

Óxido nítrico, una molécula multifuncional

Patricia Gorocica Rosete*
 Raúl Chávez Sánchez ‡
 Ricardo Lascurain Ledesma*
 Blanca Espinosa Mancilla*
 Edgar Zenteno Galindo*

Palabras clave: Óxido nítrico, asma y citotoxicidad.

Key words: Nitric oxide, asthma, cytotoxicity.

RESUMEN

El óxido nítrico es un regulador importante de diversas funciones fisiológicas y además, es un factor que contribuye a la respuesta inmune innata. Su efecto también puede estar relacionado a procesos patológicos como el asma o la inflamación crónica.

Objetivo: En este trabajo se revisaron algunos aspectos bioquímicos, inmunológicos y fisiopatológicos del óxido nítrico.

ABSTRACT

Nitric oxide is an important regulator of various physiological functions and, additionally, a factor which contributes to the nonspecific immune response. Nitric oxide may also be associated to pathological processes such as asthma and chronic inflammation. The present article reviews some of the biochemical, physiological and immunological aspects of nitric oxide.

INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico (ON), es un radical muy inestable en condiciones aeróbicas, el cual inicialmente fue considerado

como un contaminante atmosférico, pero posteriormente se descubrió que era producido por numerosas células de los mamíferos y tenía diversas funciones biológicas. Actualmente, se han definido dos funciones principales de él; una relacionada con la comunicación celular y otra relacionada con la citotoxicidad. La primera está asociada al papel del ON como mediador con efectos pleiotrópicos, y la segunda al efecto microbicida y tumoricida en procesos comprendidos dentro de la inmunidad inespecífica.

El ON tiene un amplio espectro de acción y se ha encontrado en numerosos organismos, tales como las esponjas, los insectos, las ranas y hasta en las plantas¹. Su vida media y su acción biológica son muy cortas, ya que es rápidamente oxidado a nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). La cantidad de ON producida está estrechamente relacionada a algunos eventos biológicos como el choque séptico, la reacción contra injerto, el cáncer, la función cardiaca, la presión arterial, el funcionamiento neuronal, la artritis y en múltiples infecciones².

Los mecanismos de citotoxicidad del ON aún no están muy claros, pero participan diversas vías que llevan a las células a procesos apoptóticos o necróticos. El ON ejerce su efecto principalmente en la membrana, el citoplasma y el núcleo de las células. La citotoxicidad del ON en los sistemas biológicos está relacionada a su capacidad de difusión celular, a su autooxidación y a la reacción con superóxidos para formar peronitritos (ONOO^-)³. El ON difunde a grandes distancias de la célula que lo produce, por lo que puede reaccionar con diversas proteínas especialmente las que contienen centros de fierro o azufre, pero la reacción del ON con el O_2^- tiene una cinética de difusión limitada. En la autooxidación, el ON reacciona con oxígeno molecular para formar un agente electrofílico como el N_2O_3 (óxido nitroso) relacionado con la desaminación del DNA y eventos que pueden inducir mutagénesis (Figura 1). El

* Depto. Bioquímica, INER

‡ Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

Correspondencia:

Patricia Gorocica Rosete

Depto. Bioquímica, Unidad de Investigación, INER
 Calzada de Tlalpan No. 4502, Col. Sec. XVI
 14080, México, D. F.

