociada con disminución de los depósitos intracelulares de glutatión, el tiol no proteico intracelular primario responsable de la detoxificación de radicales libres (129), estableciéndose un papel protector para el ON en los estados de stress oxidativo. En ratones transgénicos, con falta de expresión de la iSON, se estableció el papel del gen de esta enzima en el desarrollo de la tuberculosis, ya que estos animales se comportaron como aquellos inmunosuprimidos con altas dosis de glucocorticoides, identificándose el gen para la iSON como un locus crítico para la tuberculostasis (130). Pero en la misma forma, el ON puede jugar un papel importante en el daño tisular, ya que puede ser citostático o citotóxico no solo para microorganismos invasores, sino también para las células vecinas a las que lo producen (58).

Se han encontrado niveles elevados de la concentración de nitritos en plasma y en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea y osteoartritis, con datos que sugieren que el aumento en la producción de ON en estos casos se comporta

como un mediador inflamatorio en enfermedad reumática (131,132). Luego de la identificación de la iSON en condrocitos humanos, se ha sugerido que el ON derivado de ésta (produciendo exposición prolongada de los condrocitos a elevados niveles de ON), puede actuar como un regulador de la actividad de los condrocitos inducida por citoquinas, lo cual conduce a una excesiva degradación de la matriz cartilaginosa en varios desórdenes patológicos (78).

Existe evidencia significativa que implica al ON como una molécula mediadora de la enfermedad inflamatoria intestinal (133). La síntesis colónica de ON está aumentada en pacientes con colitis ulcerativa (134). La producción de ON también está incrementada en glomerulonefritis, donde la mayor expresión de la enzima inducible se corresponde con el mayor influjo de macrófagos en el glomérulo y la inducción de la misma enzima está muy relacionada con la formación inicial de complejos inmunes (135).

En el SNC, el ON parece mediar los efectos inflamatorios que siguen a varios desórdenes neurológicos e injuria (136). Se ha demostrado el papel del ON y de la iSON en la esclerosis múltiple, sugiriéndose además que la expresión de la enzima en los monocitos, asociado con la diferenciación de estas células, interviene en la iniciación, progresión y cronicidad de la esclerosis múltiple (137).

En el hígado, la inducción de la iSON por endotoxinas bacterianas produjo una disminución en la pro-

ducción de glucosa (138). Evidencias recientes sugieren que el ON puede jugar un importante papel en las interacciones entre las células de Kupffer y los hepatocitos, y por lo tanto, ser un importante regulador de la función hepática (14). En general, parece que durante condiciones sépticas, la iSON es expresada en el hígado para preservar la función hepatocelular y proteger al hígado de la injuria inmunomediada. Bajo condiciones más crónicas de la expresión de la iSON, es posible que el ON pueda ejercer efectos más dañinos (139). La sobreproducción de ON se ha implicado como la base del shock circulatorio séptico inducido por citoquinas (140). La excesiva síntesis de ON contribuye a la profunda vasodilatación e hipotensión causadas por los LPS de bacterias (141) y FNF (142). Pero en el mismo orden de ideas, aunque los inhibidores de ON claramente restauran el tono vascular en la sepsis y el shock provocado por las endotoxinas y las citoquinas, no se ha mostrado que mejore la mortalidad. De hecho, en algunos estudios, la administración de inhibidores de la síntesis de ON resultó en un aumento en la mortalidad (143). Así, la inhibición de la síntesis de ON parece tener tanto efectos beneficiosos como perjudiciales en modelos animales (144). En un estudio reciente se reportó que la inhibición de la síntesis de ON provocó trombosis microvascular glomerular en ratas, que fue prevenida por administración concomitante de donadores exógenos de ON

(145), los cuales provocan el efecto antitrombogénico del ON endógeno.

El óxido nítrico parece tener, por lo tanto, un papel multifacético en las reacciones inflamatorias, que va desde la citoprotección y efecto antitrombogénico hasta el aumento en la vasodilatación, la formación del edema y la citotoxicidad del tejido (30). Y, aunque nuestro conocimiento acerca de los efectos tóxicos del ON está aumentando continuamente, estamos aún en el comienzo de la comprensión del cómo, por qué y cuándo las células son dañadas por el óxido nítrico.

