

Artículo Especial |

Dr. Salvador Moneada

AVENTURAS EN FARMACOLOGÍA: VEINTE AÑOS DE CASUALIDAD Y DISEÑO

Proyecto Cruciforme, University College London, Londres, Inglaterra

PRINCIPIOS DEL BIOENSAYO

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

Nosotros en cambio utilizamos un tipo de bioensayo conocido como bioensayo de superfusión, en el que el tejido no está inmerso sino que la solución fisiológica fluye sobre su superficie. La historia de esta técnica es bastante reciente, pues comenzó en 1953 con la publicación de John Gaddum "La técnica de superfusión" (2). Este sistema, según John

Gaddum tiene la ventaja de una mayor sensibilidad, ya que los materiales investigados pueden aplicarse sin dilución sobre el tejido, lo que resulta particularmente adecuado para sustancias de acción lenta. Una importante adición a la técnica del ensayo en superfusión fue hecha unos años más tarde por John Vane. Esta consistió en la superfusión en serie de tejidos de bioensayo a modo de cascada (3). Obviamente, en un sistema fluyente de estas características, no sólo se puede emplear soluciones fisiológicas sino también sangre de animales, como circulación extracorpórea. Cada tejido de bioensayo responde de una manera característica y reproducible a una sustancia vasoactiva dada; la superfusión de una determinada combinación de tejidos proporciona una forma de reconocimiento específico y una medida cuantitativa de las sustancias vasoactivas cuyo perfil de actividad biológica ha sido determinado previamente (fig. 1). Además, y probablemente de mayor trascendencia, es que esta técnica proporciona la base para el descubrimiento de sustancias no identificadas, a las cuales los tejidos de bioensayo responden, a su vez, de una manera inesperada. Esta técnica versátil ha sido el centro de gran parte de nuestro trabajo en los últimos 20 años y nos ha permitido a mis colegas y a mi realizar las contribuciones que describiré a continuación.

...Voy a referirme a mi trabajo científico de los últimos 20 años. Pero no a mi trabajo en general, sino a las situaciones en las que puedo discernir el proceso de descubrimiento. Son estos pocos momentos misteriosos que se resuelven en esa incomparable sensación de maravilla que es el descubrimiento científico, los que alcanzan para abastecer de esperanza la duda existencial que nos domina.

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

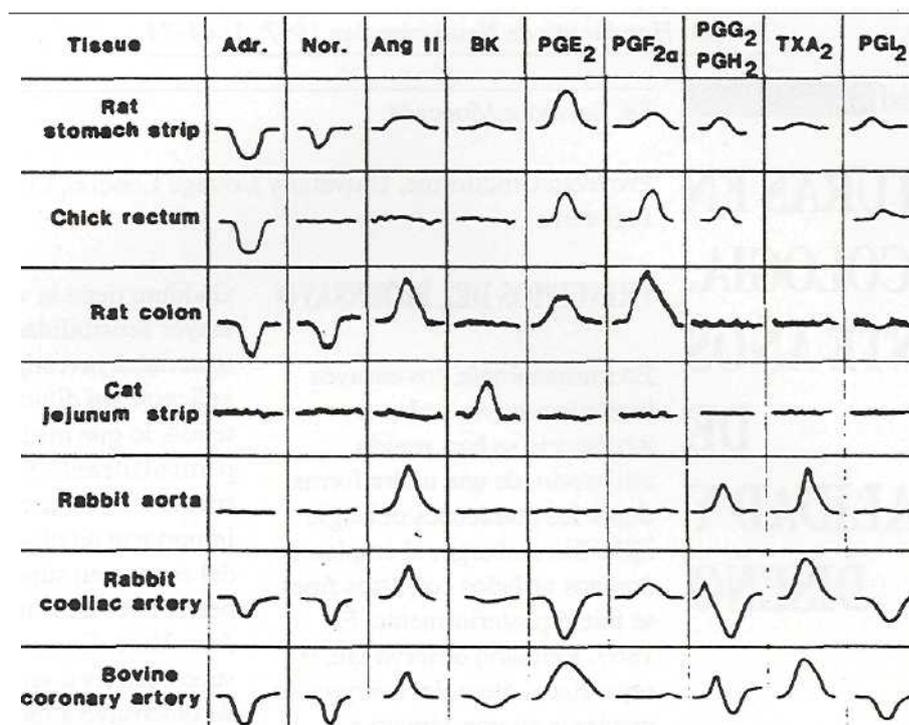


FIG. 1.—Perfiles de bioensayo de diversas sustancias vasoactivas. Los agonistas contraen, relajan o carecen de efecto en los tejidos utilizados para el bioensayo: Adr = Adrenalina; Nor = Noradrenalina; Ang II = Angiotensina II; BK = Bradiquinina, PGE₂ = Prostaglandina E₂; PGF_{2α} = Prostaglandina F_{2α}; PGG₂ y PGH₂ = Endoperóxidos de prostaglandina; TXA₂ = Tromboxano A₂; PGL₂ = Prostaciclina

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ASPIRINA Y FÁRMACOS RELACIONADOS

En 1971 tuve el privilegio de incorporarme al grupo dirigido por John Vane en el Departamento de Farmacología del Real Colegio de Cirujanos. Durante los meses previos, este grupo había desarrollado ciertas ideas que sugerían que los fármacos del tipo de la aspirina podrían estar inhibiendo la síntesis de prostaglandinas (4). Por esas fechas se estaba investigando las acciones biológicas de las únicas prostaglandinas conocidas PGE[^]PGF[^]PGE[^]FGE[^]y aunque se sabía que el precursor metabólico era el ácido araquidónico, los detalles de la

ruta bioquímica no estaban completamente dilucidados (5).

La primera tarea que se me asignó fue investigar si las acciones inducidas por el ácido araquidónico en una serie de tejidos de bioensayo podían inhibirse por aspirina. Esto lo demostré rápidamente. Mis resultados estaban, además, de acuerdo con otros obtenidos en homogeneizados de pulmón de cobayo que demostraban inhibición de la formación de prostaglandinas por tres fármacos de tipo de la aspirina: la propia aspirina, indometacina y salicilato de sodio (6). Al cabo de unas pocas semanas,

Estos hallazgos sentaron las bases de mis siguientes dos años y medio de trabajo, investigando el papel que juegan las

prostaglandinas en los procesos de inflamación y dolor. Asimismo estudié la hipótesis que postulaba que las prostaglandinas podrían estar implicadas en la modulación de la neurotransmisión simpática. Los frutos de mi trabajo de este período se plasmaron en diversos artículos (9, 10) y revisiones (11), así como en mi Tesis Doctoral (12). Básicamente éstos demostraron que, tanto en inflamación como en dolor las prostaglandinas no actúan como mediadores de ninguno de los signos o síntomas sino como moduladores, proporcionando un sistema de amplificación el que es reducido por fármacos del tipo de la aspirina. Estos hallazgos, así como la hipótesis general, fueron confirmados por diversos laboratorios de todo el

mundo. Más aún, estos fármacos acabaron siendo las herramientas farmacológicas y bioquímicas más importantes para investigar el papel de las

prostaglandinas en el organismo. El descubrimiento del mecanismo de acción de los fármacos del tipo de la aspirina condujo a su empleo en situaciones nuevas tales como la

prevención del parto prematuro, la estimulación del cierre del ductus arteriosus persistente y el tratamiento del síndrome de Bartter(13).

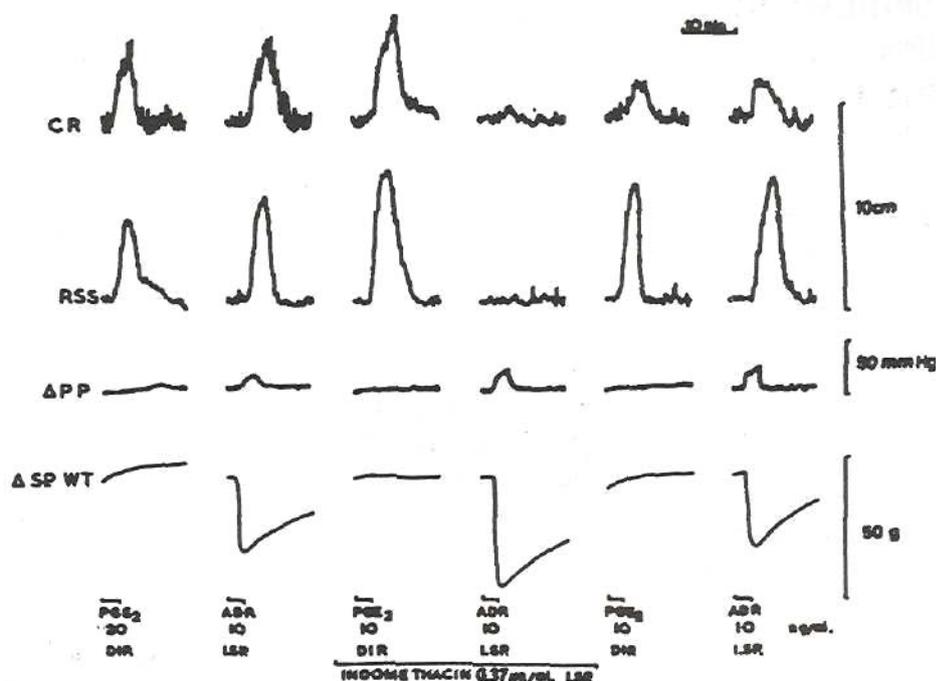


FIG. 2.—La indometacina previene la liberación de prostaglandinas inducida por Adrenalina en el bazo perfundido de perro. Una muestra del efluente esplénico fue utilizada para perfundir los tejidos de bioensayo (CR = recto de pollo; RSS = Tiras de estómago de rata). Los cambios en la presión de perfusión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

Uno de los objetivos principales en los últimos 20 años ha sido encontrar fármacos desprovistos en los efectos colaterales de estos compuestos, buscando sustancias que pudiesen inhibir la generación de prostaglandinas en el lugar de la inflamación, pero sin afectar a la enzima generadora de prostaglandinas (ciclo-oxigenasa) en la mucosa del estómago. Recientemente esta búsqueda ha sido asistida por el descubrimiento de dos tipos de ciclooxigenasa, una de tipo constitutivo y otra isoforma

inducible. La primera, cuya estructura tridimensional ha sido descrita recientemente (14), se encuentra presente en el endotelio vascular, mucosa gástrica y otros tejidos y es responsable de la formación de metabolitos del ácido araquidónico que llevan a cabo funciones fisiológicas. La segunda, se ha demostrado recientemente que es inducida en células migratorias, y en otros tipos celulares, por estímulos inflamatorios y por citoquinas (15). Este hallazgo ha

sugerido una atractiva hipótesis: las acciones anti-inflamatorias de los fármacos del tipo de la aspirina se deben a la inhibición de la enzima inducible, mientras que los efectos indeseables (tales como la irritación del revestimiento del estómago) tienen su origen en la inhibición de la isoforma constitutiva (15). El diseño de un inhibidor de la ciclo-oxigenasa inducible permitirá confirmar esta hipótesis y posiblemente proporcionará una mejor aproximación terapéutica al

problema de la inflamación. Por consiguiente, a pesar del progreso en esta área, la búsqueda de una nueva y mejor aspirina aún continúa.

LA ACCIÓN ANTI-TROMBÓTICA DE LA ASPIRINA Y FÁRMACOS RELACIONADOS

Quedaba todavía un rompecabezas por resolver: la aspirina inhibe la agregación plaquetaria, aumenta el tiempo de sangría y se ha sabido durante mucho tiempo que posee acción antitrombótica (16). El misterio consistía en que ninguna de las prostaglandinas conocidas hasta entonces inducía la agregación plaquetaria. Importantes pistas para la explicación de este fenómeno surgieron de la combinación de hallazgos previos y de nuevos avances en el conocimiento de la vía metabólica del ácido araquidónico. En 1969, Priscilla Piper y John Vane describieron la liberación de una sustancia capaz de contraer la aorta del conejo (rabbit aorta contracting substances, RCS), cuya síntesis se inhibía con los fármacos del tipo de la aspirina (17). Se sabía, además, que microsomas obtenidos de plaquetas producían un potente agregante de las plaquetas humanas (18) y, en 1974, se demostró que

intermediarios inestables del metabolismo del ácido araquidónico, los endoperóxidos de las prostaglandinas, PGG₂, y PGH₂ eran a la vez agregantes plaquetarios y contraían el tejido vascular (19, 20). Todo ello condujo inicialmente a la creencia de que los endoperóxidos eran responsables de la actividad RCS descrita por Piper y Vane y proporcionó, por vez primera, una explicación para las acciones plaquetarias de la aspirina. Sin embargo, las vidas medias de RCS (<2 min.) y de los endoperóxidos (aprox. 5 min.) eran diferentes y la cantidad de endoperóxidos liberados por el pulmón o por las plaquetas agregadas no era suficiente para explicar la actividad contráctil observada en la aorta de conejo. De ahí que Bengt Samuelsson con sus colegas, se propusieron buscar otra sustancia responsable de la actividad RCS. En 1975, ellos demostraron que las plaquetas incubadas con ácido araquidónico o con PGG₂ producían un compuesto activo muy inestable (vida media de 30 segundos), posteriormente identificado como tromboxano A[^] (TXA₂). Este era capaz de contraer en forma potente tiras de aorta e inducir la agregación plaquetaria (21), lo que permitió concluir que el componente principal del RCS formado en plaquetas y pulmón de cobayo es el TXA₂.

