

Oxido Nítrico, su Importancia en Gastroenterología y Cirugía

Dr. Fernando López-Neblina*, Dr. Alberto Páez-Rollys*, Dr. Luis Horacio Toledo-Pereyra

* Del Instituto de Transplantes de Michigan y del Instituto de Investigaciones Quirúrgicas del Centro Médico Borgess, Michigan State University/ Kalamazoo Center for Medical Studies, Departamento de Cirugía y Departamento de Ciencias Biológicas, Western Michigan University, Kalamazoo, Michigan.

Dirigir correspondencia a: Dr. Luis Horacio Toledo-Pereyra, Michigan Transplant Institute at Borgess Medical Center, 1631 Gull Road, Suite 110, Kalamazoo, Michigan, USA 49001.

RESUMEN La importancia del óxido nítrico (ON) en gastroenterología y cirugía radica en que este gas participa en la función de múltiples sistemas biológicos, los cuales incluyen la motilidad intestinal, la enfermedad intestinal inflamatoria, el desarrollo de cáncer, sepsis, inflamación hepática e hipertensión porta. En los trasplantes, participa en el fenómeno de isquemia-reperusión y en la respuesta inmunológica de rechazo. En este artículo se revisa la función del ON haciendo énfasis en su posible aplicación dentro de la clínica.

Palabras clave: Oxido nítrico, L-arginina, factor relajante endotelial, motilidad intestinal, trasplante.

SUMMARY Nitric Oxide is an important element that has been found in multiple biological systems, including the gastro-intestinal tract. The Nitric Oxide function is reviewed, and its possible clinical use is commented.

Key words: Nitric Oxide, L-arginine, endothelial, relaxiong factor, intestinal matility, transplantation.

INTRODUCCION

Para el gastroenerólogo, la importancia del óxido nítrico (ON) radica en la función que desempeña en la neurotransmisión intestinal como inhibidor de la misma. En la enfermedad intestinal inflamatoria y en la hipertensión porta, actúa como activador del estado hiperdinámico y en el desarrollo de cáncer por la producción de carcinógenos. Tanto en la sepsis como en la inflamación hepática, su acción parece depender de su actividad como radical libre. En el trasplante, el óxido nítrico participa en el fenómeno de isquemia-reperusión y en la respuesta inmunológica de rechazo. Su acción en diferentes órganos es variable, por lo cual se analizará primero cómo se produce y de qué manera actúa, para posteriormente discutir su función en la gastroenterología y la cirugía.

PRODUCCION

El ON se produce por dos diferentes vías de tipo enzimático: la ON-sintetasa constituida y la ON-

sintetasa inducida^{1,2}. Las células que producen la ON-sintetasa se señalan en la Cuadro I. La enzima constituida es dependiente del calcio o calmodulina y responde de manera inmediata a diversos estímulos, los cuales comentaremos posteriormente. Este tipo de producción es llamada de "bajo flujo". Otras células (Cuadro I) producen la ON-sintetasa inducida, la cual es resultado de estímulos, tales como endotoxinas bacterianas, citoquinas o ambas. En estas últimas, el inicio de la producción de ON está retardado, pero es mucho mayor que la producción de ON por la enzima constituida y continúa por largos periodos; esta vía de producción es denominada de "alto flujo". (Figura 1). Los macrófagos y las células endoteliales, al parecer, son las únicas capaces de expresar ambos tipos de enzimas.

MECANISMO DE ACCION

Todas las acciones del ON se encuentran relacionadas con dos mecanismos básicos: activación e inactivación enzimáticas. En ambos las proteínas blanco,

CUADRO 1 FUENTES CELULARES DE OXIDO NITRICO

Producción constituida o de bajo flujo

Células endoteliales
Neuronas
Plaquetas
Mastocitos
Células adrenales

Producción inducida o de alto flujo

Células endoteliales
Macrófagos
Células de Kupffer
Células musculares lisas
Células mesangiales renales
Condrocitos
Fibroblastos
Islotes pancreáticos