CONCLUSION

El ON difiere de todas las otras moléculas de señales celulares en los mamíferos, seleccionada evolutivamente como tal por su difusibilidad y reactividad más que por su estructura. Los pequeños e intermitentes pulsos de ON sintetizados por las formas constitutivas de la SON (eSON y nSON) median principalmente procesos fisiológicos básicos como vasodilatación y neurotransmisión (comunicación célula-célula y señales celulares). Por otro lado, las cantidades grandes y sostenidas de ON producido por la forma inducible de la SON (iSON) puede exhibir acciones citoprotectoras o citotóxicas dependiendo del sitio y las condiciones de la producción.

¿Cómo se puede enfocar el potencial destructivo del ON sobre los microorganismos, mientras se minimiza el riesgo de los tejidos sanos? ¿Qué mecanismo de seguridad y

reacciones químicas deben dispararse para desarmar al ON cuando los niveles se transforman en peligrosos?. Las respuestas a estas y otras interrogantes claves serán conocidas cuando llegemos a un mejor entendimiento de la bioquímica del ON y a una apreciación más completa de los mecanismos que gobiernan la síntesis de esta molécula por las células.

AGRADECIMIENTO

La autora desea agradecer la colaboración de Maria Isabel Molero en la transcripción del presente trabajo, y el Arq. Ramón Reyes en la elaboración de las figuras. Trabajo parcialmente financiado por el CONDES de LUZ.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. 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.
2. STUEHR D.J., GRIFFITH O.W.: Mammalian nitric oxide synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1992; 65:287-346.
3. STUEHR D.J., KWON N.S., NATHAN C.F., GRIFFITH O.W., FELDMAN P.L., WISEMAN J.: N^W-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 1991; 266:6259-63.
4. PERSON M.G., WIKLUND N.P., GUSTAFSSON L.E.: Endogenous nitric oxide in single exhalations and the change during exercise. *Am Rev Respir Dis* 1993. 148:12210-12214.
5. FURCHGOTT R.F., KHAN M.T., JOTHIANANDAN K.D.: Comparison of properties of nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor : some cautionary findings. In *Endothelium-derived relaxing factors*, ed by GM Rubanyi, PM Vanhoutte, 1990. pp 8-21.
6. BIRD G., SEVERN A., DANESH B.J., LIEW F.Y.: Nitric oxide in alcohol induced liver failure. *J Hepatol* 19(2):316-317.
7. STAMLER J.S., SINGEL D.J., LOSCALZO J.: Biochemistry of nitric oxide and its redox-active forms. *Science* 1992; .258:1898-1902.
8. MARTINEZ-CUESTA M.A., BARRANCHINA M.D., PIQUE J.M., WITTLE B.J.R., ESPLUGUES J.V.: The role of nitric oxide and platelet-activating factor in the inhibition by endotoxin of pentagastrin-stimulated gastric acid secretion. *Eur J Pharmacol* 1992; 218:351-354.
9. PENDINO K.J., LASKIN J.D., SHULER R.L., PUNJABI C.J., LASKIN D.L.: Enhanced production of nitric oxide by rat alveolar macrophages after inhalation of a pulmonary irritant is associated with increased expression of nitric oxide synthase. *J Immunol* 1993. 151:7196-7205.