El hallazgo de la conversión de endoperóxidos de prostaglandina

en TXA₂ sugirió la existencia de una vía enzimática responsable de esta transformación. Esta fue la base del proyecto que iniciamos el verano de 1975 con muestras de endoperóxidos obtenidas del Instituto Karolinska en Estocolmo. Nuevamente utilizando como bioensayo la superfusión en cascada, identificamos una enzima en la fracción microsomal de la plaqueta que denominamos TX sintasa (22). El criterio que utilizamos en el bioensayo en cascada fue la transformación de la PGG₂, sustancia con características RCS, en otra sustancia con las mismas propiedades pero de mayor potencia y menos estabilidad (fig. 3). Fue difícil llevar a cabo estos experimentos, ya que a 37 grados C o aún a temperatura ambiente, el TXA₂ era extremadamente inestable y su actividad biológica desaparecía antes de ser transferido al bioensayo en cascada. Tras muchos esfuerzos, Stuart Bunting, un estudiante en ese tiempo, y yo diseñamos un sistema para incubar la enzima con el endoperóxido a 0 °C. Esto retardó la conversión a TXA₂ y aumentó su estabilidad, resolviendo el problema. En forma concomitante empleamos la agregación de plaquetas como sistema de bioensayo y demostramos la acción potente del TXA₂ comparada con los endoperóxidos de plaquetas (fig. 4). Posteriormente, encontramos

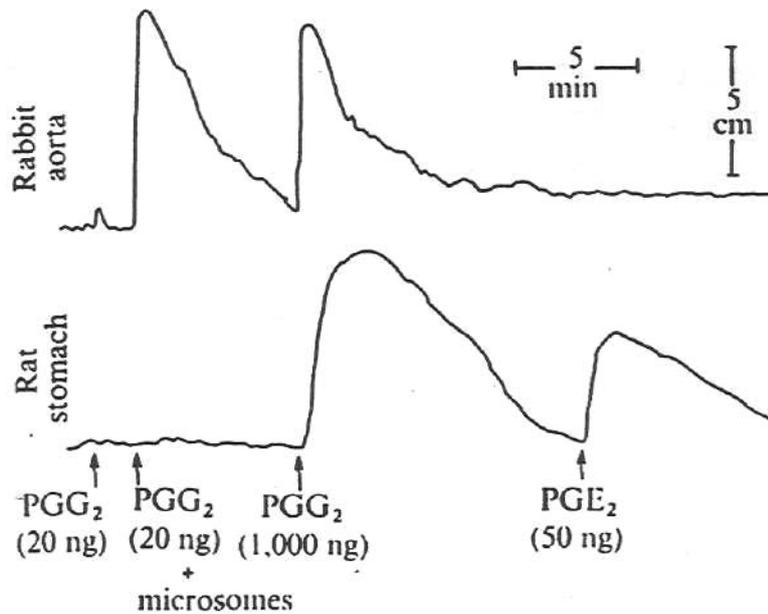


FIG. 3.—Bioensayo diferencial de sustancias que contraen la aorta de conejo: Endoperoxido de prostaglandina (PGG₂ 200 ng) se añadió a 500 μ l de Tris-buffer at 0° C y una muestra de 50 μ l (equivalente a 20 ng) fue ensayada en los tejidos. Inmediatamente después se añadieron microsomas de plaquetas de caballo a la solución de PGG₂, 50 μ l de esta solución se ensayaron en los tejidos dos minutos más tarde. La figura muestra también la respuesta de los tejidos a 1000 ng de PGG₂ y 50 ng de PGE₂. Figura tomada de la referencia 22:

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

Todo este trabajo esclareció la ruta plaquetaria de biotransformación del ácido araquidónico hacia los endoperoxidos por medio de la enzima ciclo-oxigenasa, y su ulterior conversión en TXA₂ mediante la TX sintasa. Se trataba de una vía metabólica única ya que, en la mayoría de los tejidos estudiados, los endoperoxidos se transforman en prostaglandinas estables mediante reacciones catalizadas por isomerasas y reductasas.

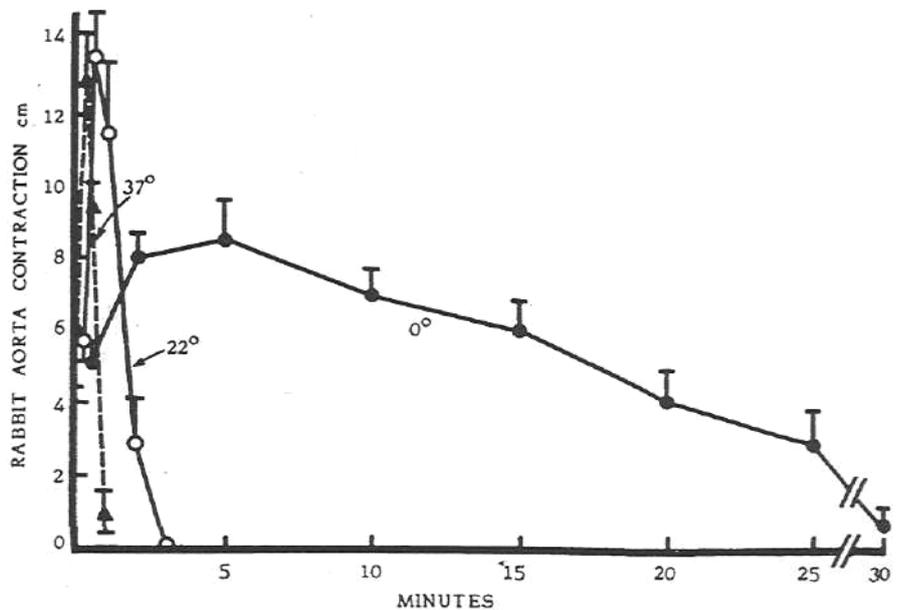


FIG. 4.—Curso temporal y dependencia de temperatura de tromboxano sintetasa. Prostaglandina G₂ (500 ng) fue añadida a 1 ml de Tris-buffer conteniendo microsomas de plaquetas e incubada a 0° C, 22° C o 37° C antes de ensayar 50 μ l. Datos tomados de la referencia 22.

DESCRUBRIMIENTO DE LA PROSTACICLINA Y ALGUNAS DE SUS CONSECUENCIAS

Durante la realización de este proyecto también decidimos investigar cuál era la distribución de la TX sintasa en el organismo. Para ello preparamos fracciones microsomaes a partir de diferentes tejidos y los incubamos con endoperóxidos con el fin de estudiar la formación de TXA[^]. Yo tenía particular interés en la pared

vascular, ya que había pensado que el TXA₂ en caso de que fuese generado en los vasos podría actuar en sinergismo con aquel producido por las plaquetas. Si esto era correcto, nos ayudaría a entender el proceso de formación del tapón hemostático y, especialmente, la vasoconstricción inmediata que se produce tras cortar un pequeño vaso. Por otra parte, yo sabía que las plaquetas y el tejido vascular comparten algunas propiedades antigénicas (24), lo que sugería que ambas estructuras debían poseer ciertas proteínas en común.

Encontramos que varios tejidos, incluyendo el pulmón y el bazo, tenían la capacidad de generar TXA₂, mientras que otros únicamente sintetizaban prostaglandinas a partir de endoperóxidos (25). Sin embargo, un hallazgo inesperado fue que la fracción microsomal de la pared vascular consumía la actividad RCS de los endoperóxidos, sin generar TXA₂, u otra prostaglandina que pudiésemos reconocer (fig. 5). Se trataba de un proceso enzimático, ya que se prevenía tras

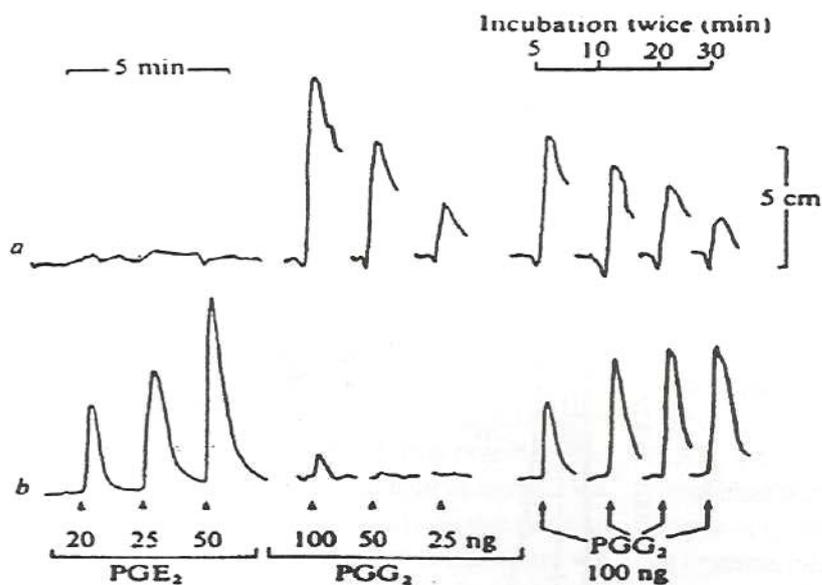


FIG. 5—Bioensayo utilizando tiras aórticas de conejo (a) y colon de rata (b). Prostaglandina PGE₂ contrae el colon de rata, mientras que PGG₂ (0.5 ug) fue incubada en 0,5 ml de Tris buffer a 22° C, y alícuotas de 100 µl fueron ensayadas en los tejidos, a 5, 10, 20 y 30 min. La desaparición espontánea de PGG₂ (expresada como disminución en la contracción de la aorta de conejo) se vio asociada con la aparición de actividad de tipo PGE (expresada por el aumento de la contracción del colon de rata). Figura tomada de la referencia 27.

hervir la preparación microsomal (fig. 6). Más aún, el fenómeno observado no podía explicarse en términos de una ulterior conversión de alguna prostaglandina en un producto inactivo, ya que la PGE₂ o PGF_{2a}

incubadas con fracción microsomal de aorta no perdían su actividad biológica. El producto formado, al que denominamos prostaglandina X (PGX), parecía tener cierta actividad vascular, puesto que relajaba tiras de arteria celíaca y mesentérica de

conejo. Por esa época, habíamos descubierto que estos dos tejidos respondían a endoperóxidos de manera bifásica, esto es, con una contracción seguida de una relajación de larga duración (26).

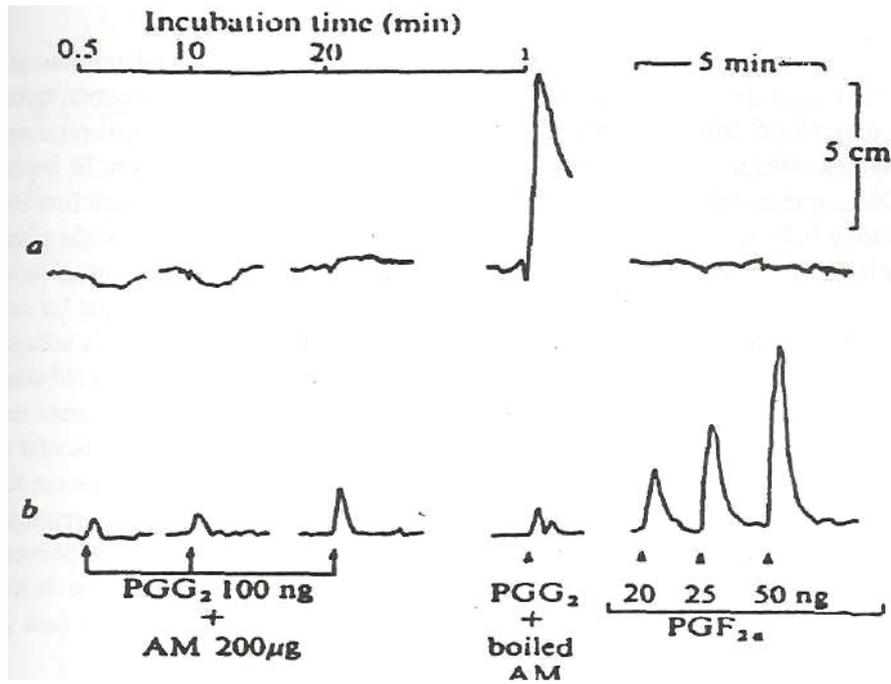


FIG. 6.—Efecto de microsomas aórticos (AM), sobre PGG₂. PGG₂ (0.5 ug) fue incubada con AM (1 mg) en 0.5 ml de Tris buffer a 22° C y la actividad de alícuotas de 100 p.l fue explorada, a 0, 5, 10 y 20 min. a) Representa tiras de aorta de conejo; b) Representa colon de rata. En presencia de AM la actividad contráctil de PGG₂ en tiras de aorta de conejo desaparece en 0.5 minutos, sin que se detecte la formación de PGE o PGF, aun cuando la incubación se haga durante 20 min. Microsomas (200 ug) hervidos e incubados con PGG₂ (100 ng) en Tris-buffer a 22° C durante 1 min.. no afectan la actividad de PGG₂ en aorta de conejo. El efecto selectivo de PGF_{2α} es también mostrado en el colon de rata. Figura tomada de la referencia 27.

