RESEÑA ANALITICA

La producción de óxido nítrico por el endotelio vascular. ¿Cuánto ha cambiado el panorama 15 años después?

Armando Rojas Rubio y Juan Antonio Álvarez Gómez.*

Centro de Rehabilitación Cardíaca, Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Calle B No. 457 entre Calles 19 y 21, El Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba.

Recibido: 20 de enero de 2003. Aceptado: 30 de enero de 2003.

Palabras clave: óxido nítrico, endotelio vascular, sintasas de óxido nítrico, sistema cardiovascular.
Key words: nitric oxide, vascular endothelium, nitric oxide sintases, cardiovascular system.

RESUMEN. En 1987, el óxido nítrico se convirtió en un nuevo y versátil mediador producido por el endotelio. Aunque inicialmente su principal función se enfocó en el control del tono vascular, numerosos estudios han confirmado su destacado papel en la homeostasis vascular, por sus actividades antiadherentes, antiproliferativas y antiinflamatorias. A partir de una visión algo simplista de su síntesis y regulación en el endotelio vascular, se ha generado un cúmulo de nuevos conocimientos que evidencian la elevada complejidad del sistema y cuán obsoletas son hoy día, varias de las consideraciones iniciales.

ABSTRACT. In 1987, nitric oxide became a new and versatile mediator produced by the endothelium. Although its physiological role was mainly focused on vascular tone control, several lines of evidences have confirmed key roles in vascular homeostasis such as its anti adherence, anti proliferative and anti inflammatory properties. Although a simplistic view about its synthesis and regulation was generalized from the very beginning, very convincing knowledge has recently increased about how complex this pathway is and how obsoletes many of the initial considerations are.

INTRODUCCION

En el año 1980, una aguda observación del Dr. Robert Furchgott acerca de los resultados contradictorios obtenidos por sus dos técnicos, le llevó a postular la existencia de un factor relajante derivado del endotelio vascular.¹ No es hasta 1987 en que dos grupos de investigación, liderados por los doctores Salvador Moncada y Louis Ignarro, reportan simultáneamente la identidad química del factor postulado por Furchgott, como óxido nítrico (NO).^{2,3} A partir de este punto, este mediador biológico cobra un auge sin par en la investigación biomédica, soportado por su amplia y novedosa variedad de mecanismos de acción en diferentes sistemas fisiológicos, que lo llevan hasta su protagonismo en el otorgamiento del Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1998.

El objetivo de esta revisión fue brindar una actualización conceptual acerca de la producción de NO por el endotelio vascular, evidenciando cuán compleja es su regulación, así como el alcance que tiene, más allá de su actividad vasorelajante.

DESARROLLO

¿Quién es, de dónde viene y qué hace?

Inicialmente, el NO era considerado como un mero contaminante ambiental producto de la combustión. A partir de los elegantes reportes de Ignarro y Moncada, pasa a convertirse en un mediador biológico con características muy particulares, tales como su naturaleza gaseosa y su libre difusión desde el sitio de producción hasta el de su acción. Este gas se forma a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina, por una familia de enzimas denominadas sintasas de óxido nítrico (SON) que agrupa tres isoformas bien caracterizadas; la SON I (inducible), la SON II (neuronal) y SON III (endotelial), las cuales fueron nombradas sobre la base de la fuente celular a partir de la cual fueron clonadas.⁴ Fue interés de los autores centrar la atención en la SON III, dado que es la responsable de la producción del NO por el endotelio vascular. Este NO, una vez producido, interacciona rápidamente con blancos moleculares localizados en la pared vascular y en el lumen del vaso.⁵ El NO interacciona con grupos tioles y centros metálicos en diversas proteínas, incluyendo receptores de membrana, proteínas G, canales

*Autor para la correspondencia.

iónicos, enzimas citosólicas y factores transcripcionales.⁶

En la pared vascular, el NO activa la guanilato ciclasa soluble en la célula muscular lisa, lo cual conduce a concentraciones elevadas de GMP cíclico (GMPc), hecho que desencadena una cascada de eventos iniciados por la activación de una proteína cinasa dependiente de GMPc y donde el resultado final es la vasorelajación, la cual constituye la base primaria para el control de la presión y el flujo sanguíneo.⁷ Sin embargo, el control del tono vascular ha sido solo el comienzo de todo un conjunto de efectos del NO en la homeostasis vascular, evidenciado por los antiinflamatorio y antiaterogénico; entre los que se puede mencionar, el control de la agregación de las plaquetas,⁸ su capacidad de inhibir la proliferación de las células musculares lisas,⁹ su acción inhibidora sobre la síntesis de matriz extracelular,¹⁰ el control de la expresión de moléculas de adhesión en la célula endotelial,¹¹ la inhibición de la adhesión de neutrófilos y monocitos sobre el endotelio vascular,¹² el control en el endotelio vascular de la activación de factores transcripcionales asociados a la expresión de señales inflamatorias,¹² así como un marcado efecto antioxidante sobre las LDL.¹³

¿Sintasa de óxido nítrico o sintasa de óxidos de nitrógeno?