10. MARKS G., McLAUGHLIN B.E., JIMMO S.L., POKLEWSKA-KOZIELL M., BRIEN J.F., NAKATSU K.: Time-dependent increase in nitric oxide formation concurrent with vasodilation induced by sodium nitroprusside, 3-morpholinopyridone, and S-nitroso-N-acetylpenicillamine but not by glyceryltrinitrate. *Drug Metab Disp* 1995; 23 (11) :1248-1251.
11. HIBBS J.B. Jr, TAINTOR R.R., VAURIN 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, ed by S Moncada and EA Higgs. Elsevier, Amsterdam. 1990. Pp 189-223.
12. PEPKE-ZABA J., HIGENBOTTAN 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.
13. RADOMSKI M.W., PALMER R.M.J., MONCADA S.: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87:5193-5197.
14. MONCADA S., PALMER R.M.J., HIGGS E.A.: Nitric oxide : Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142
15. CHEN P.Y, SANDERS P.W.: L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J Clin Invest* 1991; 88:1559-1567.
16. XIE Q.W., CHO H.J., CALAYCAY J., MUMFORD R.A., SWIDEREK K.M., LEE T.D., NATHAN C.: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256:225-228.
17. MALINSKI T., TAHA Z.: Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 1992; 358 :676-678.
18. MATHEIS G., SHERMAN M.P., BUCKBERG G.D., HAYBRON D.M., YOUNG H.H., IGNARRO L.J.: Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am J Physiol* 1992; 262 :H616-620.
19. PATEL V.C., YELLON D.M., SINGH K.J., NEILD G.H., WOOLFSON R.G.: Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the in situ rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194:234-238.
20. LAURENT M., LEPOIVRE M., TENU J.P.: Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells

- expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 1996; 314:109-113.
21. KLATT P., SCHMIDT K., MAYER B.: Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *Biochem J* 1992; 288 :15-17.
 22. McMILLAN K., BREDT D.S., HIRSCH D.J., SNYDER S.H., CLARK J.E., MASTER B.S.: Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:11141-11145.
 23. STUEHR D.J., IKEDA-SAITO M.: Spectral characterization of brain and macrophage nitric oxide synthases. Cytochrome P-450-like heme proteins that contain a flavin semiquinone radical. *J Biol Chem* 1992; 267:20547-20550.
 24. KAUFMAN S.: The phenylalanine hydroxylating system. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1993; 67:77-264.
 25. ABU-SOUD H.M., STUEHR D.J.: Nitric oxide synthesis renal, a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:10769-10772.
 26. HEINZEL B., JONH M., KLATT P., BOHME E., MAYER B.: Ca_2^+ /calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 1992; 281:627-630.
 27. POU S., POU W.S., BREDT D.S., SNYDER S.H., ROSEN G.M.: Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267:24137-24141
 28. BECKMAN J.S., BECKMAN T.W., CHEN J., MARSHALL P.D., FREEMAN B.A.: Apparent hydroxyl radical formation by peroxynitrite : implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:16220-16224.
 29. SALVEMINI D., MISKO T.P., MASFERRER J.L., SEIBERT K., CURRIE M.G., NEEDLEMAN P.: Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:7240-7244.
 30. KRÖNCKE K.D., FEHSEL K., KOLB-BACHOFEN V.: Nitric oxide : Cytotoxicity versus cytoprotection : How, why, when and where ? *Nitric oxide : Biology and chemistry* 1997; 1(2):107-120.
 31. STONE J.R., MARLETTA M.A.: Soluble guanylate cyclase from bovine lung ; activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochem Biochemistry* 1994. 33:5636-5640.
 32. YU A.E., HU S., SPIRO T.G., BURSTYN J.N.: Raman resonance spectroscopy of soluble guanylyl cyclase reveals displacement of distal and proximal heme ligands by NO. *J Am*