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

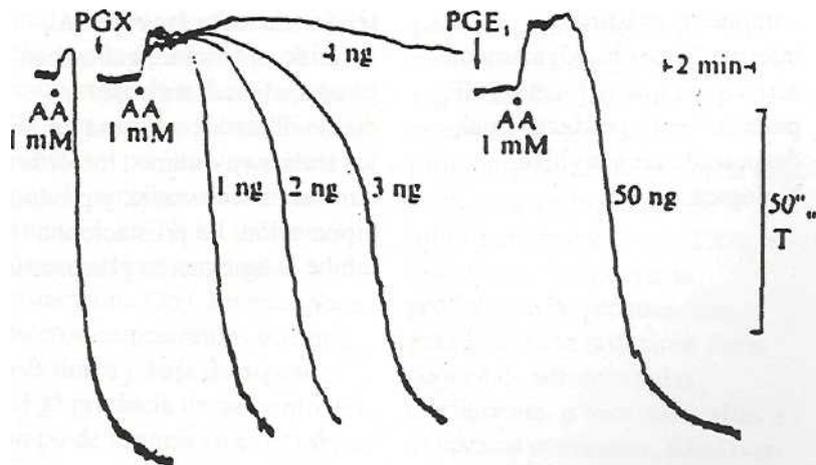


FIG. 7.—Comparación de la potencia anti-agregante de PGX y PGE₁: La figura muestra los cambios en la transmisión de luz a través de plasma humano rico en plaquetas en un agregómetro. La PGX fue obtenida por incubación de 100 ng de PGG₂ con 500 Jg de microsomas aórticos en 100 ul de Tris-buffer durante 2 min a 22° C y después conservados en hielo. PGX (1-4 ng) y PGE₁ (50 ng) cada una en 10 ul, se añadieron a plasma humano rico en plaquetas 1 min, antes de ácido araquidónico (AA, 1 mM). En el experimento se muestra que PGX fue al menos 25 veces más potente que PGE₁, como anti-agregante. Figura tomada de la referencia 27.

Stuart Bunting y yo ensayamos PGX en la agregación de plaquetas con una hipótesis simple; habíamos estado buscando TXA₂, que es un vasoconstrictor e inductor de la agregación plaquetaria. En esa búsqueda nos habíamos tropezado con una sustancia vasodilatadora. Podría este compuesto -pensé-, además, inhibir la agregación plaquetaria y poseer, así propiedades biológicas opuestas a las del TXA₂ ? Efectivamente así fue!

La identificación de la estructura de la PGX fue otra fascinante historia de detectives. En un Congreso en Vale, Colorado, a principios de 1976, asistimos a una charla de Cecil Pace-Asciak en la que éste describía la formación de un compuesto a partir de ácido araquidónico o de endoperóxidos de PG, la 6-ceto-PGF₁ en estómago de rata (28). El desconocía por completo la actividad biológica de esta vía. Al concluir la charla, John Vane y yo nos preguntamos si en la formación de este compuesto existirían intermediarios biológicamente activos, ya que la 6-ceto-PGF_{1a} parecía ser un producto final, desposeído de actividad biológica.

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

Posteriormente, se demostró que tejidos de todas las especies, incluido el hombre, generaban prostaciclina. Esta posee un efecto dilatador en la mayoría de los lechos vasculares, incluida la circulación coronaria, y produce hipotensión. La prostaciclina inhibe la agregación plaquetaria

mediante un aumento de las concentraciones intraplaquetarias de AMP cíclico. El hecho de que la prostaciclina inhiba la agregación plaquetaria a concentraciones mucho más bajas que las requeridas para inhibir la adhesión, hace pensar que esta sustancia permite que las plaquetas se adhieran al tejido vascular con el cual interaccionan realizando así su papel de reparación vascular, a la vez de prevenir o limitar la formación de trombos (para revisión véase 13).

De esta manera los endoperóxidos son metabolizados en las plaquetas al agente pro-agregante y vasoconstrictor TXA₂ pero en la pared vascular son convertidos al factor vasodilatador, antiplaquetario, prostaciclina (fig. 8). Esto acoplado al descubrimiento posterior que enfermedades o condiciones médicas que favorecen el desarrollo de trombosis están asociadas a un aumento de TXA² y a una reducción de prostaciclina, ha llevado a nuevas ideas para el control de las condiciones trombóticas (para revisión ver 29).

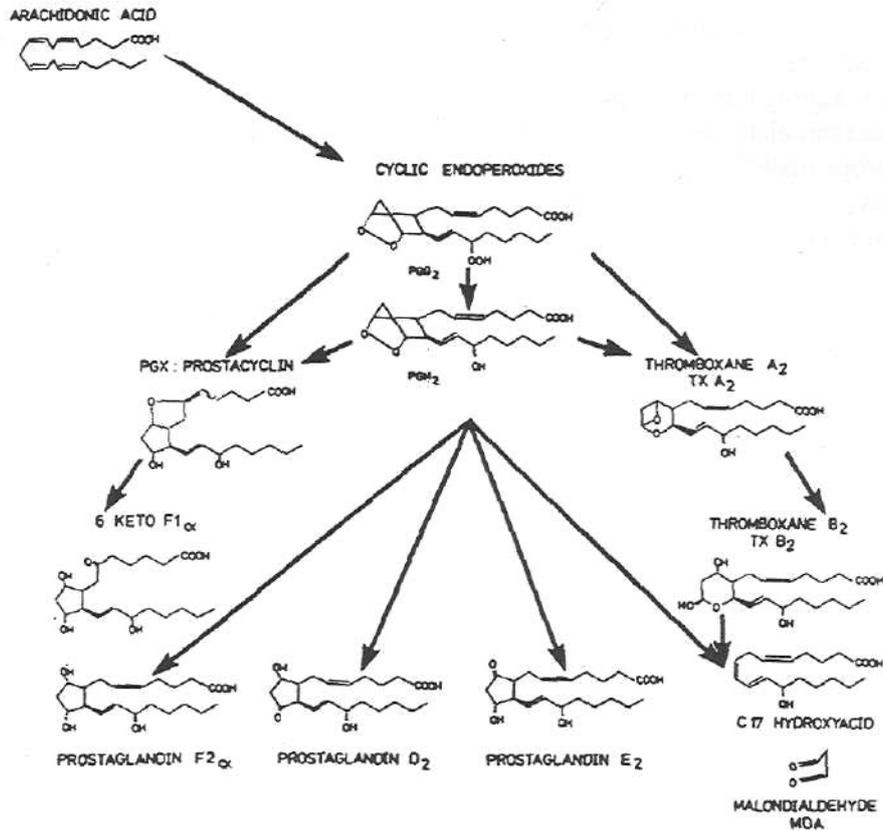


FIG. 8.—Metabolismo del ácido araquidónico por la vía ciclo-oxigenasa.

La aspirina inhibe a la ciclo-oxigenasa de plaquetas en dosis mucho más bajas que las necesarias para producir un efecto analgésico y anti-inflamatorio (30). Este efecto de la aspirina en las plaquetas es de larga duración, debido a que la aspirina, y no los fármacos relacionados, es capaz de acéfilar el grupo hidroxilo de la única serina, en posición 530, de la cadena polipeptídica de la ciclo-oxigenasa, ocasionando su inhibición irreversible (31,32). Las plaquetas son incapaces de sintetizar proteínas (33) y no pueden reemplazar la ciclo-oxigenasa, por lo tanto la inhibición sólo puede ser superada cuando nuevas plaquetas entran en la circulación, a partir de megacariocitos cuya ciclo-oxigenasa no ha sido inhibida.

Por otra parte, experimentos realizados *in vitro* demostraron que la ciclo-oxigenasa de la pared vascular es menos sensible que la de las plaquetas a la acción inhibitoria de la aspirina (34). Por otra parte, estudios en animales mostraron que dosis bajas de aspirina reducen la formación de TXA₂, en forma más importante que la de prostaciclina (35). En esa época nosotros demostramos que una dosis única y baja de aspirina (0.3 g) producía un aumento del tiempo de sangría en el hombre, mientras que dosis altas (3.9 g) carecían de efecto (36). Además la aspirina administrada oralmente sufre una hidrólisis pre-sistémica, por lo tanto, las plaquetas que pasan por el intestino están expuestas a una mayor concentración de aspirina que en la circulación periférica

(37). Por consiguiente, la aspirina posee cualidades únicas de acción prolongada en muy pequeñas cantidades que no poseen otras drogas anti-inflamatorias de origen no-esteroide. Estos datos promovieron la búsqueda de una dosis de aspirina capaz de inhibir la formación de TXA₂ en el hombre, sin afectar la producción de prostaciclina, para lo cual se utilizaron dosis pequeñas, administradas diariamente, o bien dosis altas a intervalos semanales, solas o en combinación con otros agentes antitrombóticos (38). Análisis recientes demuestran que el tratamiento a largo plazo con una dosis baja de aspirina (75 a 325 mg) tiene claros efectos beneficiosos para pacientes con aterosclerosis establecida (39, 40).

La prostaciclina y sus derivados estables (tales como carbaciclina o iloprost) pueden ser beneficiosos en un gran número de enfermedades circulatorias, debido a sus propiedades vasodilatadoras y antiagregantes, como también por sus acciones citoprotectoras y antiproliferativas. La prostaciclina también protege la cuenta plaquetaria cuando se utiliza en sistemas de circulación extracorpórea en animales o en el hombre. Se ha empleado en hemodiálisis, circunvalación cardiopulmonar y hemoperfusión con carbón activado (41). Tanto la prostaciclina como el iloprost han demostrado efectos beneficiosos en pacientes con enfermedad vascular periférica, con mejoras significativas en lo que se refiere a alivio del dolor, curación de úlceras y tasa de amputación (42). Se ha reportado efectos similares en el tratamiento de úlceras y flujo vascular periférico en sujetos con síndrome de Raynaud, donde los efectos beneficiosos persisten largo tiempo tras el término de la infusión. Esto último ha sido atribuido a un efecto citoprotector cuya naturaleza continúa sin ser esclarecida (43).

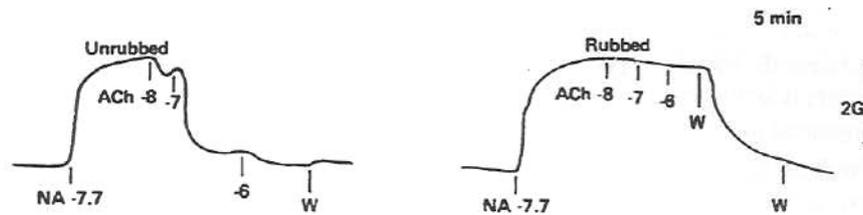
Es posible que la prostaciclina pueda ser útil en el tratamiento del accidente cerebrovascular. Se necesita, sin embargo, un mayor número de ensayos

clínicos para establecer definitivamente su eficacia (44). Es posible que los futuros análogos de la prostaciclina con actividad selectiva antiplaquetaria, puedan ser eficaces en el tratamiento de la enfermedad coronaria inestable, ya sean solos o en combinación con otras terapias (45). Los datos clínicos son limitados en lo que concierne a los efectos beneficiosos de la prostaciclina o sus análogos en la hemodinámica de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (46).

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

DEL FACTOR RELAJANTE DE ORIGEN ENDOTELIAL (EDRF) AL ÓXIDO NÍTRICO: EL SISTEMA VASCULAR

En 1980, mientras le dábamos los toques finales a nuestro descubrimiento de la prostaciclina, Furchgott y Zawadzki publicaron un artículo en el que demostraban que el endotelio vascular era necesario para la acción vasorelajante de ciertos vasodilatadores (48, fig. 9). Ellos denominaron a este fenómeno relajación vascular dependiente del endotelio, y además demostraron que dicha relajación dependía de la liberación de una substancia inestable, conocida posteriormente como factor relajante derivado del endotelio (endothelium-derived relaxing factor EDRF). La existencia de este fenómeno fue confirmada posteriormente por diversos grupos, esclareciéndose algunos de los aspectos de la acción de este misterioso compuesto (véase 49-52) Se encontró que el EDRF produce relajación vascular por activación de la enzima soluble guanilato ciclasa en las células del músculo liso vascular (53). Dos compuestos que inhiben dicha enzima, azul de metileno y hemoglobina, también inhiben los efectos del EDRF (54), el que mostraba una extraordinaria inestabilidad, con una vida media de 3-5 segundos (55, 56).