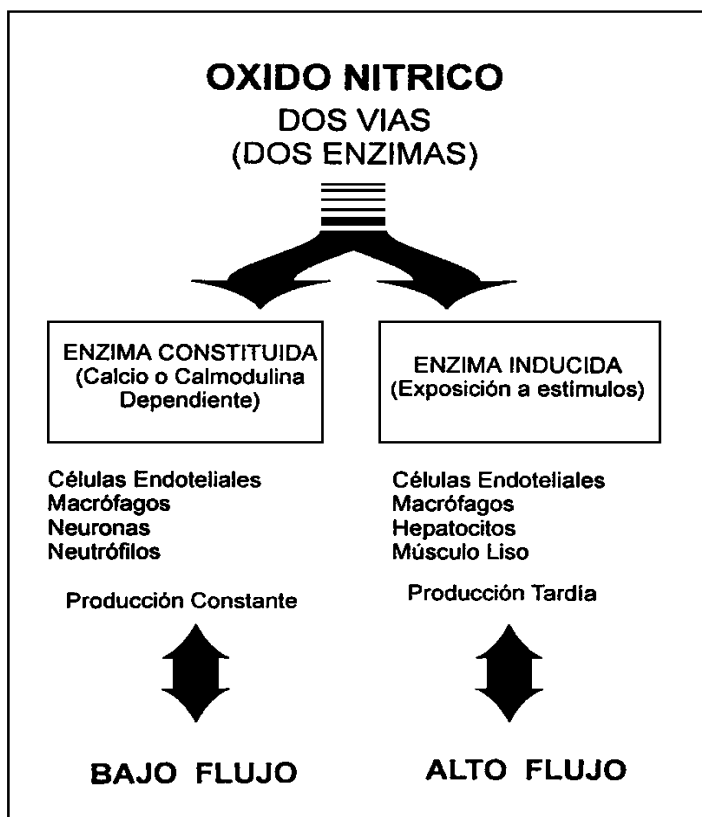


Figura 1. Vías enzimáticas para la producción de óxido nítrico.

que son generalmente enzimas, contienen grupos prostéticos por los cuales el ON tiene gran afección. La Figura 2 muestra los cambios que induce el ON en la actividad de diferentes enzimas. La inhibición del ciclo de Krebs y la inhibición de la fosforilación oxidativa puede ser el mecanismo por el cual sea mediada la toxicidad microbiana y de los macrófagos³⁻⁵. Por otro lado, la acción antiproliferativa del ON puede deberse a la inhibición del ribonucleótido reductasa^{6,7}.

La acción más ampliamente estudiada y descrita del ON es la activación de la guanilatociclasa soluble. Esto da por resultado un incremento en los niveles de cGMP celular⁸. Por medio de esta acción, el ON actúa como un segundo mensajero involucrado en la relajación del músculo liso vascular, en la inhibición de agregación y adhesividad plaquetarias y de la quimiotaxis de los neutrófilos. Por esta vía también interviene en la transmisión de impulsos en el sistema nervioso central⁹ y a nivel intestinal como mediador de la relajación producida por las fibras no adrenérgicas/no colinérgicas (NANC)¹⁰.

EL OXIDO NITRICO EN GASTROENTEROLOGIA

El ON es un transmisor neuroinhibidor del aparato digestivo. La motilidad intestinal es inhibida por la acción de los nervios NANC. El principal mediador de esta transmisión inhibitoria es el ON. Su acción más importante es la relajación de las fibras musculares intestinales. Estudios de fibras musculares de prácticamente todo el aparato digestivo han demostrado que los análogos de la L-arginina que inhiben la síntesis de ON reducen el efecto de las fibras NANC, y que los efectos de los análogos de la L-arginina pueden ser eliminados cuando se agrega ésta a las preparaciones, ya que es el sustrato para la síntesis de ON¹¹.

ESOFAGO

El ON es un importante mediador de la relajación del esófago por su efecto sobre las fibras NANC¹²⁻¹⁴. Aunque existe cierta controversia¹⁵, las más recientes evidencias favorecen al ON como el principal transmisor neuroinhibidor del esfínter esofágico inferior¹⁶.