Trabajo recibido: 02-IX-99; Aceptado: 29-XI-99

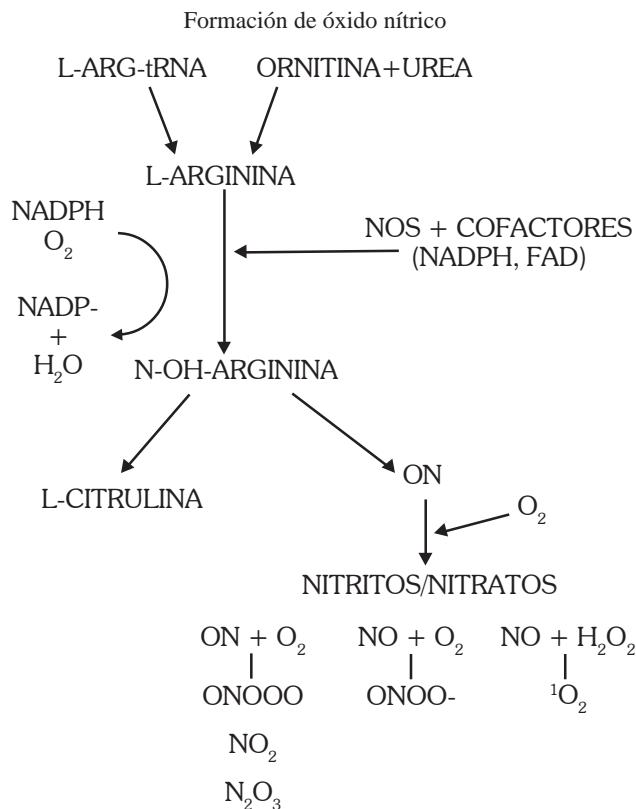


Figura 1. El ON se produce a partir de la L-arginina por la acción de la óxido nítrico sintetasa y algunos cofactores como el NADPH, FAD, FMN y tetrahidrobiopterrina. En el caso de la ONS se requiere, además, la participación de la calmodulina y calcio para activarse.

peronitrito (ONOO⁻) es un poderoso agente oxidante que reacciona con el DNA, las proteínas y los lípidos de membrana celular dañando y causando la muerte de la célula⁴.

PRODUCCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

El ON es sintetizado a partir de L-arginina por la enzima Óxido Nítrico Sintetasa (ONS). Existen por lo menos tres isoformas de la ONS que son capaces de reaccionar con formas reactivas del oxígeno y moléculas biológicas para formar una gran cantidad de productos finales, incluyendo NO₂⁻, NO₃⁻ (nitritos y nitratos) y S-nitrosotioles⁴. Todas las isoformas de ONS catalizan la oxidación de la L-arginina, dando lugar a la formación de óxido nítrico y L-citrulina. El mecanismo de acción de la NOS no se conoce bien, pero participan varios cofactores como el FAD, FMN, NADPH, tetrahidrobiopterrina en la transferencia de electrones y además utiliza una fuente de tiol y para la ONS constitutiva una proteína accesoria llamada calmodulina para la activación de la enzima⁴. Dos de estas isoformas de la enzima ONS son constitutivas en algunas células y una tercera es inducible después del estímulo⁵. Las 2 óxido nítrico sintetasas constitutivas (ONS_c) están relacionadas con bajos niveles de producción de ON. Una de ellas, se presenta en todas las neuronas (ONS_{cn}), tiene un peso molecular de 160 kDa y está implicada en la regulación de

la transmisión sináptica en el sistema nervioso central y en la regulación del flujo de sangre al cerebro. La otra isoforma constitutiva, se presenta en las células endoteliales (ONS_{ce}), tiene un peso molecular de 133 kDa y juega un papel importante en función del endotelio y en la homeostasis cardiovascular⁵. Ambas isoformas constitutivas son inactivas hasta que los niveles de calcio intracelular se incrementan. El calcio se une a la calmodulina formando un complejo que se une a la ONS para activarla. Para una correcta actividad de la enzima se requiere de NADPH y tetrahidrobiopterrina como cofactores⁶.