NA = noradrenaline

W = washout

Dotes ACh Expresssd as log of cumulative molar concentrations.

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

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

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

Richard Gryglewski, que nos visitaba con motivo de su año sabático y con Richard Palmer.

Decidimos desarrollar un bioensayo que fuera capaz de generar cantidades considerables de EDRF con el fin de poder llevar a cabo estudios farmacológicos detallados y, con suerte, esclarecer su estructura. En vez de utilizar anillos vasculares en baño de órganos,

como hacían otros investigadores, nosotros recurrimos una vez más al bioensayo en cascada como sistema detector, empleando células endoteliales cultivadas sobre microtransportadores como sistema generador (fig. 10). Los experimentos iniciales, confirmaron la posibilidad de llevar a cabo un bioensayo simultáneo de prostaciclina y

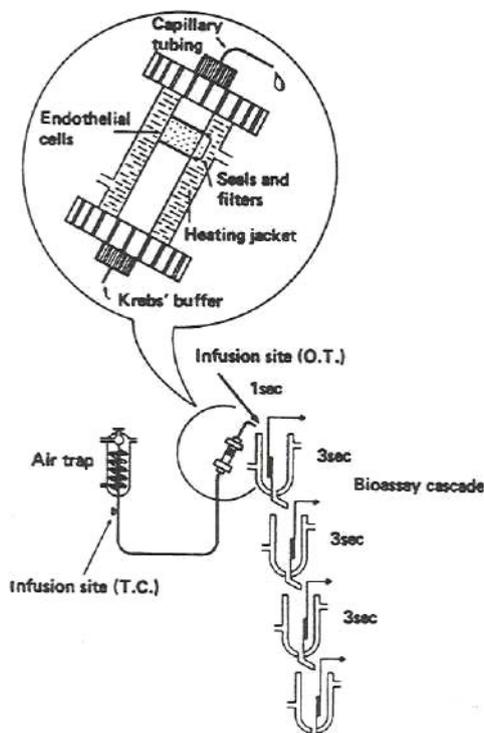


FIG. 10.—Representación esquemática de la cascada de bioensayo y de la columna con las células endoteliales. Los tejidos utilizados fueron tiras espirales de arteria coronaria bovina, celiáca o mesentérica de conejo, y aorta torácica de conejo. El retraso entre cada tejido en la cascada fue de 3 segundos.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

EDRF (57). Con posterioridad adoptamos una cascada consistente en tres tiras de aorta de conejo desprovistas de endotelio, ya que éste es un tejido carente de respuesta a la prostaciclina, pero se relaja muy eficientemente con EDRF. Estos estudios demostraron que el EDRF se generaba en gran cantidad dependiendo del número de células endoteliales en los microtransportadores. Además, constatamos que al menos parte de la inestabilidad del EDRF en la cascada se debía a su interacción con aniones superóxido (O_2^-), ya que el tratamiento con superóxido dismutasa (SOD) incrementaba su vida media (58).

Estaban ya descritos compuestos capaces de inhibir el EDRF; éstos incluían antioxidantes y reactivos con grupos sulfhidrilo, así como inhibidores de fosfolipasa, lipo-oxigenasa de ácido araquidónico y de enzimas dependientes del citocromo P-450. La acción de cada uno de los compuestos había dado origen a una hipótesis diferente sobre la naturaleza del EDRF (55, 59-61). Yo estaba incómodo al observar inhibidores con estructuras y con mecanismos de acción tan diversos. Esto me hizo pensar que debía existir un mecanismo de acción común para todos ellos; sin embargo, dicho mecanismo no resultaba de modo alguno obvio. Investigamos las acciones que éstos ejercían sobre la liberación de EDRF por las células endoteliales, y encontramos que las curvas de inhibición resultaban erráticas. Pensé que esto podría deberse a una interferencia del O_2 y sugerí que determinásemos las curvas de inhibición en presencia de SOD. Para nuestra sorpresa, en estas condiciones todos los

inhibidores perdieron su actividad. El misterio estaba resuelto: el mecanismo común de acción de estos compuestos está basado en sus propiedades redox, por las que son capaces de generar O_2^- , que a su vez destruye el EDRF (62). Con el fin de apoyar nuestra hipótesis, probamos otra sustancia capaz de interactuar con O_2^- como es el citocromo c, el cual se comportó como la SOD. Además, decidimos investigar si un generador de O_2^- aún no conocido previamente como inhibidor de EDRF, podría actuar como tal. Este compuesto -el pirogalol- se comportó como habíamos predicho y sus acciones fueron antagonizadas no sólo por SOD sino también por citocromo c (62). Estos resultados representaron un avance importante en la comprensión de las propiedades del EDRF, pues clarificaron no sólo el mecanismo por el cual estos compuestos actúan como inhibidores de la acción de esta sustancia, sino también sus diferencias con la hemoglobina, que se comporta como inhibidor atrapando EDRF directamente (63).

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

Decidimos investigar si el EDRF era realmente NO y, si éste era el caso, averiguar si el NO satisfacía los criterios establecidos en los años 30 por Henry Dale para la identificación de un mediador biológico. Decidimos abordar el problema de dos maneras: primero estudiando la farmacología comparativa del auténtico gas NO y el EDRF y, en segundo lugar, intentando desarrollar una forma de medir la liberación de NO por las células endoteliales vasculares. En vez de emplear nitrito acidificado (NO⁺) que da origen a la formación de NO de manera impredecible y difícil de cuantificar, Richard Palmer y yo decidimos emplear NO gas, obtenido comercialmente. Para ello se requería desarrollar un modo de diluir NO en agua deoxigenada para evitar la formación de NO₂⁺.

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

El origen bioquímico del NO continuaba siendo un misterio. Intentamos estimular a las células endoteliales para generar NO a partir de diferentes

posibles precursores, que incluían nitrito (NO₂-), nitrato (NO⁺, amoníaco y varios aminoácidos, pero todos nuestros esfuerzos resultaron en vano. Por casualidad, sin embargo, nos encontramos con

artículos de John Hibbs y de Michael Marletta y sus colegas en los que describían en macrófagos activados la formación de NO₂ - y NO₃ - a partir de L-arginina (67, 68). Ello nos instó a intentar, sin

éxito, "alimentar" las células endoteliales con L-arginina para que produjeran NO. Unas semanas más tarde, mientras considerábamos nuestro fracaso, advertimos que era posible que la L-arginina presente en el medio de cultivo estuviera "inundando" el

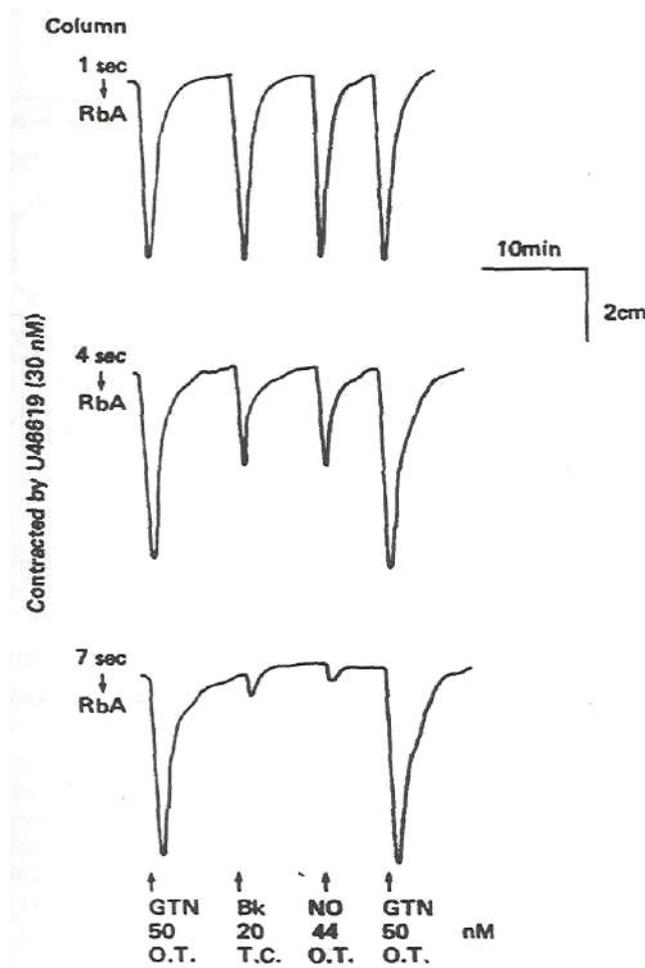


FIG. 11.—Relajación de la aorta de conejo inducida por el factor relajante derivado de endotelio (EDRF) y óxido nítrico (NO). Una columna empaquetada con células endoteliales cultivadas en microtransportadores (véase figura 10) fue perfundida con Krebs-buffer (5 ml/min.)- El efluente se utilizó para superfundir tres tiras aórticas de conejo (RbA) desprovistas de endotelio, en una cascada. Los tejidos fueron contraídos en forma submáxima, mediante una infusión continua de 9-ll-dideoxi-9a, lia metano epoxi-prostaglandina F (U46619; 30 nM) y se colocaron separados de las células por 1, 4 y 7 segundos de retraso respectivamente. La sensibilidad del bioensayo fue estandarizada por la administración de trinitroglicerina (GTN; 50 nM) sobre los tejidos (O.T.). EDRF fue liberado de las células mediante la infusión de bradiquinina (Bk, 20 nM) durante 1 min. a través de la columna (T.C). NO (0.22 nmol) fue disuelto en agua deoxigenada con helio y administrado como infusión durante 1 min. Figura tomada de la referencia 66.

sistema. Por lo tanto, decidimos cultivar a las células en un medio libre de L-arginina durante 24 horas antes de la realización del experimento. Ello nos permitió desentrañar el problema puesto que, en estas condiciones, era posible aumentar la formación de NO

por las células, proporcionándoles L-arginina. Estos experimentos, junto con otros más sofisticados en los que utilizamos L-arginina marcada y espectrometría de masa, mostraron que el NO se sintetiza a partir de los átomos de nitrógeno guanidino presente en

la L-arginina (69), y que la citrulina es otro producto de esta reacción (fig. 12). La enzima responsable de esta conversión fue denominada NO sintasa, y caracterizada parcialmente por nuestro grupo, encontrándose ser constitutiva, dependiente de NADPH y Ca^{2+} (70).

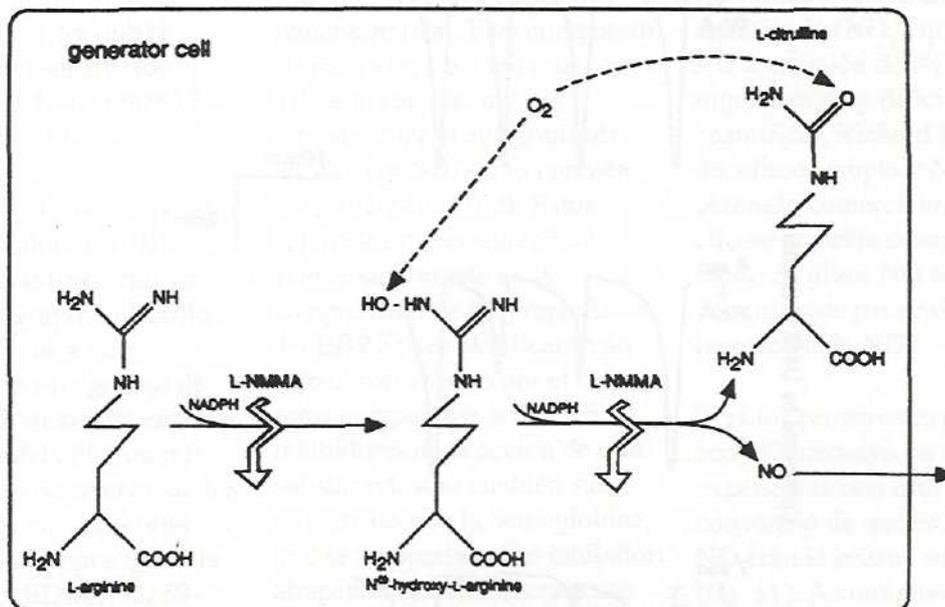


FIG. 12.—Síntesis de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina. N $^\omega$ -hidroxi-L-arginina es un producto intermedio inestable, L-citrulina se forma como coproducto. La reacción requiere NADPH y oxígeno molecular y es inhibida por N $^\omega$ monometil-L-arginina (L-NMMA). El NO, una vez formado,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