- Chem Soc 1994; 116:4117-4118.
33. KHATSENKO O., GROSS S.S., RIFKIND A., VANE J.R.: Nitric oxide mediates the decreased in cytochromo P-450 dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11147-11151.
34. NAKATSUKA M., OSAWA Y.: Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200:1630-1634.
35. GROSS S., WOLIN M.: Nitric oxide : Pathophysiological mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:737-769.
36. BOLOTINA V.M., NAJIBA S., PALACINO J.J., PAGANO P.J., COHEN R.A.: Nitric oxide directly activates calcium dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368:850-853.
37. LEI S.Z., PAN Z-H., AGGARWAL S.K., CHEN H-S.V., HARTMAN J., SUCHER N.J., LIPTON S.A.: Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of NMDA receptor channel complex. *Neuron* 1992; 8: 1992.
38. LANDER H.M., SCHAIKAL P.K., LEVINE D.M., NOVOGRODSKY A.: Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide generating compounds. *J Immunol* 1993; 150:1509-1516.
39. GOPALLAKRISHNA R., CHEN Z.H., GUNDIMEDA U.: Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J Biol Chem* 1993; 268:27180-27185.
40. LANDER H.M., SCHIPAL P.K., NOVOGRODSKY A. Nitric oxide signaling : a possible role for G proteins. *J Immunol* 1993; 151:7182-7187.
41. HABY C., LISOVOSKI F., AUNIS D., ZWILLER J.: Stimulation of the cyclic GMP by NO induces expression of the early genes c-fos and jim- β in PC-12 cells. *J Neurochem* 1994; 62:496-501.
42. PEUNOVA N., ENIKOLOPOV G.: Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* 1993; 364 :450-453.
43. DEVI L., PETANCESKA S., LIN R., ARABHA B., BANSINATH M., GARG U.: Regulation of neuropeptide-processing enzymes by nitric oxide in cultured astrocytes. *J Neurochem* 1994; 62:2387-2393.
44. BRUNE B., DIMMELER S., MOLINA y VEDINA L., LAPERTINA E.G.: Nitric oxide : a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sci* 1993; 54:61-70.
45. LIPTON S.A., CHOI Y.B., PAN Z.H., LEI S.Z., CHEN H-J.V., SUCHER N.J., LOSCALZO J.,

- SINGEL D.J., STAMLER J.S.: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364:626-632.
46. HAMMAR B., PARKER W.D. Jr, BENNETT J.P. Jr.: NMDA receptors increase hydroxyl radicals in vivo by using nitric oxide synthase and protein kinase. *Neuro Report* 5:72-74.
47. LEE H.C.: A signaling pathway involving cyclic ADP-ribose, cGMP, and nitric oxide. *NIPS* 1994; 9:134-137.
48. WILLMOTT N., SETHI J.K., WALSETH T.F., LEE H.C., WHITE A.M., GALIONE A.: Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J Bio Chem* 1996; 271(7):3699-3705.
49. MONCADA S., HIGGS A.: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329 (27) :2002-2012.
50. RAND M.J.: Nitregic transmission : nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacolog Physiol* 1992; 19:147-169.
51. RADOMSKI M.W., MONCADA S.: Biological role of nitric oxide in platelet function. In : MONCADA S, HIGGS EA, BERRAZUETA JR, eds. *Clinical relevance of nitric oxide in the cardiovascular system*. Madrid : Edicomplet. 1991 :45-56.
52. 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.
53. CELERMAJER D.S., SORENSEN K.E., GOOCH V.M., SPIEGELHALTER D.J., MILLER O.I., SULLIVAN I.D.: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 340:1111-1115.
54. COOKE J.P., TSAO P.: Cellular mechanism of atherogenesis and the effects of nitric oxide. *Curr Opin Cardiol* 1992; 7:799-804.
55. CREAGER M.A., GALLAGHER S.J., GIRERD X.J., COLEMAN S.M., DZAN V.J., COOKE J.P.: L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*. 1992; 338:1546-1550.
56. DREXLER H., ZEIHNER A.M., MEINZER K., JUST H.: Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991; 338:1546-1550.
57. PANZA J.A., QUYYUMI H.A., BRUSH J.E. Jr, EPSTEIN S.E.: Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in pa-