Finalmente, la isoforma inducible de la óxido nítrico sintetasa (ONS_i) se encuentra presente en la mayoría de las células de mamíferos, principalmente en macrófagos, en hepatocitos y células de músculo liso. Esta enzima está asociada a mecanismos de defensa del huésped tanto inflamatorios, como inmunológicos⁶. La ONS_i tiene un peso molecular de 130 kDa y una homología del 65% con la ONS_{cn}. Se expresa en respuesta a la acción de algunas toxinas bacterianas como los lipopolisacáridos y algunas citocinas como la IL-1, INF γ y TNF α y está asociada a la producción de altos niveles de ON⁷. La ONS_i no requiere de calcio ni de calmodulina para activarse, pero al igual que las formas constitutivas, sí se requiere de NADPH, FAD, FMN y tetrahidrobiopterrina como cofactores para su actividad⁸. Aunque en macrófagos humanos no se han encontrado evidencias de producción de tetrahidrobiopterrina, si hay producción de la ONS⁹.

El ON sintetizado por las ONS_c, tiene una vida media muy corta de segundos a minutos, en cambio el ON sintetizado por ONS_i está presente por largos períodos de tiempo que van de horas a días. La mayor diferencia entre la actividad de una y otra es la cantidad de ON generada por cada enzima, más que la relación con su vida media⁶.

PAPEL FISIOLÓGICO DEL ÓXIDO NÍTRICO

Las características fisicoquímicas del ON favorecen diversas reacciones bioquímicas, por lo cual puede modular una gran cantidad de procesos positivos o negativos para el organismo, de los cuales algunos son dependientes y otros independientes de la guanilato ciclase. Una función primaria del ON es activar a la enzima guanilato ciclase soluble para incrementar los niveles de GMPc en algunos sistemas incluyendo el vascular y el nervioso. La acción del ON también puede ser totalmente independiente de la activación de la guanilato ciclase (Tabla 1)⁸.

El efecto fisiológico del ON se puede enfocar hacia los sistemas cardiovascular, nervioso, muscular e inmune: 1) En el sistema cardiovascular el ON producido por el endotelio vascular es responsable de la respuesta vasodilatadora esencial para la regulación de la presión arterial. Tiene efecto inhibidor sobre la agregación plaquetaria, además de que protege contra la hipoxia pulmonar y participa en el control de la circulación colateral. Se asocia también a la fisiología de la erección del pene, al producir relajación del cuerpo cavernoso.

2) En el sistema nervioso está relacionado con los procesos que dan lugar a la memoria y al aprendizaje.

Tabla 1. Funciones de la óxido nítrico sintetasa.

A. ONSc (Ca ²⁺ dependiente)	ON pequeñas cantidades (FISIOLÓGICO)	Guanilil ciclase	cGMP (Aumento)	a) Relajación b) Agregación plaquetaria
B. ONSi (Ca ²⁺ independiente)	ON grandes cantidades (TÓXICO)	Respiración mitocondrial (disminución) Aconitasa (disminución) Otras enzimas FeS (disminución) Daño DNA Defensa contra microorganismos y tumores Daño tisular y procesos inflamatorios		

La función de la ONSc está relacionada a la producción de pequeñas cantidades de ON y a efectos fisiológicos normales, la función de la ONSi está relacionada a la producción de grandes cantidades de ON y a la respuesta inmune inespecífica, además de efectos inflamatorios y citotoxicidad.

También está asociado a otros procesos como la visión, la olfacción, la conducta y a la transmisión sensorial⁶.

3) Altas concentraciones de ON están implicadas en la osteogénesis ya que en los fibroblastos de ratones Balb-c, el ON disminuye la concentración de calcio citosólico libre, impidiendo la remodelación de hueso al inhibir la actividad de los osteoclastos¹⁰ siendo éste un mecanismo independiente de GMPc¹¹.

4) El ON contribuye a la vasodilatación y relajación no adrenérgica y no colinérgicas de la musculatura traqueal, dilatación de la musculatura del estómago, aumento de la presión intragástrica. Por lo contrario, la ausencia del ON puede producir hiperreactividad de la vejiga urinaria, disminución de la capacidad vesical¹².

5) Finalmente, en el sistema inmune su acción es inespecífica hacia las células tumorales o hacia microorganismos, pero también se le ha asociado a mecanismos de daño tisular asociado a injertos¹², así como en la inhibición de la oxidación de lípidos por las vías de la lipo y ciclooxigenasa¹³.