ESTOMAGO

Se ha demostrado que los antagonistas del ON incrementan la tensión basal de las fibras musculares del fundus¹⁷. Hay evidencia de que el ON puede regular el tono basal del estómago proximal y regular el reflejo de acomodación de la comida y de los líquidos en el

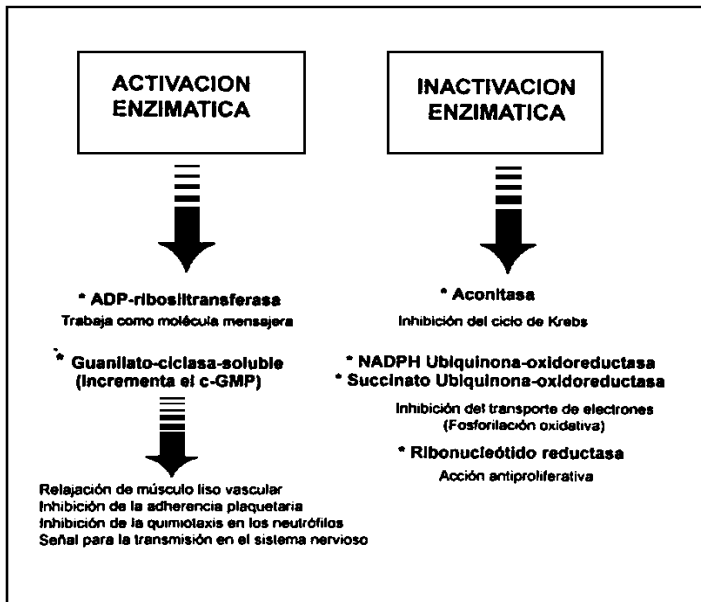


Figura 2. Mecanismo de óxido nítrico a través de la activación o inactivación enzimáticas.

estómago¹⁸. Estudios recientes han sugerido que la pérdida de actividad de la ON-sintetasa en el músculo del píloro es la responsable del piloroespasmo en la hipertrofia pilórica infantil^{19,20}.

INTESTINO DELGADO Y COLON

En el intestino delgado el ON es el transmisor neuroinhibidor de las fibras NANC²¹⁻²³. La misma función se ha encontrado en el caso del colon²⁵⁻²⁶.

VALVULA ILEOCECAL Y ESFINTER ANAL INTERNO

En la válvula ileocecal se ha identificado la producción de ON. Cuando se agrega ON exógeno se produce una relajación dependiente de su concentración en los mismos músculos^{27,28}. Al agregarse alguno de los inhibidores de la L-arginina, como la L-N⁶ monometil-arginina (L-NMMA) la tensión basal se incrementa. Este efecto es revertido parcialmente por L-arginina. El hecho de que la L-NMMA sólo bloquee parcialmente la relajación inducida por las fibras NANC, sugiere que la respuesta de relajación se debe a la liberación de una combinación de sustancias y no sólo de ON²⁹. En lo que respecta al esfínter anal interno, también se ha encontrado la misma relación entre la inhibición de la relajación que causan las fibras NANC y los antagonistas del ON, como la N-Nitro-L-arginina. Se ha observado la reversión del fenómeno utilizando la L-arginina de una manera directamente proporcional a su concentración^{30,32}.

ENFERMEDAD INTESTINAL INFLAMATORIA

Por su efecto como radical libre, el ON ha sido relacionado con la enfermedad intestinal inflamatoria (EII). Su probable función es el desarrollo de un estado circulatorio hiperdinámico que caracteriza la EII y que se sabe es capaz de desarrollar un incremento en el flujo sanguíneo de dos a seis veces durante los episodios de inflamación activa en el colon^{33,34}. Al parecer, los fagocitos inflamatorios (macrófagos, neutrófilos) liberan grandes cantidades de ON; ello sugiere que puede ser un mediador del incremento de flujo en la inflamación intestinal. Dada su acción de relajación en el músculo liso, a través del sistema NANC, se piensa que la alteración en la motilidad intestinal asociada con la EII puede ser provocada por las alteraciones producidas por los metabolitos reactivos del nitrógeno³⁵.

Por otro lado, los episodios de inflamación intestinal están asociados al incremento en las citoquinas del tejido de la pared (principalmente lámina propia) como el Factor de Necrosis Tumoral (FNT), gama interferón (IFN) e interleuquinas como la IL-1^{36,37}. Dichas citoquinas son potentes inductoras de la ON-sintetasa en macrófagos, neutrófilos y células endoteliales. La liberación de ON por los fagocitos inflamatorios tiene como resultado la producción de potentes radicales libres, que actúan sobre células normales como las endoteliales, hepatocitos o incluso islotes pancreáticos³⁸⁻⁴⁰. Además, debido a su acción sobre las enzimas del ciclo del ácido tricarbónico y su acción contra la ribonucleótido reductasa, el mecanismo de lesión también puede ser por inhibición de la función mitocondrial y de la síntesis de DNA⁵⁻⁷.