- tients with essential hypertension. *N Eng J Med* 1990; 323:22-27.
58. MONCADA S.: The L-arginine-nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992; 145:201-227
59. CHO H.J., 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.
60. NAKAKI T., HISHIKAW A.K., SUZUKI H., SARUTA T., KATO R.: L-arginine-induced hypotension. *Lancet* 1990; 336:696.
61. PETROS A.J., HEWLETT M., BOGLE R.G., PEARSON J.D.: L-arginine-induced hypotension. *Lancet* 1991; 337:1044-1045.
62. SESSA W.C., PRITCHARD K., SEYEDI N., WANG J., HINTZE T.H.: Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 1994; 74:349-353.
63. CHEN A.F.Y., O'BRIAN T., TSUTSUI M., KINOSHITA H., POMPILI V.J., CROTTY T.B., SPECTOR D.J., KATUSIC Z.S.: Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in canine basilar artery. *Circ Res* 1997; 80:327-335.
64. NOIRI E., HU Y., BAHOV W., KEESE C.R., GLAEVER I., GOLIGORSKY M.S.: Permissive role of nitric oxide in endothelium-induced migration of endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272(3):1747-1752.
65. DAVENPECK K.L., GAUTHIER T.W., LEFER A.M.: Inhibition of endothelial derived nitric oxide promotes p-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology* 1994; 107:1050-1058.
66. ROSSAINT R., FALKE K.J., LOPEZ F., SLAMA K., PISON U., ZAPOL W.M.: Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Eng J Med* 1993. 328 :399-405.
67. SAMAMA C.M., DIABY M., FELLAHI J.L., MDHAFAR A., EYRAND D., AROCK M., GUILLONSON J.J., CORIAT P., ROUBY J.J.: Inhibition of platelet aggregation by inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1995; 83:56-65.
68. SLADEK S.M., MAGNESS R.R., CONRAD K.P.: Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997; 272(2Pt2):R441-R463.
69. SOORANNA S.R., MORRIS N.H., STEER P.J.: Placental nitric oxide metabolism. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(6):1525-1531.
70. OKUTOMI T., NOMOTO K., NAKAMURA K., GOTO F.: Nitric oxide metabolite in pregnant women before and after deli-

- very. *Acta Obst Gyn Scand* 1997; 76 (3):222-226.
71. WANG X., ROBINSON P.J.: Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem* 1997; 68:443-456.
 72. LOPEZ-JARAMILLO P.: Prevention of preeclampsia with calcium supplementation and its relation with the L-arginine : nitric oxide pathway. *Braz J Med & Biol Res* 1996; 29(6):731-741
 73. PODJARNY E., BEU-CHE-TRIET S., RATHAUS M., KORZETS Z., GREEN J., KATZ B., BERNHEIM J.: Pregnancy-induced hypertension in rats with adriamycin nephropathy is associated with an inadequate production of nitric oxide. *Hypertension*. 1997; 29(4):986-991.
 74. MYATT L., EIS A.L., BROCKMAN D.E., GREER I.A., LYALL F.: Endothelial nitric oxide synthase in placental villous from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Human Reprod* 1997. 12 (1):167-172.
 75. SIMEONI U., MASSFELDER T., SAUSSINE C., JUDES C., GEISERT J., HELWIG J.J.: Involvement of nitric oxide in the vasodilatory response to parathyroid hormone-related peptide in the isolated rabbit kidney. *Clin Sci* 1994; 86:245-249.
 76. TOLLINS J.P., PALMER R.M.J., MONCADA S., RAJ L.: Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. *Am J Physiol*. 1990; 258:H655-H662.
 77. AFEWORK M., TOMLINSON A., BURNSTOCK G.: Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in adrenal gland of developing adult and aging Sprague-Dawley rats. *Cell Tissue Res* 1994; 276:133-141.
 78. COLLIN-OSDOBY P., NICKOLS G.A., OSDOBY P.: Bone cell function, regulation and communication : A role for nitric oxide. *J Cell Biochem* 1995; 57:399-408.
 79. HOLST J.J., RASMUSSEN T.N., SCHMIDT P.: Role of nitric oxide in neurally induced pancreatic exocrine secretion in pigs. *Am J Physiol* 1994; 266:G206-G213.
 80. ATIYA A., COHEN G., IGNARRO L., BRUNICARDI C.: Nitric oxide regulates insulin secretion in the isolated perfused human pancreas via a cholinergic mechanism. *Surgery* 1996;120:322-327.
 81. CORBETT J.A., Mc DANIEL M.L.: Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of β cells ?. *Diabetes* 1992; 41:897-903.
 82. SCHMIDT H.H.H.W., WARNER T.D., MURAD F.: Double-edged role of endogenous nitric oxide. *Nature* 1992; 339:986.
 83. SCHAFFER M.R., TAUTRY U., EFRON P.A., AHRENDT G.M., THORNTON F.J., BARBUL A.:

- Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis : A possible pathophysiological correlation. *Surgery* 1997; 121:513-519.
84. NY L., A.L.M. P., LARSSON B., EKSTROM P., ANDERSON K.E.: Nitric oxide pathway in cat esophagus : localization of nitric oxide synthase and functional effects. *Am J Physiol* 1995; 268:G59-G70
85. PIQUE J.M., WITTLE B.J.R., ESPLUGUES J.V.: The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculation. *Eur J Pharmacol* 1989. 174:293-296.
86. TAKEUCHI K., OHUCHI T., MIYAKE H., OKABE S.: Stimulation by nitric oxide synthase inhibitors of gastric and duodenal HCO_3^- secretion in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266:1512-1519.
87. TAKEUCHI K., OKABE S.: Mechanism of gastric alkaline response in the stomach after damage. Roles of nitric oxide and prostaglandins. *Dig Dis & Sci* 1995; 40 (4):865-871.
88. TAKEUCHI K., OHUCHI T., OKABE S.: Effects of nitric oxide synthase inhibitor N^G -nitro-L-arginine methyl ester on duodenal alkaline secretory and ulcerogenic response induced by mepirizole in rats. *Dig Dis & Sci* 1995; 40(3):670-677.
89. BILSKI J., KONTUREK P.Ch., KONTUREK S.J., CIESZKOWSKI M, CZARNOBILSKI K.: Role of endogenous nitric oxide in the control of gastric acid secretion, blood flow and gastrin release in conscious dogs. *Reg Pept* 1994; 53:175-184.
90. PIQUE J.M., ESPLUGUES J.V., WITTLE B.J.R.: Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. *Gastroenterology*. 1992; 102:168-174.
91. WALDER C.E., THIEMERMAN C., VANE J.R.: Endothelium-derived relaxing factor participates in the increased blood flow in response to pentagastrin in the rat stomach mucosa. *Proc R Soc Lond B* 1990; 241:195-200.
92. TAKEUCHI K., TAKEHARA K., KANEKO T., OKABE S.: Nitric oxide and prostaglandins in regulation of acid secretory response in rat stomach following injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272(1):357-363.
93. ESPLUGUES J.V., BARRANCHINA M.D., BELTRAN B., CALATAYUD S., WITTLE B.J.R., MONCADA S.: Inhibition of gastric acid secretion by stress : A protective reflex mediated by cerebral nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996. 93:14839-14844.
94. BARRANCHINA M.D., WITTLE B.J.R., MONCADA S., ESPLUGUES J.V.: Endotoxin inhibition of distension-stimulated gastric acid secretion in rat : mediation by NO in the central nervous system. *Br J Pharmacol* 1995;114:8-12.