EFFECTO CITOTÓXICO DEL ÓXIDO NÍTRICO

La citotoxicidad del ON tiene mayor relación con los productos de la ONSi que de las ONSc. Células activadas como los macrófagos, neutrófilos y células endoteliales pueden producir intermediarios reactivos del oxígeno por reacciones de oxidación y reducción a partir de compuestos formados *in vivo*. Algunos de estos compuestos son el H₂O₂, O₂⁻, OH, el oxígeno singulete (¹O₂) y el ON (Tabla 1), algunos de éstos tienen funciones biológicas importantes como moléculas microbicidas y citocidas⁶.

Las bajas concentraciones de óxido nítrico producidas en cultivos de macrófagos (4-5 μM) pueden difundir a células vecinas. La distancia de difusión puede ser de 150-300 μm de diámetro en 4-5 segundos y puede lisar el 100% de células singénicas en 15 h, al producir modificaciones químicas y alterar el potencial de membrana de las células afectadas, a través de la activación de canales de K⁺, Ca²⁺ y ATPasas⁶. Aparentemente el ON es autooxidado después de alcanzar su blanco, por lo que es difícil calcular su concentración tóxica¹⁴.

El ON puede reaccionar con los grupos SH⁻ de las proteínas, por lo que inhibe enzimas intracelulares SH⁻-dependientes como la aconitasa (complejo I y II)¹⁵, afectando mecanismos de transducción y transcripción de las células. El ON también inactiva otras enzimas importantes como la proteína cinasa C, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la fosfotirosin fosfatasa y a la creatinin cinasa, entre otras, por lo que se altera el metabolismo celular¹⁶.

El ON altera moléculas asociadas a las membranas mitocondriales como la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I) y la succinato ubiquinona oxidoreductasa (complejo II) y el citocromo oxidasa C (complejo IV), por unión reversible a su grupo hemo por lo que la cadena respiratoria se ve afectada¹⁷. En el núcleo el ON induce transición de G:C ⇒ A:T y la ruptura del DNA; ambos procesos son consecuencia de la N-nitración de los desoxirribonucleótidos. Además, el ON inactiva diversas enzimas involucradas en la reparación del DNA, teniendo importantes consecuencias biológicas. El daño producido al DNA induce mutaciones, necrosis o apoptosis¹⁸⁻²⁰.

EFFECTO MICROBICIDA DEL ON EN MACRÓFAGOS

Los macrófagos son las primeras líneas de defensa contra infecciones, pero también son células huéspedes para el desarrollo de muchos microorganismos patógenos, teniendo su hábitat dentro o fuera del fagolisosoma. A pesar de los diversos mecanismos microbicidas dependientes o no del oxígeno⁶, muchos microorganismos viven satisfactoriamente en el interior del macrófago, pero en ocasiones pueden ser eliminados por el propio macrófago infectado, si éste es activado por ciertas citocinas. En macrófagos tisulares residentes se producen pequeñas cantidades de ON; en cambio, en macrófagos activados durante la respuesta inmune *in vivo* o expuestos a la acción de citocinas *in vitro* aumenta la producción del ON²¹.

En algunas infecciones producidas por microorganismos intracelulares de los géneros *Leishmania* y *Mycobacterium*, así como los parásitos intracelulares *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* ni los mecanismos microbicidas depen-

dientes ni los independientes de oxígeno son suficientes para eliminar al parásito, ya que éstos poseen diversas estrategias para evitar su destrucción. En caso de *Leishmania* y *Mycobacterium bovis* los macrófagos activados por citocinas principalmente relacionadas con inflamación como el INF γ y TNF α ^{21,22}, pueden destruir a los microorganismos. La destrucción del parásito se lleva a cabo por la producción del ON y productos inorgánicos derivados de él a partir de la L-arginina.