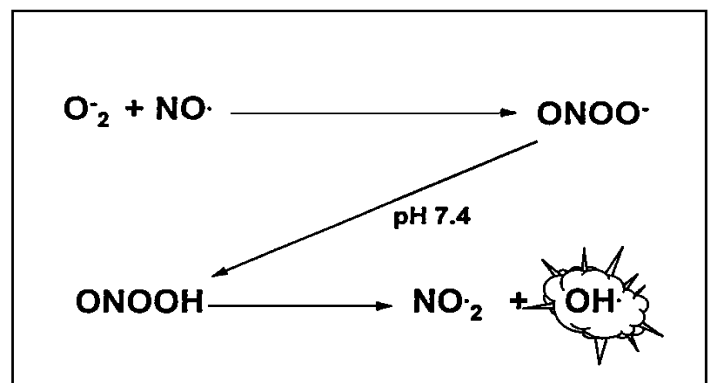


Figura 3. Interacción de radicales libres y óxido nítrico con la producción del radical hidroxilo.

CANCER

El ON es también un potente productor de nitrosaminas carcinogénicas. Se ha propuesto que la producción constante de grandes cantidades de ON, la cual puede ocurrir durante inflamación intestinal crónica, puede incrementar la formación de nitrosaminas carcinogénicas⁴¹. Este es quizá el eslabón entre la inflamación crónica y la transformación maligna de las células epiteliales intestinales^{42,44}.

SEPSIS E INFLAMACION HEPATICA

El ON afecta la función hepática, principalmente la producción de proteínas. Cuando se encuentran presentes endotoxinas bacterianas, el daño hepático depende de la presencia de L-arginina. Se ha demostrado producción de ON tanto por hepatocitos como por células de Kupffer. Sin embargo, existen todavía dudas acerca del mecanismo de inhibición de la síntesis de proteínas⁴⁵⁻⁴⁸. Por otro lado, hay estudios que adjudican un efecto protector de ON a nivel hepático, probablemente por la interacción del ON con las plaquetas o con radicales superóxido, actuando a este nivel como captador de radicales libres^{49,55}.

Los metabolitos tóxicos del ON pueden contribuir al daño celular en pacientes con sepsis. La hipotensión en el choque séptico es con frecuencia resistente al tratamiento con vasoconstrictores y parece ser mediada por la producción de ON.

Con base en esto, los inhibidores de la producción de ON podrían ser benéficos para el tratamiento de hipotensión asociada con el choque séptico o con el uso terapéutico de citoquinas; sin embargo, parece ser que la inhibición completa de la síntesis de ON puede ser contraproducente⁶⁶.

La controversia continúa sobre todo con el uso de los inhibidores de la producción de ON, el empleo de éstos a nivel clínico en este momento puede ser prematuro, sobre todo para el manejo del choque séptico^{57,58}. Los últimos estudios encuentran algunas respuestas al respecto y el consenso se centra en la idea de que la inhibición de las dos ON-sintetasas (la constituida y la inducida) durante la endotoxemia es deletérea, y que se puede mejorar con la reposición de ON intravenoso o con un donador de ON. No obstante, la inhibición selectiva de la ON-sintetasa inducida puede ser benéfica en el choque^{59,60}.

SINDROME DE HIPERTENSION PORTA

Como es bien sabido, el síndrome de hipertensión porta crónica está asociado con hiperemia esplácnica de etiología desconocida. Se ha demostrado que varios factores humorales⁶¹, como 5-hidroxitriptamina^{62,63},

glucagon⁶⁴, prostaciclina⁶⁵⁻⁶⁷ y ácidos biliares⁶⁸⁻⁷⁰ juegan cierto papel en este síndrome. Se ha sugerido que la síntesis de ON es incitada por la estimulación de las células endoteliales⁷¹, lo cual podría inducir el estado hiperdinámico observado en los pacientes con hipertensión porta crónica. Estudios recientes⁷² indican que la inhibición de la producción de ON reduce el flujo sanguíneo en la mayoría de los órganos espláncnicos. Sin embargo, estos resultados fueron independientes de la estenosis porta producida en ratas. Se ha sugerido que el factor que produce el estado hiperdinámico en pacientes con hipertensión porta también podría deberse a endotoxinas, que son conocidos inductores de la producción de ON. Y dado que la endotoxemia es un hallazgo relativamente frecuente en pacientes con hipertensión porta, el ON podría estar elevado debido a las endotoxinas. La mayoría de los estudios en ratas con estenosis de vena porta no muestran evidencia de endotoxemia, por tanto, existe la posibilidad de que el ON estimulado por las endotoxinas tenga realmente participación en la circulación hiperdinámica de pacientes con hipertensión porta y endotoxemia. Estudios *in vitro*⁷³ han demostrado que, efectivamente, el ON es responsable de la vasodilatación que acompaña al estado hiperdinámico en hipertensión porta independientemente de la endotoxemia. A pesar de lo anterior, se puede especular que el estado hiperdinámico, sobre todo en vasodilatación crónica, puede ser inducido por cambios estructurales de los propios vasos sanguíneos, lo cual permitiría una disminución en la resistencia al flujo⁷⁴.