95. RAO R.K., RIVIERE P.J.M., PASCAUD X., JUNIEN J.L., PORRECA F.: Tonic regulation of mouse ileal ion transport by nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269(2):626-631.
96. SCHIRGI-DEGEN A., BEUBLER E.: Significance of nitric oxide in the stimulation of intestinal fluid absorption in the rat jejunum in vivo. *Br J Pharmacol* 1995;114:13-18.
97. CAPLAN M.S., HEDLUND E., HILL N., MACKENDRICK W.: The role of endogenous nitric oxide and platelet-activating factor in hypoxia-induced intestinal injury in rats. *Gastroenterology* 1994; 106:346-352.
98. GUARNER C., SORIANO G., TOMAS A., BULBENA O., NOVELLA M.T., BALANZO J., VILLARDELL F., MOURELLE M., MONCADA S.: Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis : relationship to endotoxemia. *Hepatology*. 1993; 18(5):1139-1143.
99. MARTIN P., XU D.L., NIEDERBERGER M., WEIGERT A., TSAI P., St JOHN J., GINES P., SCHRIER R.: Upregulation of endothelial constitutive NOS : a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1996; 270 :F494-F499.
100. STERLING R., SANYAL A.J., SCHUBERT M.L.: Nitric oxide and portal hypertension. *Gastroenterology* 1997; 112(5): 1767-1768.
101. GARTHWAITE J.: Nitric oxide synthesis linked to activation of excitatory neurotransmitter receptors in the brain. In *Nitric oxide from L-arginine : A bioregulatory system*, ed by S. Moncada and E. A. HiggsElsevier, Amsterdam. 1990. pp 115-135.
102. GARTHWAITE J., CHARLES S.L., CHESS-WILLIAM R.: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggest role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988; 336:385-388
103. SPRINGALL D.R., RIVEROS-MORENO V., BUTTERY L., SUBURO A., BISHOP A.E., MERRRET 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.
104. HANBAUER I., WIUK D., OSAWA Y., EDELMAN G.M., GALLY J.A.: Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of ³H-dopamina from striatal slices. *Neuroreport* 1992; 3:409-412.
105. LONART G., WANG J., JOHNSON K.M.: Nitric oxide stimulates neurotransmitter release from hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 1992; 220:271-272.
106. LONART G., JOHNSON K.M.: Inhibitory effects of nitric oxide on the uptake of ³H-dopamine and ³H-glutamate by striatal

- synaptosomas. *J Neurochem* 63:2108-2117.
107. COLLINGRIDGE G.L., KEHL S.J., Mc LEUNAN H.: Excitatory amino-acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commisural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 1983; 334:33-46.
108. BRIER H., SHEPHERD G.M.: Implications of NO/cGMP system for olfaction. *Trends Neurosci* 1993; 16:5-9.
109. MOORE P.K., OLUYOMI A.O., BABBEDGE R.C., WALLACE P., HART S.L.: L-N^G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 1991; 102:198-202.
110. VENTURINI C.M., KNOWLES R.G., PALMER R.M.J., MONCADA S.: Synthesis of nitric oxide in the brain retine. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180:920-925.
111. GARTHWAITE J., BOULTON C.L.: Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:683-706.
112. GUEVARA-GUZMAN R., EMSON P., KENDRICK K.: Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 1994; 62:807-810.
113. JAFFREY S.R., SNYDER S.H.: Nitric oxide : a neural messenger. *Annu Rev Cell Biol* 1995; 11:417-440.
114. OKADA D.: Proteinkinase C modulates calcium sensitivity of nitric oxide synthase in cerebellar slices. *J Neurochem* 1995; 64:1298-1304.
115. GARTHWAITE J.: NMDA receptors, neuronal development and neuronal degeneration. In : *The NMDA receptor*, ed by JC Watkins and GL Collingridge. Oxford University Press, Oxford, England. 1989. pp 187-205.
116. ROSS C.A., BRETT D., SNYDER S.H.: Messenger molecules in the cerebellum. *Trends Neurosci* 1990; 13:216-222.
117. KOZNIIEWSKA E., ROBERTS T.P.L., TSUNRA M., MINTOROVITCH J., MOSELEY M.E., KUCHARCZYK J.: N^G-nitro-L-arginine delays the development of brain injury during focal ischemia in rats. *Stroke* 1995; 26:282-289.
118. NAGAFUJI T., MATSUI T., KOIDE T., ASANO T.: Blockade of nitric oxide formation by N^W-nitro-L-arginine mitigates ischemic brain edema and subsequent cerebral infarction in rats. *Neuros Lett* 1992; 147:159-162.
119. NAGAFUJI T., SUGIYAMA M., MATSUI T.: Temporal profiles of Ca²⁺/Calmodulin-dependent and independent nitric oxide synthase activity in the rat brain microvessels following cere-