La oxidación de la L-arginina para la síntesis del ON y la actividad citotóxica tumoricida o microbicida del macrófago requiere de múltiples señales provenientes de la respuesta inmune en una secuencia definida. El primer estímulo lo proporciona el INF γ , seguido de una segunda señal con lipopolisacárido bacteriano (LPS), el muramildipéptido (MDP) o el TNF α . Las células expuestas simultáneamente a las dos señales producen gran cantidad de NO $_2^-$, con gran actividad tumoricida^{21,22}.

El TNF α juega un papel integral en la respuesta contra infecciones intracelulares producidas por *Leishmania sp.*, *Histoplasma capsulatum* o *Mycobacterium sp.*, así como también en infecciones producidas por microorganismos extracelulares como el hongo *Cryptococcus neoformans* o el parásito *Schistosoma mansoni*, ya que estimulan la producción de ON⁷.

Macrófagos murinos infectados con amastigotes de *Leishmania mayor* inducen la síntesis de TNF α y la acción previa del INF γ aumenta más de 10 veces la producción de TNF α . El efecto sinérgico del INF γ y TNF α , inducen la capacidad citotóxica del macrófago contra tumores y microorganismos⁷, al inducir la expresión de la ONSi.

REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

El ON por ser una molécula con una gran capacidad de difusión a través de la membrana, puede causar daño en los tejidos adyacentes, por lo que requiere un control en su producción, en sus efectos y en su papel como mensajero celular. Los altos niveles de ON producidos por los macrófagos activados por citocinas, aparte de producir alteraciones en la cadena respiratoria, en la síntesis de DNA de las células tumorales o en microorganismos intracelulares, también ocasiona daños al macrófago. La acumulación de ON en el organismo destruye el tejido, desencadenando procesos inflamatorios y autoinmunes²¹.

La producción de ON es autorregulada por el mismo ON, ya que éste es un potente inhibidor de actividad de la ONS²³. Dicha inhibición se debe a la unión del ON con el hierro de la ONS formando un complejo con cofactores o moléculas reguladoras de la ONS. Todas las ONS son hemoproteínas tipo Citocromo_{P450}, las cuales se caracterizan por su marcada inhibición por monóxido de carbono. El ON puede interactuar con el Fe del grupo hemo, formándose el complejo ON-Fe de la ONS e inhibiendo a la enzima⁸. Las citocinas relacionadas a los linfocitos TH1 como la IL-2 e INF- γ estimulan a los macrófagos para la producción de grandes cantidades de ON; por otro lado, las citocinas producidas por linfocitos TH2 como la IL-4 e

IL-10 regulan negativamente la producción de ON. Otras citocinas como el TGF β y el PDGF actúan como potentes inhibidores de la síntesis de ON²¹.

En macrófagos, existen por lo menos tres mecanismos de control de la producción de ON: 1) la producción de arginasa, enzima que depleta la arginina intracelular, 2) los intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) que reaccionan con los óxidos de nitrógeno, 3) el TGF β que es un potente supresor y 4) la producción de moléculas antioxidantes.

El TGF β es producido en forma inactiva, requiere de una escisión molecular para adquirir su actividad biológica y es un modulador potente de la respuesta inmune. Existen tres isoformas, pero el TGF $\beta 1$ es la más abundante y tiene un efecto más directo sobre la expresión de ONSi. El efecto de esta citocina sobre la expresión de la ONSi es probablemente a nivel transcripcional. El TGF β puede alterar la unión de numerosos factores que inducen la transcripción del gen para la ONSi y puede suprimir la producción del cofactor tetrahidrobiopterina¹.

Algunos intermediarios reactivos del oxígeno como el O $_2^-$ se combinan con el ON, formando el anión peroxinitrito. Esto regula la concentración de ON, por lo que los efectos positivos y negativos del ON disminuyen⁷.