CIRUGIA Y TRASPLANTE OXIDO NITRICO EN ISQUEMIA-REPERFUSION

Desde el momento en que se identificó el factor relajante derivado del endotelio (FRDE) como gemelo del ON, se expandió todo un horizonte en las reacciones de los radicales libres de relevancia patológica, debido a que el propio ON es un radical libre.

Inicialmente se pensó que el ON tendría un papel protector debido a la rápida captura de radicales superóxido; sin embargo, la reacción da por resultado peróxido de nitrógeno (ONOO⁻), el cual se descompone cuando es protonizado para formar el potente oxidante radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno (Figura 2). Por tanto, contrario a lo esperado, el ON aumenta considerablemente la toxicidad del radical superóxido al convertirlo de un reductor relativamente mediano en un oxidante al menos dos veces más potente⁷⁵.

La vía por la cual se supone que el ON actúa en el daño mediado por los radicales superóxido es la siguiente: La isquemia produce una disminución en

la cantidad de ATP, pues se consume y no tiene más aporte del mismo. La disminución de ATP bloquea el funcionamiento de la bomba de Na^+/K^+ en la membrana. La alteración en la bomba de Na^+/K^+ lleva a la entrada masiva de sodio al espacio intracelular, el cual arrastra agua produciendo edema celular. Por otro lado, el K^+ intracelular también pasa la membrana y la alteración en el voltaje de la misma abre los canales del calcio, produciendo una entrada masiva del mismo. La ON-sintetasa dependiente de calcio se activa y produce el ON. La xantina deshidrogenasa también se estimula por un sistema dependiente de calcio y se convierte en xantino-oxidasa. El ATP se metaboliza hasta convertirse en hipoxantina.

En el momento de la reperfusión, con la entrada súbita del oxígeno, se producen los radicales superóxido, que ya de por sí son tóxicos. El ON reacciona con el radical superóxido y produce peroxinitrito que después se descompone en el radical hidroxilo (OH^\cdot) y dióxido de nitrógeno⁷⁶. Los radicales hidroxilo, superóxido y dióxido de nitrógeno actúan a nivel de la membrana celular produciendo la peroxidación lipídica que, finalmente, es el fenómeno más agresivo al que puede estar sometida la célula.

En nuestro laboratorio hemos encontrado que en el modelo de isquemia-reperfusión hepática⁷⁷ existe una relación directa entre la expresión de citoquinas y la sobrevivencia de ratas sometidas a isquemia hepática por 90 minutos. Aquí es importante señalar que se ha observado mejor sobrevivencia en las ratas tratadas con FK506 y disminución del TNF y IL-1, se coincide entonces con hallazgos de otros autores, al sostener que ésta es una vía por la cual las citoquinas pueden estar actuando en el bloqueo de la producción de ON, como se ha demostrado en los fenómenos de sepsis anteriormente comentados, en los cuales los niveles de IL-2 correlacionaron con la disminución en el NO_2 y NO_3 cuando se administró FK506⁷⁸.

La adición de L-NMMA a cultivos de reacción mixta de linfocitos (MLR) promueve la proliferación aloespecífica de linfocitos y la inducción de linfocitos T citotóxicos (LTC)⁷⁹. Por otro lado, estudios bien conducidos muestran que el ON puede ser la vía por la cual los macrófagos supresores mantienen el control de los LTC, a diferencia de la supresión de los linfocitos B que estarían controlados por otra vía independiente de la producción de ON⁸⁰. Está demostrado que cuando se administró el FK506 según el modelo de enfermedad de injerto-contra-huésped, el rechazo fue prevenido o retardado y no se presentó elevación de los niveles de NO_2/NO_3 cuando el rechazo fue controlado⁸⁰. El mecanismo más probablemente responsable de la inhibición de la producción de ON en este modelo es que FK506 es un

conocido inhibidor de la síntesis de citoquinas⁸¹ que son necesarias para que la vía metabólica del ON sea inducida. Esto se ha confirmado al observar que, al menos *in vitro*, el ON no es producido y la interleukina-2 no es detectada cuando se añade el FK506 a cocultivos de injerto de células infiltradas y aloantígenos⁸¹.