Otro hallazgo adicional de trascendencia fue la evaluación de N $^\omega$ -monometil-L-arginina (L-NMMA) como inhibidor de la síntesis de NO. Este análogo de la L-arginina había sido empleado previamente por John Hibbs y sus colaboradores para inhibir la conversión de L-arginina a NO $_2$ y NO $_3$ en

macrófagos activados (68). En nuestros ensayos demostró ser un inhibidor eficaz y selectivo, tanto de la generación de NO por las células endoteliales en cultivo, como de la relajación dependiente de endotelio en anillos de aorta de conejo (64). Aún más, producía una contracción en el anillo vascular,

que era endotelio-dependiente y proporcional a la concentración, indicando que no sólo inhibía la producción basal de NO sino que este NO era responsable del mantenimiento de un tono vasodilatador en el tejido (71). Además, observamos que la L-arginina revertía, en una forma dosis-dependiente, el efecto del inhibidor (fig. 13)

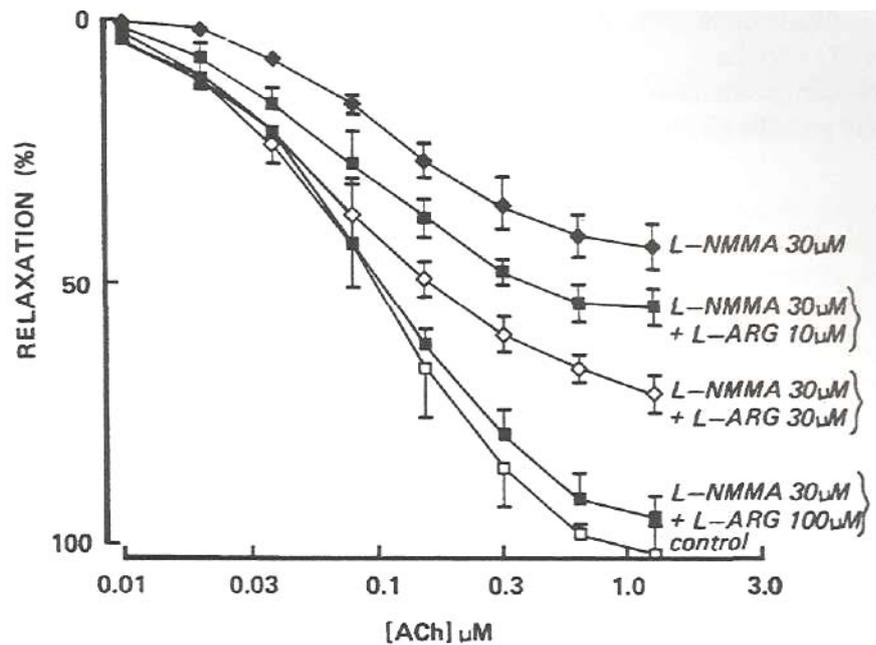


FIG. 13.—Reversión por L-arginina (L-Arg) del efecto inhibitorio de N⁰ monometil-L-arginina (L-NMMA) sobre la relajación inducida por acetilcolina (ACh) en cilindros aórticos desprovistos de endotelio. Cada punto es la media de tres experimentos. Figura tomada en la referencia 71.

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

El hallazgo principal de esta serie de experimentos fue realizado unos meses más tarde cuando estudiamos el efecto de L-NMMA en la presión arterial de conejos anestesiados. En este modelo constatamos que la inhibición de la síntesis de NO conduce a una respuesta hipertensiva prolongada que, interesantemente, se revertía al inyectar L-arginina por vía intravenosa (fig. 14, 74). Puesto que L-NMMA no posee actividad vasoconstrictora directa, ello sugería que, en el sistema vascular, existe un tono vasodilatador que es dependiente de NO. Posteriormente demostramos que L-NMMA causa vasoconstricción marcada en todos los lechos vasculares examinados, incluyendo el antebrazo humano (75); además,

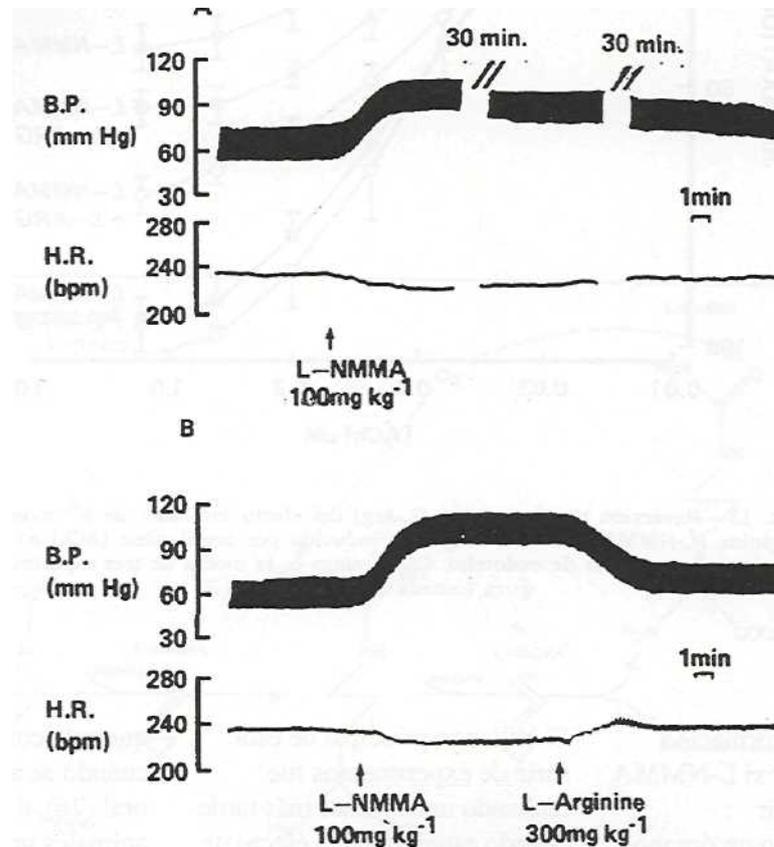
que este compuesto es activo cuando se administra por vía oral (76), e induce en los animales una hipertensión significativa durante el tiempo que es ingerido (77). Todos estos resultados han sido confirmados por muchos laboratorios alrededor del mundo y constituyen la base de nuestra propuesta que, en el sistema vascular, hay un tono fisiológico vasodilatador dependiente del NO sobre el cual actúan influencias vasoconstrictoras (78).

El descubrimiento de este tono vasodilatador dependiente de NO también desentrañó la existencia de un sistema nitrovasodilatador endógeno cuyas acciones son imitadas por compuestos tales como el trinitrato de glicerina y el

nitroprusiato sódico, sustancias conocidas hace mucho por su eficacia clínica (78) y que actúan como resultado de su conversión en NO (79). La reacción del NO con el átomo de Fe 2+ exponente presente en el

grupo prostético hemo de la guanilato-ciclasa soluble, produce un incremento de más de 50 veces en la velocidad de síntesis de GMP cíclico, lo que origina la relajación vascular (80).

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



From Rees, Palmer and Moneada, Proa Nati. Acad. Sci7. USA. 1989.86, 3375-3378.

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

prostaciclina que actúa incrementando la concentración de AMP cíclico. A diferencia de ésta, el NO es también un potente inhibidor de la adhesión plaquetaria. Aún más, las plaquetas son capaces de sintetizar NO, y la vía L-arginina: NO constituye un

mecanismo de retroalimentación negativo que regula la activación plaquetaria (81). Por tanto, es probable que *in vivo* la agregación plaquetaria esté regulada por el NO intraplaquetario, como también por el NO y la prostaciclina que el endotelio vascular libera.

El NO puede a la vez estar implicado en la regulación de la interacción entre leucocitos y la pared vascular, ya que inhibe la activación leucocitaria *in vitro* (82) e *in vivo* (83). Además, se ha demostrado que el NO modula la proliferación de las células del músculo liso (84).

Por lo tanto, es posible que el NO participe en el control homeostático general del sistema vascular y que alteraciones en su liberación o en sus acciones puedan contribuir a situaciones patológicas tales como hipertensión, vasoespasmo y aterosclerosis

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

La actividad relajante dependiente del endotelio parece también estar disminuida en pacientes con hipertensión esencial (91). En efecto, la respuesta del flujo sanguíneo del antebrazo a L-NMMA, pero no a noradrenalina, está disminuida en pacientes con hipertensión

esencial, lo que hace pensar que un déficit en la síntesis de NO podría contribuir a la génesis de esta patología (92). Por otra parte, el tratamiento con *h*-arginina previene el desarrollo de hipertensión en animales propensos a esta enfermedad (93) y también causa una rápida reducción de la presión sistólica y diastólica cuando se infunde en voluntarios sanos y en pacientes con hipertensión esencial (94, 95). En otros experimentos se ha observado que los vasos sanguíneos de animales diabéticos demuestran una disminución de la relajación dependiente de endotelio, en forma similar a aquellos pacientes sometidos a trasplante de corazón-pulmón por enfermedad pulmonar crónica terminal (véase 96).

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

exhalado por animales y humanos contiene NO endógeno en concentraciones entre 5 y 20 ppb (102).

OXIDO NÍTRICO Y SISTEMA NERVIOSO

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

La publicación de este artículo fue precedida unos meses antes por la descripción de John Garthwaite y su grupo de la liberación de una sustancia con propiedades de EDRF a partir de células de cerebelo

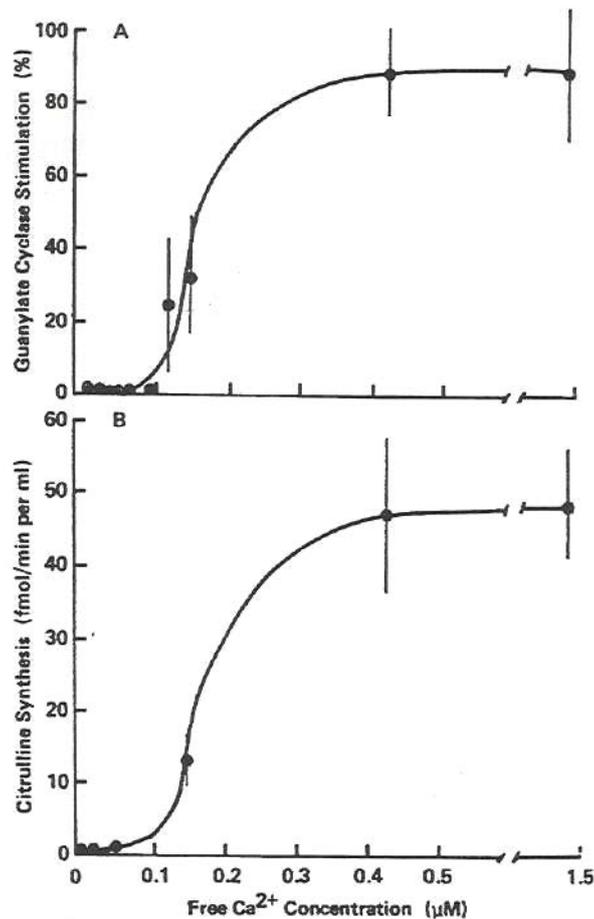


Fig. 15.—Dependencia de calcio (Ca^{2+}) para la síntesis de NO y citrulina a partir de L-arginina en citosol sinaptosómico de rata. La velocidad de síntesis de NO a partir de 100 μM de L-arginina, a diferentes concentraciones de calcio libre. La formación de NO fue determinada por la estimulación de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

de rata cuando éstas eran estimuladas con N-metil-D-aspartato (NMDA), agonista para un subtipo de receptor de glutamato (107). Posteriormente se demostró que el incremento de los niveles de GMP cíclico que resultan de la estimulación del receptor de NMDA, son potenciados por L-arginina y antagonizados por L-NMMA y otros inhibidores de la NO sintasa. De este modo, se ponía en evidencia que, efectivamente, el NO es el mecanismo de transducción de la activación

inducida por la estimulación del receptor de glutamato (véase 50, 108). Todo esto nos condujo a formular la hipótesis de que la generación de NO a partir de L-arginina es un mecanismo general para la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (50).

Desde entonces, este campo de investigación ha florecido. Se ha detectado la actividad de la NO sintasa, en cantidades variables, en todas las áreas del cerebro examinadas, hallándose la actividad máxima en cerebelo y bulbo olfatorio (véase 109,

110). Utilizando anticuerpos específicos anti-NO sintasa de cerebro de rata, se ha estudiado la distribución de esta enzima en diversos tejidos animales mediante técnicas inmunohistoquímicas, poniéndose de manifiesto que dicha actividad está ampliamente distribuida (111). Así, se ha demostrado que en cerebro humano, la NO sintasa se halla presente en corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo, cerebelo, bulbo raquídeo y médula espinal, localizándose principalmente en

neuronas (112). Más recientemente, hemos realizado un estudio sistemático de inmunohistoquímica en el cerebro de la rata que demuestra en detalle la distribución muy amplia de la NO sintasa (113).