Además, existen mecanismos de neutralización del ON como la producción de moléculas antioxidantes, entre las cuales están la glutatión oxidasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa, la superóxido dismutasa, tioredoxin. La magnitud del daño ocasionado por el ON a las células depende del tipo celular y su sensibilidad⁸.

PATOLOGÍA ASOCIADA A LA PRODUCCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

El incremento en la producción del óxido nítrico puede tener múltiples efectos en la fisiopatología de diversas enfermedades respiratorias. Las dos ONSc están asociadas a la regulación de las funciones respiratorias y la ONSi, por lo general está asociada a las enfermedades inflamatorias de vías aéreas y en la defensa del organismo contra infecciones. La ONSi genera más de 1000 veces ON que la ONSc y su producción continúa por horas, por tanto su efecto puede ser mucho más generalizado, lo que puede constituirse como un mecanismo patogénico al amplificar la respuesta inflamatoria. El ON puede amplificar la respuesta inflamatoria al unirse, con gran avidez, al anión superóxido generando iones peroxinitritos que tienen efecto directo sobre las células inflamatorias²⁴⁻²⁶. Altas concentraciones de ON pueden producir daños vasculares en el endotelio ocasionando choque tóxico¹.

Las células epiteliales bronquiales producen ON después de la exposición a citocinas proinflamatorias como la IL-1 β y el TNF α o a contaminantes ambientales como el ozono y el dióxido de nitrógeno²⁶. En pacientes con asma la ONSi se incrementa considerablemente, por un mecanismo aún no bien conocido, se ha visto asociado a una sobreexpresión de ONSi²⁶, lo que no ocurre en sujetos sanos.

La aplicación de inhibidores específicos de la ONSi como glucocorticoides por vía oral inhibe el factor nuclear kB (NF-KB) de células epiteliales lo cual disminuye la pro-

ducción de ON²⁵. Esta inhibición ocurre de manera similar a la de los inhibidores no específicos del ON, como N-monometil-L-arginina (L-NMMA), el cual es un análogo de la L-arginina, que disminuye la producción de ON²⁷. Por el contrario, la ausencia de ON puede estar asociada a patologías crónico degenerativas como en el caso de la fibrosis quística o con el síndrome de Kartagener²⁸.

CONCLUSIÓN

El óxido nítrico es un mediador multifuncional producido por la mayoría de las células. Sus funciones son diversas y actúa como relajante neuromuscular, como un vasodilatador potente o como una molécula microbicida y tumoricida. Sus características químicas lo hacen también un potente factor de daño en las enfermedades inflamatorias o autoinmunes. El equilibrio entre ambos papeles se logra por los diversos mecanismos de control tanto para su producción, como para su neutralización.

La cantidad de arginina libre y la presencia de todos los cofactores necesarios son importantes para la producción de ON en todas las células que expresan óxido nítrico sintetasas constitutivas. En macrófagos, se requiere de dos señales estimuladoras para que se exprese la óxido nítrico sintetasa inducible; la primera señal es proporcionada por citocinas participantes en procesos inflamatorios como el INF γ y la segunda es producida por el metabolismo bacteriano como el lipopolisacárido (LPS), o bien por otras citocinas como el TNFα.

Los mecanismos de autorregulación en la producción del ON, son importantes para mantener la homeostasis, pero en algunas enfermedades sobre todo inflamatorias crónicas o hipersensibilidades como el asma, no se logra la autorregulación, por lo que la producción ilimitada del ON puede degenerar en diversas patologías.

Los múltiples efectos del ON pueden convertirlo en un candidato terapéutico para numerosos problemas cardiovasculares. La regulación de su producción puede ser de utilidad en procesos autoinunitarios o inflamatorios crónicos²⁹.