CONCLUSION

El ON ha sido ampliamente estudiado en relación con múltiples funciones bioquímicas generales. A nivel gastrointestinal es principalmente el mediador del proceso de relajación. En sepsis puede desempeñar un papel deletéreo en inflamación hepática. En el sistema inmunológico, al parecer, media la activación de los linfocitos T citotóxicos. En isquemia-reperfusión se le atribuye un papel deletéreo al parecer a través de la inducción de peroxidación lipídica. En el cáncer probablemente es el eslabón entre la inflamación crónica y el desarrollo de alteraciones malignas. Finalmente, en hipertensión porta es al parecer el mediador de la vasodilatación que mantiene el estado hiperdinámico en estos pacientes. La aplicabilidad clínica de estos conocimientos se ha iniciado con los primeros resultados obtenidos en pacientes con sepsis. Faltan muchos estudios para conocer exactamente que función desempeña en éstos y otros múltiples fenómenos para establecer sus posibles aplicaciones clínicas.

REFERENCIAS

1. Moncada.: Endogenous Nitric Oxide: Physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J Clin Invest* 1991;21:361-374.
2. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J.: Biochemistry of Nitric Oxide and its Redox-Activated Forms. *Science* 1992;258:1898-1902.
3. Granger D, Lehniger.: Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J Cell Biol* 1982;95:527-535.
4. Drapier J, Hibbs J.: Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. *J Clin Invest* 1986;78:790-797.
5. Drapier J, Hibbs J.: Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Cell Biol* 1988;95:527-535.
6. Lepoivre M, Fiesch F, Coves J, et al. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179:442-448.
7. Kwon N, Stuehr D, Nathan C.: Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 1991; 174:761-767.
8. Schmidt H, Pollock J, Nakane M, et al.: Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:365-369.
9. Bredt D, Hwang P, Snyder S.: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990;347:768-770.
10. Bult H, Boeckstaens G, Pelckmans P, et al.: Nitric oxide as an inhibitory nonadrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345:346-347.