Progresivamente se ha acumulado evidencia que sugiere que el NO juega un papel en la formación de memoria (114-117). Datos obtenidos *in vitro* indican que, tras estimulación específica del receptor de glutamato, el NO es liberado de una fuente postsináptica para actuar presinápticamente en una o probablemente más neuronas. Ello conduce a un aumento de la liberación de glutamato y, como resultado, a una elevación estable de la transmisión sináptica, fenómeno conocido como potenciación a largo plazo, que se cree implicado en la formación de memoria (118). Experimentos realizados con animales parecen apoyar la idea de que el NO desempeña un papel en la memoria puesto que han demostrado que la inhibición de la síntesis de NO *in vivo* altera el aprendizaje (U9).

Es posible que el NO tenga un papel fisiológico en la regulación de la circulación cerebral (120,121). Efectivamente el NO puede ser el factor, por tanto tiempo buscado, que conecta la actividad neuronal con aumentos locales en el flujo sanguíneo (122). Otras funciones en las que se ha propuesto un papel para el NO generado en el sistema nervioso central incluyen el comportamiento alimentario (123), la hiperalgesia (124) y la tolerancia a la morfina (125).

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

La actividad enzimática NO sintasa copurifica a homogeneidad con la actividad NADPH dióxido reductasa (132), una enzima que se halla presente en aproximadamente el 2 por 100 del total de las neuronas de la corteza cerebral. Esta localización se corresponde en el cerebro como también en el sistema nervioso periférico (133). Se sabe que las neuronas que contienen esta enzima son resistentes a sufrir degeneración en procesos tales como el ataque cerebral isquémico, corea de Huntington o la enfermedad de

Alzheimer, así como en modelos experimentales de isquemia. Ello hace pensar que las neuronas con capacidad de liberar NO son resistentes a las acciones citotóxicas de éste. Si éste fuera el caso, esta observación puede proveer importantes pistas para la comprensión de la fisiopatología de diversos desórdenes neurodegenerativos.

Ciertas células del sistema nervioso central, tales como las células de microglía, pertenecientes a la estirpe de los monocitos/macrófagos, pueden expresar la forma inducible de la NO sintasa (134). Está demostrado que la microglía activada produce cantidades de NO suficientes para matar neuronas cerebrales en cocultivo (135). La microglía ha sido implicada en la patogénesis de un buen número de enfermedades que incluyen la esclerosis múltiple, las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson y la demencia asociada al SIDA.

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

En el tracto gastrointestinal, el NO parece ser responsable de las relajaciones mediadas por estimulación NANC del fondo gástrico de la rata (139) y de la relajación adaptativa del estómago en respuesta a la presión intragástrica (140). Puede a la vez estar involucrado en la inhibición NANC del

esfínter esofágico inferior (141), la función motora del esfínter de Oddi (142) y la regulación de la motilidad de la vesícula biliar (143). La estimulación de nervios NANC presentes en la unión ileocolónica canina libera un factor con las características del NO (144). Los inhibidores de la NO sintasa reducen la relajación NANC en la *taenia coli* (145) y en el músculo del esfínter interno anal humano (146). En el colon humano la inmunotinción con antisuero anti-NO sintasa del cerebro de rata ha demostrado la presencia de la enzima constitutiva en los plexos mientéricos y submucosos, tanto en los cuerpos neuronales como en sus fibras (112). Un trabajo en el

cual se estudió la distribución histoquímica de la NADPH diaforasa en biopsias obtenidas de niños con estenosis pilórica hipertrófica, sugiere que la carencia de NO sintasa en el tejido pilórico puede ser la responsable del espasmo pilórico característico de esta alteración (147). Nosotros hemos demostrado recientemente usando anticuerpos específicos anti-NO sintasa que en los plexos mientéricos de pacientes con acalasia tampoco hay NO sintasa (148).

Merece la pena destacar que en algunas de estas preparaciones gastrointestinales *in vitro* e *in vivo* (149), la inhibición de la

síntesis de NO desencadena un efecto contráctil (fig. 16), semejante al aumento de la presión arterial que se observa a inhibir la NO sintasa en el sistema vascular. Este hecho sugiere que en ambos sistemas existe un tono dilatador dependiente de NO que es crucial para su función fisiológica y que proporciona una base sobre la cual actúan las influencias contráctiles.

La vía L-arginina: NO desempeña un papel fundamental en la relajación del cuerpo cavernoso humano (150). La relajación provocada por la estimulación eléctrica de estos tejidos *in vitro*, se

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

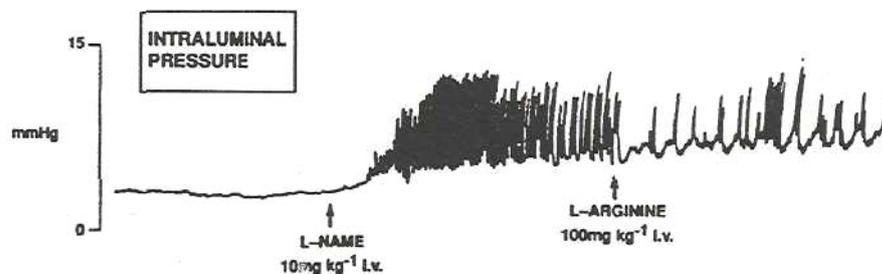


FIG. 16.—Efecto de la administración de N^o-nitro-L-arginina, metil-éster (L-NAME), sobre la presión intraluminal en yeyuno de rata anestesiada. El incremento de la presión y contracción muscular inducida por L-NAME (10 mg/kg i.v.) es reducido por L-arginina (100 mg/kg i.v.). Figura tomada de la referencia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

previene con inhibidores de la NO sintasa y se imita con donadores de NO (150-152). Asimismo, se ha encontrado evidencia inmunohistoquímica de la presencia de NO sintasa en nervios del pene de rata, perro y

hombre. La enzima se ubica en neuronas del pene que inervan el cuerpo cavernoso y en plexos neuronales de la capa adventicia de las arterias del pene (152). Dosis pequeñas de NG-nitro-L-arginina, otro inhibidor de la

síntesis de NO, inhiben la erección del pene inducida por estimulación eléctrica en la rata (153). En suma, estos datos demuestran que el NO es el mediador común final de la erección del pene.

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

Recientemente se ha demostrado que el NO contribuye a la relajación inducida por estimulación NANC del músculo traqueal de cobayo (154) y humano (155). Más aún, la inhibición de la síntesis de NO en ratas induce hiperactividad de la vejiga (156).

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

OXIDO NÍTRICO Y EL SISTEMA INMUNE

Otra vertiente contribuyó al descubrimiento del NO. Esta comienza en 1916, al encontrarse que los mamíferos, incluyendo el hombre, excretan NO_3^- en la orina y que el origen de éste es endógeno (157). En principio se creyó que la generación de NO_3^- se trataba de un sub-producto del metabolismo de la flora intestinal; pero en 1981, Steven Tannenbaum y sus

colaboradores demostraron, empleando ratas libres de gérmenes, que el NO_3^- era de origen mamífero (158). Posteriormente Mike Marletta y Dennis Stuehr constataron que los niveles sanguíneos y la excreción urinaria de NO_3^- se elevan tras la exposición a lipopolisacárido (LPS) bacteriano (67) y que macrófagos de peritoneo de ratón activados con LPS e interferón- γ sintetizan NO_2 y NO_3^- (159). Casi simultáneamente, John Hibbs demostró que los macrófagos activados ejercían una acción citotóxica contra células tumorales y que ésta dependía de la presencia de L-arginina (160). Se demostró además que L-arginina era transformada a L-citrulina, y que L-NNMA inhibía esta conversión, a la vez que prevenía las acciones citotóxicas de los macrófagos (68). Puesto que NO_2 y NO_3^- no tienen propiedades citotóxicas, nosotros propusimos que el NO debía ser el compuesto citotóxico generado por los macrófagos activados (50). Esto fue demostrado más tarde por tres grupos independientes (161-163).

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

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

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

La inducción de la NO sintasa en el endotelio vascular y en las células del músculo liso posee

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

Las sintasas de NO constituyen una familia de isoenzimas que contienen el grupo hemo y requieren múltiples cofactores para su actividad, por lo tanto poseen dominios de unión a cofactores de óxido-reducción (ver 173). Hasta ahora, estas enzimas se han purificado a partir de varias fuentes, incluyendo el cerebelo humano (174). Los genes para las enzimas constitutivas de cerebro (175), y de endotelio vascular (176), además de la forma inducible de macrófagos (177) han sido clonados y secuenciados. Las enzimas constitutivas de diferentes tejidos poseen pesos moleculares semejantes, que varían desde 135 kDa para la enzima endotelial hasta 155 kDa para la enzima neuronal. Las enzimas nativas son un homodímero de tales sub-unidades (178). La sub-unidad de la enzima inducible de macrófago posee un peso molecular de 130 kDa, cercano a aquél de la enzima endotelial constitutiva. Si bien la secuencia peptídica de las enzimas constitutivas del cerebro de mamíferos presenta grandes

similitudes (aprox. 90%), sólo existe un 60% de homología entre las enzimas constitutivas procedentes de cerebro de rata y células endoteliales bovinas. Es interesante notar la homología existente (36% de secuencia idéntica) entre la citocromo P-450 reductasa y diferentes NO sintasas (para referencia, ver 177). Aún más, la NO sintasa endotelial, pero no la neuronal ni la de macrófagos, contiene una secuencia de consenso para la miristoilación del aminoácido terminal, lo que puede explicar que una alta proporción de la forma endotelial esté asociada a la membrana (175, 177).

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

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

La clasificación actual de las NO sintasas se ha basado en el hecho de que las enzimas de cerebro y de endotelio son constitutivas y activadas por Ca^{2+} /calmodulina mientras que las isoforma de macrófagos es

inducible e independiente de Ca^{2+} . Sin embargo, recientemente se ha encontrado que las tres formas poseen secuencias para la fijación de calmodulina (175-177), y que existe calmodulina unida fuertemente a la enzima inducible del macrófago (180). Además, en el intestino de ratas se induce una NO sintasa también dependiente de Ca^{2+} tras el tratamiento con endotoxina (181) el L-I induce una NO sintasa también dependiente de Ca^{2+} en condrocitos de conejo (182). Por otro lado, la expresión de la enzima constitutiva puede ser inducida en diversos tejidos por estrógeno (183), y en el cerebro tras el tratamiento con cloruro de litio y tacrina (184). En suma, hay una mayor variedad de isoenzimas de lo que se había supuesto inicialmente, y en el futuro se necesitará una clasificación más exhaustiva.

El hecho de que el NO, un simple gas resultado de la combinación de los dos gases más comunes en la atmósfera, desempeñe el papel de un importante mediador biológico nos hizo pensar que su aparición en el reino animal debía tener un origen evolutivo muy temprano (166). Así, encontramos que el congriero herradura (*Limulus polyphemus*), una especie cuya existencia alcanza 500 millones de años, sintetiza NO a partir de L-arginina con el fin de evitar la agregación de hemocitos en circulación (185; fig. 17). Posteriormente, se ha demostrado que un insecto *hemófa.go, Rhodnius prolixus*, inyecta NO unido a Fe^{3+} en la sangre de su presa para

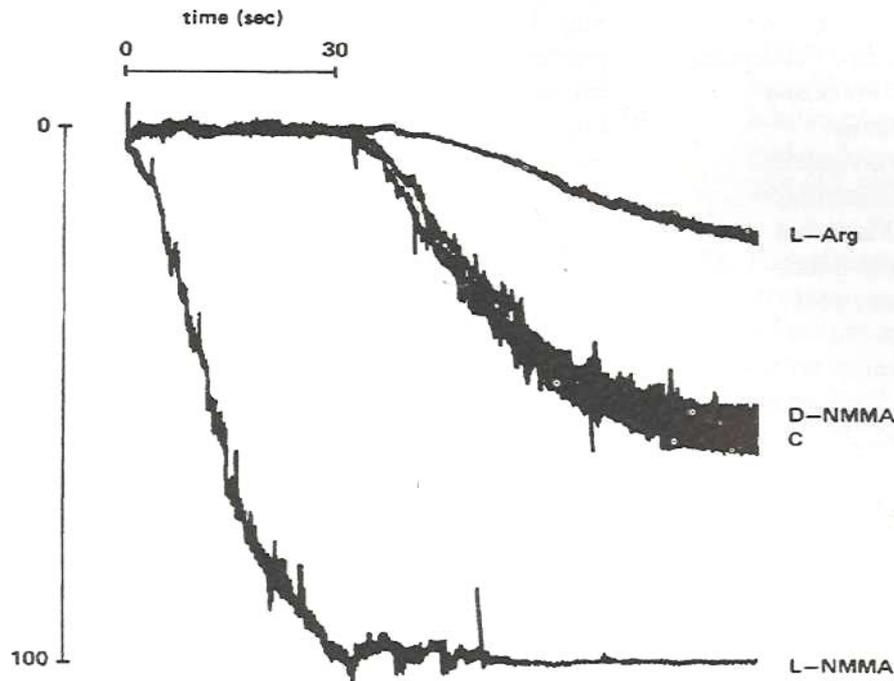


FIG. 17.—Efecto de L-arginina (L-arg) y N¹monometil-L-arginina (L-NMMA) sobre la agregación ex vivo de hemocitos del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). La agregación de hemocitos control (c) tiene lugar con un retardo de aproximadamente 30 segundos y alcanza 72 ± 11 por 10p de la máxima transmisión de luz. Este valor no fue significativamente diferente del obtenido en muestras de cangrejos tratados con D-NMMA, el isómero inactivo de L-NMMA ($66 \pm 12\%$ $p > 0.05$; $n = 3$). Sin embargo, la agregación de hemocitos procedentes de cangrejos tratados con L-NMMA, apareció inmediatamente y fue máxima. Por el contrario, hemocitos obtenidos de cangrejos tratados con L-arg. mostraron una agregación disminuida ($19 \pm 11\%$ $n = 3$). Figura tomada de la referencia 185.

para producir vasodilatación, inhibir la agregación plaquetaria y facilitar la aspiración de sangre (186), y que la estrella de mar, un equinodermo, se vale del NO como mediador neuronal de su motilidad intestinal (187). Todos estos datos sugieren que la vía L-arginina: NO es un sistema primitivo pero altamente funcional, que ha sido mantenido a través de la evolución del reino animal como señal de comunicación celular.