REFERENCIAS

- Vodovotz Y. Control of nitric oxide production by transforming growth factor β1: Mechanistic insight and potential relevance to human disease. *Nitric oxide*. Biol Chem 1997; 1, 1: 3-7.
- Moncade S, Higgs A. Mechanism of disease. Engl J Med 1993; 329: 2002-2011.
- Lancaster J. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric oxide*. Biol Chem 1997; 1: 18-30.
- Kronke K, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: Cytoxicity versus cytoprotection. How, why, when, and where? *Nitric oxide*. Biol Chem 1997; 1: 107-120.
- White K, Marleta M. Nitric oxide synthase is a cytochrome P450 type hemoprotein. Biochemistry 1992; 31: 6627-6631.
- Mac Micking J, Xie Q, Natham C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 1997; 15: 323-350.
- Green S, Nancy C, Meltzer M. Cytokine induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages. A protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogen. J Leukoc Biol 1991; 50: 93-103.
- Whittle B. Nitric oxide in physiology and pathology. Biochem J 1995; 27: 727-737.
- Kwon N, Nathen C, Suder D. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophage. J Biol Chem 1989; 264: 20496.
- Macintyre I, Zaidi M, Alam A, Datta H, Moonga B, Lidbury, et al. Osteoclastic inhibition: An action of nitric oxide not mediates by cyclic GMP. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 2936-2940.
- Garg U, Hassid A. Nitric oxide decreases cytosolic free calcium in BALB/C 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism. J Biol Chem 1991; 266: 9-12.
- McCall T, Vallance P. Nitric oxide take centre-stage with newly defined roles. Trends 1992; 13: 1-6.
- Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. Lipids 1992; 27: 46-49.
- Daveu C, Servy C, Dendane M, Marin P, Ducrocq C. Oxidation and nitration of catecholamines by nitrogen oxides derived from nitric oxide. *Nitric oxide*. Biol Chem 1997; 1: 234-243.
- Drapier J, Hibbs J. Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cell. Inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. J Clin Invest 1986; 78: 790-796.
- Lepoivre M, Fieschi F, Covès J, Thelander L, Fontecave M. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Biochem Biophys Res Commun 1991; 179: 442-448.
- Granger D, Leninger A. Site of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage injured neoplastic cell. J Cell Biol 1982; 95: 527.
- Drapier JC, Hibbs Jr. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cell result in L-arginine depend inhibition mitochondrial iron sulfur enzymes in macrophage effector cells. J Immunol 1988; 140: 2829-2834.
- Stacler J, Billiar T, Currant D, Stuehr D, Ochoa J, Simmons. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. Am J Physiol 1991; 260: C910-C916.
- Burney S, Tamir S, Gal A, Tannenbaum S. A mechanistic analysis of nitric oxide induced cellular toxicity. *Nitric oxide*. Biol Chem 1997; 1: 130-144.
- Marcinkiewics J, Chain M. Differential regulation of cytokine production by nitric oxide. Immunol 1993; 80: 146-159.
- Nacy C, Fortier A, Meltzer M, Buchmeier N, Schreiber R. Macrophage activation to kill *Leishmania major*. Activation of macrophage can be induced by both INFγ and non IFNγ lymphokines. J Immunol 1985; 135: 3505-3510.
- Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide. A pathogenic factor in autoimmunity. Immunol Today 1992; 13: 157-159.
- Griscavage J, Hobbs A, Ingarro L. Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds. Adv Pharmacol 1995; 34: 215-234.
- Barnes PJ. NO or no NO in asthma? Res Immunol 1995; 146: 698-702.
- Robbins RA, Barnes OJ, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LDK. Expression of inducible nitric oxide synthase in human bronchial epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1994; 203: 209-218.
- Yates DH, Kharitonov SA, Thomas P, Barnes PJ. Endogenous nitric oxide is decreased in asthmatic patients by an inhibitor of inducible nitric oxide synthase. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 247-250.
- Dostch J, Demirakca S, Terbrack HG, Hulus G, Rascher W, Kuhl P. Airway nitric oxide in asthmatic children and patients with cystic fibrosis. Eur Respir J 1996; 9: 2537-2540.
- Traylor T, Sharm V. Why No? Biochemistry 1992; 31: 2847-2849.