11. Burleigh D.: Ng-Nitro-L-Arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxations of human gut. *Gastroenterology* 1992;102:679-683.
12. Torphy T, Fine C, Burman M, et al.: Lower esophageal sphincter relaxation is associated with increased cyclic nucleotide content. *Am J Physiol* 1986;251:G786-G793.
13. Murray J, Du C, Ledelow A, et al.: Nitric Oxide: mediator of Nonadrenergic, noncholinergic responses of opossum esophageal muscle. *Am J Physiol* 1991;261(24):G401-G406.
14. Tottrup A, Svane D, Forman A.: Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. *Am J Physiol* 1991;260(23):G385-G389.
15. Goyal R, Rattan S, Said S.: VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic nonadrenergic inhibitory neurones. *Nature* 1980;288:378-380.
16. Knudsen M, Svane D, Tottrup A.: Action profiles of nitric oxide, s-nitroso-L-cysteine, SNP, and NANC responses in opossum lower esophageal sphincter. *Am J Physiology* 1992;25(2):G840-G846.
17. Boeckxstaens G, Pelckmans P, Bogers J.: Release of nitric oxide upon stimulation of nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;256:441-447.
18. Desai K, Sessa W, Vane J.: Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* 1991;351:477-479.
19. Allescher HD, Tougas G, Vergara P, et al.: Nitric Oxide as a putative nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the canine pylorus in vivo. *Am J Physiol* 1992;25(4):G695-G702.
20. Vanderwinden J, Mailleux P, Schiffmann S.: Nitric Oxide Synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N Engl J Med* 1992;327:511-5.
21. Toda N, Baba H, Okamura T.: Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. *Jpn J Pharmacol* 1990;53:281-284.
22. Gustafsson L, Wiklund C, Wiklund N, et al.: Modulation of autonomic neuroeffector transmission by nitric oxide in guinea pig ileum. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:110.
23. Bathó L, Cócán G, Pethó F, Maggi C.: Blockade of nitric oxide synthase inhibits nerve-mediated contraction in the rat small intestine. *Neurosci Lett* 1992;145:4346.
24. Humphreys C, Costa M, Brookes S.: Nitric oxide mediates the apamin-insensitive component of transmission from enteric inhibitory motor neurons to the circular muscle of the guinea-pig small intestine and colon (abstract). *Proc. Aust Physiol Pharmacol Soc* 1992;22:144.
25. Ward S, Xue C, Shuttleworth W, et al.: NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. *Am J Physiol* 1992;26(2):G277-G284.
26. Ward S, Dalziel H, Thornbury K, et al.: Nonadrenergic, noncholinergic inhibition and rebound excitation in canine colon depend on nitric oxide. *Am J Physiol* 1992;25(2):G237-G243.
27. Boeckxstaens G, Pelckmans P, Rampart M, et al.: Nonadrenergic noncholinergic relaxation mediated by nitric oxide in the ileocolonic junction. *Eur. J Pharmacol* 1990;190:412-447.
28. Boeckxstaens G, Pelckmans P, Ruytjens H, et al.: Bioassay of nitric oxide released upon stimulation of non-adrenergic noncholinergic nerves in the canine ileocolonic junction. *Br J Pharmacol* 1991;103:1085-1091.
29. Rattan S, Chakder S.: Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation (abstract). *Gastroenterology* 1991;100:A485.
30. Rattan S, Chakder S.: Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* 1992;25(1):G107-G112.
31. Tottrup A, Glavind E, Svane D.: Involvement of the L-arginine-Nitric oxide pathway in internal anal sphincter relaxation. *Gastroenterology* 1992;102:409-415.
32. Rapoport R, Murad F.: Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Cir Res* 1983;52:352-357.
33. Bacaner M.: Quantitative measurement of regional colon blood flow in the normal and pathological human bowel. *Gastroenterology* 1966;52:7664-777.
34. Hulten L, Lingh J, Lundgren O, et al.: Regional intestinal blood flow in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* 1977;72:388-396.
35. Hata F, Ishi T, Danada A.: Essential role of nitric oxide in descending inhibition on the rat proximal colon. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:1400-1406.
36. Fiocchi C.: Production of inflammatory cytokines in the intestinal lamina propria. *Immunol Res* 1991;10:239-246.
37. Sartor R.: Pathogenetic and clinical relevance of cytokines in inflammatory bowel disease. *Immunol Res* 1991;10:465-471.
38. Kroncke K, Kolb-Bachofen, Berschick B, et al.: Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175:752-758.
39. Albina J, Abate J, Henry W.: Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T. cell proliferation: role of IFN- gamma in the induction of the nitric oxide synthesizing pathway. *J Immunol* 1991;147:144-148.
40. Stadler J, Billiar, Curran D, et al.: Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1991;260:C910-C916.
41. Yarsoh D.: The role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1985;145:1-16.
42. Bartsch H, Hietanen E, Malaveille.: Carcinogenic nitrosamines: free radical aspects of their action. *Free Radical Biol Med* 1989;7:636-644.
43. Williams D.: Nitrosamines. 113-149. Cambridge University press. Cambridge UK 1992.
44. Wink D, Dazimierz C, Maragos R, et al.: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991;254:1001-1003.
45. Curran R, Billiar T, Stuehr D, et al.: Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory stimuli. *J Exp Med* 1989;170:1769.
46. Billiar T, Curran R, Stuehr D, et al.: Inducible cytosolic enzyme activity for the production of nitrogen oxides from L-arginine in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168:1034.
47. Curran R, Billiar T, Stuehr D, et al.: Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 1990;212:462.
48. Billiar T, Curran R, Stuehr D, et al.: An L-arginine dependent mechanism mediates Kupffer cell influences on hepatocyte protein synthesis in vitro. *J Exp Med* 1989;169:1467.
49. Billiar T, Curran D, West M.: Kupffer cell cytotoxicity to hepatocytes in coculture requires L-arginine. *Arch Surg* 1989;124:1416.
50. Billiar T, Curran R, Harbrecht B, et al.: Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo: N^ω-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukocyte Biol* 1990;48:565.
51. Stadler J, Billiar R, Curran R.: Effect of authentic and cell-generated nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1991;260:C910.
52. Curran R, Ferrari F, Kispert P, et al.: Nitric oxide and nitric oxide generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEB J* 1991;5:2085.
53. Billiar T, Curran R, Ferrari F.: Kupffer cell: hepatocyte cocultures produce nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J Surg Res* 1990;48:349.
54. Feigl E.: EDRF-a protective factor? *Nature* 1988;331:490-491.
55. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:1482-1489.
56. Nava E, Palmer R, Moncada S.: Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial. *Lancet* 1991;338:1555-1557.
57. Cohen J, Silva A.: NO inhibitors and septic shock. *Lancet* 1992;339:751.
58. Hotchkiss R, Karl I, Parker J, Adams H.: Inhibition of NO Synthesis in septic shock. *Lancet* 1992;339:434-435.
59. Petros A, Bennett D, Vallance P.: Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991;338:1557-1558.