- bral ischemia. *Acta Neurochir* 1994; 60:285-288.
120. COBBS C.S., BRENNAN J.E., ALDAPE K.D., BREDT D.S., ISRAEL M.A.: Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 1995; 55:727-730.
 121. MEARIN F., MOURELLE M., GUARNER F., SALAS A., RIVEROS-MORENO V., MONCADA S.: Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. *Eur J Clin Invest* 1993; 23:724-728.
 122. 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 Eng J Med* 1992; 327:511-515.
 123. IGNARRO L.J., BUSH P.A., BUGA G.M., WOOD K.S., FUKUTO J.M., RAJFER J.: Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170:843-850.
 124. BELVISI M.G., STRETTON C.D., YACOUB M., BARNES P.J.: Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol* 1992; 210:221-222.
 125. NUSSLER A.K., DI SILVIO M., BILLIAR T.R., HOFFMAN R.A., GELLER D.A., SELBY R., MADARIAGA J., SIMMONS R.L.: Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 1992; 176:261-264.
 126. REES D.D., CELLEK S., PALMER R.M.J., MONCADA S.: Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 176:261-264.
 127. 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.
 128. BRENNER T., YAMIN A., GALLILY R.: Mycoplasma triggering of nitric oxide production by central nervous system glial cells and its inhibition by glucocorticoids. *Brain Research* 1994; 641:51-56.
 129. KUO P.C., ABE K.Y.: Nitric oxide-associated regulation of hepatocyte glutathione synthesis is a guanylyl cyclase-independent event. *Surgery* 1996; 120:309-314.
 130. MAC MICKING J., NORTH R.J., LA COURSE R., MUDGETT J.S., SHAH S.K., NATHAN C.F.: Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:5243-5248.

131. FARRELL A.J., BLAKE D.R., PALMER R.M., MONCADA S.: Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheu Dis* 1992; 51(11):1219-1222..
132. McCARTNEY-FRANCIS N., ALLEN J.B. ; MIZEL D.E., ALBINA J.E., XIE Q.W., NATHAN C.F., WAHL S.M.: Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1993; 178:749-754.
133. ALICAN I., KUBES P.: A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol* 1996; 270:G225-G237.
134. MIDDLETON S.J., SHORTHOUSE H., HUNTER J.O.: Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993; 341:465-466.
135. COOK H.T., EBRAHIM H., JANSEN S., FOSTER G.R., LANGEN P., CATTEL V.: Expression of the gene for inducible nitric oxide synthase in experimental glomerulonephritis in the rat. *Clin Exp Immunol* 1994; 97:315-320.
136. NATHAN C.: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6:3051-3064.
137. LOPEZ-MORATALLA N., GONZALEZ A., AYMERICH M.S., LOPEZ-ZABALZA M.J., PIO R., DE CASTRO P., SANTIAGO E.: Monocyte inducible nitric oxide synthase in multiple sclerosis. *Regulatory role of nitric oxide. Nitric Oxide : Biology and Chemistry* 1997; 1(1):95-104.
138. HORTON R.A., KNOWLES R.G., TITHERADGE M.A.: Endotoxin causes reciprocal changes in hepatic nitric oxide synthesis, gluconeogenesis, and flux through phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204(2):659-665
139. HARBRECHT B.G., BILLIAR T.R.: The role of nitric oxide in kupffer cell-hepatocyte interactions. *Schock* 1995; 3(2):79-87.
140. KILBOURN R.G., GRIFFITH O.W.: Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1671-1672.
141. THIEMMERMAN C., VANE J.: Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol* 1990; 182:591-595.
142. KILBOURN R.G., GROSS S.S., JUBRAN A., ADAMS J., GRIFFITH O.W., LEVI R., LODATO R.F.: N^G-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension : implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3629-3632.
143. COBB J.P., NATANSON C., HOFFMAN W.D., LODATO F., BANKO S., KOEV C.A., SOLOMON M.A., ELIN R.J., HOSSEINI J.M., DANNER R.: N^W-am-

- ino-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, raises vascular resistance but increases mortality rates in awake canines challenged with endotoxin. *J Exp Med* 1992; 176:1175-1182.
144. WRIGHT C.E., REES D.D., MONCADA S.: Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1992; 26:48-57.
145. WESTBERG G., SHULTZ P.J., RAIJ L.: Exogenous nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis in rats. *Kidney Int* 1994; 46:711-716.