Quisiera concluir diciendo que los últimos veinte años han sido inmensamente estimulantes en relación a lo que denomino "casualidad, diseño,

casualidad". Hemos tropezado con hallazgos que han constituido la base de desarrollos lógicos, sólo para volver a tropezar con lo inesperado. Si alguna guía he observado, ha sido la de mantener una visión amplia mientras analizamos sistemáticamente las hipótesis que constantemente lanzamos como redes. Así, hemos obtenido información acerca de una diminuta parcela de realidad previamente desconocida.

El rasgo más distintivo de todo este proceso ha sido la interacción humana y la manera en la cual tanta gente ha

contribuido en forma positiva. De mis primeros días de formación en la Facultad de Medicina de El Salvador puedo distinguir la clara influencia de muchos, sobre todo la de María Isabel Rodríguez y Augusto Campos. De mis días en el Colegio Real de Cirujanos, tanto John Vane como Sergio Ferreria fueron una importante influencia. Durante los últimos 15 años, cuatro personas han contribuido en gran medida a mi investigación: Richard Palmer, Marek Radomski, Gillian Henderson y Annie Higgs. Quisiera también expresar mi agradecimiento al apoyo y colaboración que me han

brindado mis colegas y estudiantes de España, entre ellos: Pedro Lorenzo Velázquez, Juan Esplugues, Francisco Guarner, José Ramón Berrazueta, María Angeles Moro, Ignacio Lizasoain, Eduardo Nava, Marisabel Mourelle, Eduardo Salas, Alfredo Martínez y José Rodrigo.

He dicho.

BIBLIOGRAFÍA

1. Helme TA. Contributions to the physiology of the uterus and the physiological action of drugs upon it. *Reports of the Laboratory of the Royal College of Physicians*, Edinburgh, 1891; 111,70-105.
2. Gaddum JH. The technique of superfusion. *Brit. J. Pharmacol* 1953; 8, 321-326.
3. Vane JR. The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood.. *Brit J. Pharmacol* 1964; 23, 360-373.
4. Vane JR. Adventures and excursions in bioassay: the stepping stones to prostacyclin, 1983 *Les Prix Nobel en 1982*. The Nobel Foundation 181-206.
5. Moneada S, Flower RJ, Vane JR. Prostaglandins, prostacyclin, and thromboxane A₂ *In The Pharmacological basis of therapeutics*, eds. L.S. Goodman and A. Gilman. MacMillan Publishing Co. Inc. New York, 6th edition 1980; 668-681
6. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs *Nature* 1971; 231, 232- 235.
7. Ferreira SH, Moneada S, Vane JR. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen *Nature* 1971; 231, 237-239.
8. Smith JB, Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets *Nature* 1971; 231, 235-237.
- 9 Ferreira SH, Moneada S, Vane JR. Some effects of inhibiting endogenous prostaglandin formation on the responses of the cat spleen. *Br. J. Pharmacol* 1973; 47, 48-58
10. Ferreira SH, Moneada S, Vane JR. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *Br. J. Pharmacol.* 1973; 49, 86-97.
11. Ferreira SH, Moneada S, Vane JR. Prostaglandins and the signs and symptoms of inflammation. In *Prostaglandin synthetase Inhibitors*, eds. H. J. Robinson and J.R. Vane, Raven Press, New York, 1974; 175-187.
12. Moneada S. Inhibition by aspirin-like drugs of prostaglandin release in the spleen and its effects on the functioning of efferent nerve fibres.. *Doctoral Thesis*, University of London, 1974.
13. Moneadas, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin *Pharmacological Reviews* 1979; 30, 293-331.
14. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Atare* 1994; 367, 243-249.
15. Xie W, Robertson DL, Simmon DL. Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Devel Res* 1992; 25, 249-265.

Esta artículo fue originalmente publicado en los ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA, TOMO CXI CUADERNO CUARTO, MADRID, 1994

Publicado con la aprobación escrita de la Real Academia de Medicina de España

16. Singer R. Acetylsalicylic acid, a probable cause for secondary post-tonsillectomy hemorrhage. *Arch. Otolaryng* 1945; 42, 19-20.
17. Piper PJ, Vane JR. Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Nature* 1969; 223, 29-35.
18. Willis AL, Vane FM, Kuhn DC, Scott CG, Petrin M. An endoperoxide aggregator (LASS) formed in platelets in response to thrombotic stimuli. *Prostaglandins* 1974; 8, 453-507.
19. Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T, Samuelsson B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1974; 71, 345-349.
20. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1974, 71, 3824-3828.
21. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975; 72, 2994-2998.
22. Needleman P, Moneada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, Samuelsson B. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature* 1976; 261, 558-560.
23. Moneada S, Bunting S, Mullane KM, Thorogood P, VANE JR, Raz A, Needleman P. Imidazole: A selective potent antagonist of thromboxane synthetase. *Prostaglandins* 1977; 13, 611-618.
24. Morrison FS, Baldini MG. Antigenic relationship between blood platelets and vascular endothelium. *Blood* 1969 33, 46-57.
25. Moneada S, Needleman P, Bunting S, Vane JR. Prostaglandin endoperoxides and thromboxane generating systems and their selective inhibition. *Prostaglandins* 1976; 12, 323-325.
26. Bunting S, Moneada S, Vane JR. The effects of prostaglandin endoperoxides and thromboxane A₂ on strips of rabbit coeliac artery and certain other smooth muscle preparations. *Br. J. Pharmacol* 1976; 57, 462P-463P.
27. Moneada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263, 663-665.
28. Pace-Asciak C. Isolation, structure and biosynthesis of 6-keto prostaglandin F_{1a} in the rat stomach. *J. Am. Chem. Soc* 1976; 98, 2348-2349.
29. Johnson RA, Morton DR, Kinner JH, Gorman RR, McGuire JR, Sun FF, Whittaker N, Bunting S, Salmón JA, Moneada S, Vane JR. The chemical structure of prostaglandin X (prostaglandin) *Prostaglandins* 1976; 12, 915-928.
30. Burch JW, Stanford N, Majerus PW. Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin. *J. Clin. Invest.* 1978; 61, 314-319.
31. Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J. Clin. Invest* 1975; 56, 624-632.
32. Roth GJ, Siok CJ. Acetylation of the NH₂-terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin. *J. Biol. Chem.* 1978; 253, 3782-3784.
33. Marcus AJ. The role of lipids in platelet function with particular reference to

- the arachidonic acid pathway. *J. Lipid Res.* 1978; 19,793-826.
34. Baenziger NL, Dillender MJ, Majerus PW. Cultured human skin fibroblasts and arterial cells produce a labile platelet-inhibitory prostaglandin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977; 78, 294-301.
 35. Amezcua JL, Parsons M, Moneada S. Unstable metabolites of arachidonic acid, aspirin and the formation of the haemostatic plug. *Thromb. Res.* 1978; 13,477-488.
 36. O'Grady J, Moneada S. Aspirin: A paradoxical effect on bleeding time. *Lancet* 1978; ii, 780.
 37. Pedersen AK, Fitzgerald GA. Dose-related kinetics of aspirin. *N.Eng.J.Med.* 1984; 311, 1206-1211.
 38. Patrono C. Aspirin and human platelets: from clinical trials to acetylation of cyclooxygenase and back. *Trends Pharmacol. Sci.* 1989; 10,453-458.
 39. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy. I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br. Med.J.* 1994; 308, 81-106.
 40. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy. II: Maintenance of vascular graft or arterial patency by antiplatelet therapy. *Br. Med.J.* 1994; 308, 159-168.
 41. Gimson AES, Martin JF, GREAVES M. Prostaglandins in liver disease, organ transplantation and extracorporeal circulation. In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 251-264.
 42. Sinzinger H. Prostaglandins in ischaemic peripheral vascular disease. In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 209-218.
 43. Beích JFF. Prostaglandins in Raynaud's phenomenon. In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 219-239.
 44. Gryglewski RJ. Prostanoids in cerebral ischaemia and stroke. In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 240-250.
 45. Wennmalm A. Prostaglandins in myocardial infarction and angina. In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 160-174.
 46. Cooper CL, Crow JW, Wheeler WS, Long WA. Prostaglandins in congestive heart failure". In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 187-197.
 47. Butt AY, Higenbottam TW, Wallwork J. Prostaglandins and primary pulmonary hypertension. In *Therapeutic applications of prostaglandins*, eds. J. Vane and J. O'Grady, Edward Arnold, London, 1993; 198-208.
 48. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288, 373-376.
 49. Furchgott RF. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol. Scand.* 1990; 139,257-270.
 50. Moneada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communica-

- tion. *Biochem. Pharmacol.* 1989;38, 1709-1715.
51. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. *Hipertensión* 1989; 13, 658-667.
 52. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol* 1990; 30, 535-560.
 53. Rapoport RM, Murad F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP'. *Circ. Res.*, 1983; 52, 352-357.
 54. Martin W, Villani GM, Jpthianandan, D. Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1985; 232,708-716.
 55. Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. The nature of endothelium derived vascular relaxant factor.. *Nature* 1984; 308, 645-647
 56. Cocks TM, Angus JA, Campbell JH, Campbell GR. Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture". *J. Cell. Physiol.* 1985; 123,310-320.
 57. Gryglewski RJ, Moneada S, Palmer RMJ. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells". *Br. J. Pharmacol* 1986; 87, 685-694.
 58. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Super-oxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor *Nature* 1986; 320, 454-456.
 59. Singer HA, Peach MJ. Endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. Relaxation stimulated by arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983; 226, 790-795.
 60. Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1984; 24, 175-197.
 61. Pinto A, Abraham NG, Mullane KM. Cytochrome P-450-dependent monooxygenase activity and endothelium-dependent relaxations induced by arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1986; 236, 445-451.
 62. Moneada S, Palmer RMJ, Gryglewski RJ. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 1986; 83, 9164-9168.
 63. Gibson QH, Roughton FJW. The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin. *J. Physiol.* 1957; 136,507-526.
 64. Furchgott, RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acidactivatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In *Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*, ed. by P. M. Vanhoutte, Raven Press New York 1988,401-414.
 65. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In *Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium*, ed. by P.M. Vanhoutte, Raven Press, New York 1988; 427-436.
 66. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived

- relaxing factor. *Nature* 1987; 327, 524-526.
67. Stuehr DJ, Marletta MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon-g. *J. Immunol* 1987; 139, 518-525.
 68. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and imino nitro-gen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235, 473-476.
 69. Palmer RMJ, Ashton DS, Moneada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333, 664-666.
 70. Palmer RMJ, Moneada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1989; 158, 348-352.
 71. Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF, Moneada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol* 1989; 96, 418-424.
 72. Amezcua JL, Dusting GJ, Palmer RMJ, Moneada S.: Acetylcholine induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide, the endogenous nitrovasodilator. *Br. J. Pharmacol* 1988; 95, 830-834.
 73. Amezcua JL, Palmer RMJ, De Souza BM, Moneada S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br. J. Pharmacol* 1989; 97, 1119-1124.
 74. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86, 3375-3378.
 75. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; ii, 997-1000.
 76. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RMJ, Moncada S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of N^G-monomethyl-L-arginine or N^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 101; 10-12.
 77. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RMJ, Moneada S. Persistent haemodynamic changes following prolonged infusions of N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) in conscious rats. In *Nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system*, eds. S. Moneada & E.A. Higgs, Elsevier, Amsterdam, 1990, 489-491.
 78. Moneada S, Palmer RMJ, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988; 12, 365-372.
 79. Feelisch M. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO Solutions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991; 17, S25-S33.
 80. Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.*, 1987; 39, 163-196.
 81. Radomski MW, Moneada S. Biological role of nitric oxide in platelet function. In: *Clinical relevance of nitric oxide in the cardiovascular system*, eds. S. Moneada, E.A. Higgs, J.R. Berra-zueta. Edi-complet S.S., Madrid, 1991, 3-28.
 82. Bath PMW, Hassall DG, Gladwin AM, Palmer RMJ, Martin JF. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium *in vitro*. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1991; 11, 254-260.
 83. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 86, 4651-4655.
 84. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest* 1989; 83, 1774-1777.
 85. Forstermann U. Properties and mechanisms of produc-

- tion and action of endothelium-derived relaxing factor. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 1986;8,S45-S51.
86. Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, Selwyn AP. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 1989; 80, 458-465.
87. Celermajer, DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OJ, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Noninvasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340, 1111-1115.
88. Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients. *Lancet* 1991; 338, 1546-1550.
89. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J. Clin. Invest.* 1992; 90, 1248-1253.
90. Cooke JP, Tsao P. Cellular mechanisms of atherogenesis and the effects of nitric oxide. *Current Opinión in Cardiology* 1992; 7, 799-804.
91. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1990; 322, 22-27.
92. Calver A, Collier J, Moneada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial N(G)-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *Hypertension* 1992; 10, 1025-1031.
93. Chen PY, Sanders PW. L-arginine abolishes salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *Circulation* 1991; 88, 1559-1567.
94. Nakaki T, Hishikawa K, Suzuki H, Saruta T, Kato R. L-arginine-induced hypotension. *Lancet* 1990; 336, 696.
95. Petros AJ, Hewlett AM, Bogle RG, Pearson JD. L-arginine-induced hypotension. *Lancet* 1991; 337, 1044-1045.
96. Moneada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329, 2002-2012.
97. Fratacci MD, Frostell CG, Chen TY, Wain JC, Robinson DR, Zapol WM. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator of heparin-protamine vasoconstriction in sheep. *Anesthesiology* 1991; 75, 990-999.
98. Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991; 83, 2038-2047.
99. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; 338, 1173-1174.
100. Rossaint R, Falke KJ, López F, Slama K, Pisón U, Zapol WM. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328, 399-405.
101. Gerlach H, Pappert D, Lewandowski K, Rossaint R, Falke KJ. Long-term inhalation with evaluated low doses of nitric oxide for selective improvement of oxygenation in patients with adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 1993; 19,443-449.
102. Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moneada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1991; 181, 852-857.
103. Deguchi T, Yoshioka M. Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal-soluble fraction of rat brain. *Biol. Chem.* 1977; 252, 7617-7619.
104. Deguchi T, Yoshioka M. L-arginine identified as an endogenous activator for soluble

- guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 1982; 257, 10147-10152.
105. Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K. Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res. Commun.* 1977; 75, 851-856.
106. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moneada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 1989, 86, 5159-5162.
107. Garthwaite J, Charles SL, Chess Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988; 336, 385-388.
108. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends in Neurosciences* 1991; 14, 60-67.
109. Garthwaite J. Nitric oxide signalling in the nervous system. *The neurosciences* 1993; 5, 171-180.
110. Forstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res. Commun* 1990; 168, 727-732.
111. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347, 768-770.
112. Springall DR, Riveros-Moreno V, Buttery L, Suburo A, Bishop AE, Merrett M, Moneada S, Polak JM. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry*, 1992; 98, 259-266.
113. Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadía Molina F, Riveros-Moreno V, Martínez-Murillo R, Polak JM, Moneada S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philosophical Transactions B. The Royal Society* 1994, 345, 175-221.
114. Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 1991; 349, 326-328.
115. Bohme GA, BonC, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 1991; 199, 379-381.
116. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Test of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88, 11285-11289.
117. Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 1991; 254, 1503-1506.
118. Coolingridge GL, Kehl SJ, McLenna H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 1983; 334, 33k-46.
119. Chapman PF, Atkins CM, Alien MT, Haley JE, Steinmetz JE. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuro Report* 1992; 3, 567-570.
120. Togashi H, Sakuma I, Yoshioka M, Kobayashi T, Yasuda H, Kitabatake A, Saito H, Gross S.S, Levi R.A. Central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 262, 343-347.

121. Toda N, Okamura T. Regulation by nitroxidergic nerve of arterial tone. *News Physiol Sel*, 1992; 7, 148-152.
122. Gally JA, Read P, Montague PR, Reeke Jr GN, Edelman GM. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1990; 87, 3547-3551.
123. Morley JEF, Flood JF. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sciences* 1991; 49, 707-711.
124. McMahon SB, Lewin GR, Wall PD. Central hyperexcitability triggered by noxious inputs. *Current Opinión in Neurowbiol* 1993; 3, 602-610.
125. Kolesnikov YA, Pick CG, Pasternak GW. N^G-nitro-L-arginine prevents morphine tolerance. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 221, 399-400.
126. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88, 6368-6371.
127. Mollace V, Bagetta G, Nistico G. Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. *Neuro Report* 1991; 2, 269-272.
128. Nowicki JP, Duval D, Pognet H, Scatton B. Nitric oxide mediates neuronal death after local cerebral ischemia in mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 1991; 204, 339-340.
129. Sancesario G, Iannone M, D'Angelo V, Nistico G, Bernardi G. N^G-nitro-L-arginine-methyl ester inhibits electrocortical recovery subsequent to transient global brain ischemia in mongolian gerbil. *Funct Neurol* 1992, 7, 123-127.
130. Dawson VL, Dawson TM, Uhl GR, Snyder SH. Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1993; 90, 3256-3259.
131. Koprowski H, Zheng YM, Heber-Katz E, Fraser N, Rorke L, Fu ZF, Hanlon C, Dietzschold B. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1993; 90, 3024-3027.
132. Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1991; 88, 2811-2814.
133. Dawson TM, Bredt DS, Fetuki M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1991; 88, 7797-7801.
134. Zielasek J, Tausch M, Toyka KV, Hartung HP. Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages. *Cellular Immunol.* 1992; 141, 111-120.
135. Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 1992; 587, 250-256.
136. Duarte IDG, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Acetylcholine induces peripheral analgesia by the release of nitric oxide. In *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*, eds. S. Moneada and E. A. Higgs, Elsevier, Amsterdam, 1990; 165-170.
137. Gillespie JS, Liu X, Martin W. The neurotransmitter of the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves to smooth muscle of the genital system. In *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*, eds. S.

- Moneada and E. A. Higgs, Elsevier, Amsterdam, 1990; 147-164.
138. Rand MJ. Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin. Exper. Pharmacol. & Physiol.* 1992; 19, 147-169.
139. Li CG, Rand MJ. Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur. J. Pharmacol.* 1990; 191, 303-309.
- HO. Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* 1991; 351, 477-479.
141. Tottrup A, Svane D, Forman A. Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. *Am. J. Physiol.* 1991; 260, G385-G389.
142. Mourelle M, Guarner F, Moneada S, Malagelada JR. The arginine: nitric oxide pathway relaxes the sphincter of Oddi and modulates its motor activity. *Gastroenterology*, 1993; 105, 1299-1305.
143. Mourelle M, Guarner F, Molero X, Moneada S, Malagelada JR. Regulation of gall bladder motility by the arginine-nitric oxide pathway in guinea pig. *Gut*. 1993; 34, 911-915.
144. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Hermán AG. Nitric oxide as an inhibitory nonadrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345, 346-347.
145. Tam FSF, Hillier K. The role of nitric oxide in mediating non-adrenergic non-cholinergic relaxation in longitudinal muscle of human taenia coli. *Life Sciences* 1992; 51, 1277-1284.
146. Burleigh DE. N(Gexponente)-nitro-L-arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxation of human gut. *Gastroenterology* 1992; 102, 679-683.
147. Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ, De Laet MR. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327, 511-515.
148. Mearin F, Mourelle M, Guarner F, Salas A, Riveros-Moreno V, Moneada S, Malagelada JR. Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastrooesophageal junction. *Eur. J. Clin. Invest.* 1993; 23, 724-728.
149. Calignano A, Whittle BJR, Di Rosa M, Moneada S. Involvement of endogenous nitric oxide in the regulation of rat intestinal motility *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol* 1992; 229, 273-276.
150. Holmquist F, Hediund H, Andersson K. L-NG nitro arginine inhibits non-adrenergic noncholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum. *Acta Physiol. Scand.* 1991; 141, 441-442.
151. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro, LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *N. Eng. J. Med.* 1992; 326, 90-94.
152. Kim, N, Azadzo KM, Goldstein I, De Tejada IS. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J. Clin. Invest* 1991; 88, 112-118.
153. Buraett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TSK, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257, 401-403.
154. UCG, Rand MJ. Evidence that part of the NANC relaxant

- response of guinea-pig trachea to eléctrica! field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol* 1991; 102, 91-94.
155. Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M, Barnes PJ. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans *Eur. J. Pharmacol*, 1992; 210, 221-222.
156. Persson K, Igawa Y, Mattiasson A, Andersson KE. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat lower urinary tract *in vivo* and *in vitro*. *Br. J. Pharmacol* 1992; 107, 178-184.
157. Mitchell HH, Shohle KA, Grindley HS. The origin of the nitrates in the urine. *J. Biol. Chem.* 1916; 24,461-490.
158. Green LC, Tannembaum SR, Goldman R. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 1981; 212,56-58.
159. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1985; 82, 7738-7742.
160. Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *Immunol* 1987; 138,550-565.
161. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988; 27,8706-8711.
162. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1988; 157,87-94.
163. Stuehr D, Gross S, Sakuma I, Levi R, Nathan C. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J. Exp. Med.* 1989; 169, 1011-1020.
164. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Granger DL, Drapier JC, Lancaster JR Jr. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*, eds. S. Moneada and E.A. Higgs, Elsevier, Amsterdam, 1990, 189-223.
165. Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinión in Immunology* 1991; 3, 65-70.
166. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide; physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharm. Revs* 1991; 43, 109-142.
167. Radomski MW, Palmer RMJ, Moneada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1990; 87,10043-10047.
168. Dí Rosa M, Radomski M, Carnuccio R, Moneada S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1990; 172, 1246-1252.
169. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxy radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1990; 87, 1620-1624.
170. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products from Kupffer cells.

- J. Exp. Med.* 1989; 170, 1769-1774.
171. Vallance P, Moneada S. Nitric oxide-from mediator to medicine. / *Royal College of Physicians* 1994; 28, 209-219.
172. Vallance P, Moneada S. The role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horizons* 1993; 1, 77-86.
173. Knowles RG, Moneada S. Nitric oxide synthases in mammals / *izoc/Am y* 1994; 298, 249-258.
174. Schmidt HHHW, Murad R. Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1991; 181, 1372-1377.
175. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351, 714-718.
176. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1992; 89, 6348-6352.
177. Xie Q, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages *Science* 1992; 256, 225-228.
178. Forstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42, 1849-1857. 179. Knowles RG, Moneada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends in Biochemical Science*, 1992; 17, 399-402.
180. Cho JH, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* 1992; 176, 599-604.
181. Salter M, Knowles RG, Moneada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase & s. *FEBS Lett* 1991, 291, 145-149.
182. Palmer RMJ, Andrews T, Foxwell NA, Moneada S. Glucocorticoids do not affect the induction by interleukin-1 of Ca^{2+} -dependent NO synthase in rabbit chondrocytes. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1992; 188, 209-215.
183. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moneada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91, 5212-5216.
184. Bagetta G, Corasaniti MT, Melino G, Paoletti AM, Finazzi-Agro A, Nistico G. Lithium and tacrine increase the expression of nitric oxide synthase mRNA in the hippocampus of rat. *Biochem Biophys. Res. Commun* 1993; 197, 1132-1139.
185. Radomski MW, Martin JF, Moneada S. Synthesis of nitric oxide by the haemocytes of the American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*). *Phil. Trans. R. Soc. Lond B*, 1991; 334, 129-133.
186. Ribeiro JMC, Hazzard JMH, Nussenzveig RH, Champagne DE, Walker FA. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a blood-sucking insect. *Science* 1993; 260, 539-541.
187. Martínez A, Riveros-Moreno V, Polak JM, Moneada S, Sesma P. Nitric oxide (NO) synthase-immunoreactivity in the starfish *Marthastearia glacialis*. *Cell and Tissue Res.* 1994; 275, 599-603.