60. Wright C, Rees E, Moncada S.: Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1992;26:48-57.
61. Benoit J, Barrowman J, Harper S, et al.: Role of humoral factors in the intestinal Hyperemia associated with chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1984;247:G486-G493.
62. Cummings S, Groszmann R, Kaumann A.: Hypersensitivity of mesenteric veins to 5-hydroxytryptamine and ketanserin-induced reduction of portal pressure of portal pressure in portal hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1986;89:501-513.
63. Kaumann A, Morgan J, Groszmann R.: IC1 169,369 selectively blocks 5-hydroxytryptamine₂ receptors and lowers portal pressure in portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1988;95:232-236.
64. Benoit J, Zimmermann B, Permen A, et al.: Role of glucagon in splanchnic hyperemia of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1986;251:G674-G677.
65. Sitxmann J, Bulkley G, Mitchell M, Campbell K.: Role of prostacyclin in the splanchnic hyperemia contributing to portal hypertension. *Ann Surg* 1989;209:322-327.
66. Sitxmann J, Li S, Lin P.: Prostacyclin mediates splanchnic vascular response to norepinephrine in portal hypertension. *J Surg Res* 1989;47:208-211.
67. Hamilton G, Phing R, Hutton R, et al.: The relationship between prostacyclin activity and pressure in the portal vein. *Hepatology* 1982;2:236-242.
68. Bomzon A, Finberg J, Tovbin D, et al.: Bile salts, hypotension and obstructive jaundice. *Clin Sci* 1984;67:177-183.
69. Genecin P, Plio J, Colombato L, et al.: Bile acids do not mediate the hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1990;259:G21-G25.
70. Thomas S, Joh T, Benoit J.: Role of bile acids in splanchnic hemodynamic response to chronic portal hypertension. *Dig Dis Sci* 1991;36:1243-1248.
71. Tesfamariam B, Cohen R.: Inhibition of adrenergic vasoconstriction by endothelial cell shear stress. *Cir Res* 1988;63:720-725.
72. Iwata F, Joh T, Kawai T, Itoh M.: Role of EDRF in splanchnic blood flow of normal and chronic portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1992; G149-G154.
73. Sieber C, Groszmann R.: In vitro hyporeactivity to methoxamine in portal hypertensive rats: reversal by nitric oxide blockade. *Am J Physiol* 1992;G996-G1001.
74. Tsoporis J, Fields N, Lee R, Leenen F.: Arterial vasodilation and cardiovascular structural changes in normotensive rats. *Am J Physiol* 1991;260:H1944-H1952.
75. Stamler J, Singel D, Loscalzo J.: Biochemistry of Nitric Oxide and Its Redox-Activated Forms. *Science* 1992;258:1898-1902.
76. Hogg N, Darley V, Wilson M, Moncada S.: Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* 1992;281:419-424.
77. Susuki S, Toledo-Pereyra LH, et al.: Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury, modulating effect of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993;55:1265-1272.
78. Langrehr J, Muller A, Markus P, et al.: FK506 inhibits nitric oxide production by cell infiltrating sponge matrix allografts. *Transplant Proc* 1991;23:3260.
79. Hoffman R, Langrehr J, Billiar T, et al.: Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine. *J Immunol* 1990;145:2220-2226.
80. Albina J, Abate J, Henry W.: Nitric Oxide is required for murine resident peritoneal Macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. *J Immunol* 1991;147:144-148.
81. Tocci MJ, Matkovich DA, Collier KA, et al.: The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J Immunol* 1989;143:718.