Hasta el presente, no hay duda alguna acerca de que la L-arginina, el NADPH y el O₂ son sustratos de las SON. El punto de discordia radica en que es lo que sintetizan las SON en general, y la SON III en particular. Hasta hoy día, no existen reportes convincentes de que la citrulina formada sea L o D/L-citrulina, a pesar de la gran tendencia de acotar a la L-citrulina como uno de los productos de la reacción, aunque existen precedentes de otras enzimas que participan en el metabolismo de aminoácidos que avalan la producción de una mezcla de productos a partir de un único isómero de sustrato.¹⁴

El punto de más intenso debate es si realmente las SON en general producen NO o no. Reportar la presencia de NO no significa necesariamente que este sea la especie derivada de nitrógeno inicial, máxime cuando la síntesis de NO es en muchas ocasiones inferidas por productos de degradación o a partir de reacciones con hemoproteínas.¹⁵

Otras especies potenciales, tales como el ion nitroxilo, (NO-) y el peroxinitrito (ONOO-) o sus correspondientes especies protonadas, el HNO y el ONOOH, así como los nitrosioles pueden, teóricamente, formarse inicialmente y el NO ser originado a partir de reacciones posteriores tanto directas como indirectas. De crucial importancia ha sido el hecho de que las SON pueden catalizar, en determinadas circunstancias, una oxidación desacoplada del NADPH y formar superóxido. Sobre la base de la gran velocidad de la reacción del NO con el superóxido, la síntesis de ambas especies por la misma enzima es probable que resulte en la formación de peroxinitrito. En el caso de que el nitroxilo sea un producto de las SON, su reacción con el oxígeno es también capaz de generar peroxinitrito. Por lo pronto, se impone la necesidad de pensar en las SON como sintasas de óxidos de nitrógeno más que como sintasas de óxido nítrico. La formación del anión superóxido se realiza con la participación del grupo hemo del dominio oxigenasa¹⁶ y es dependiente de la presencia de arginina y tetrahidrobiopterina (BH4). En abundancia de ambos factores la SON III produce NO, mientras que en condiciones que impliquen la reducción de las concentraciones de alguno de estos dos factores se genera superóxido.¹⁶

Su estructura tridimensional. Nuevas sorpresas.

Los últimos 5 años han estado matizados de importantes descubrimientos referentes a la comprensión de la estructura de la SON III. Esta, al igual que el resto de las SON, exhibe una estructura de dos dominios, en la cual el de oxigenasa o NH₂-terminal, contiene los sitios de unión para el grupo hemo, BH4 y L-arginina y el de reductasa o C-terminal posee los sitios de unión para el FAD, FMN, y NADPH. El sitio de unión de ambos dominios está determinado por el de reconocimiento de la CaM.

La estructura tridimensional del dominio truncado de la región oxigenasa fue dado a conocer en 1998,¹⁷ aunque hasta el presente no existen reportes de la estructura del dominio, de la región reductasa. Un resultado totalmente inesperado en la estructura cristalina fue un centro de tetratrilato de zinc, ya que la presencia de este metal no había sido detectada por ningún estudio previo. El zinc está tetraédricamente coor-

dinado a las cisteínas 110 y 115 de cada subunidad. El dominio *cis*(Xaa4)*cis* está estrictamente conservada en las secuencias de todas las isoformas y se piensa que sea un sitio óptimo para la inhibición. Este centro ZnS4, esta rodeado de una extensa cavidad con un área molecular de 750 Å y se piensa que represente el sitio de unión de un cofactor no identificado hasta el presente,¹⁸ además de brindar una contribución apreciable en la estabilización de la molécula dimérica. Estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que el aminoácido cisteína en la posición 99 es clave para la estabilidad de la estructura dimérica.¹⁹ Sin embargo, la comparación de los sitios catalíticos de todas las isoformas muestra un nivel elevado de similitud, con la única diferencia de un cambio de aminoácidos en el sitio de unión de la arginina donde existe un Asp en la posición 382 en la SON II y un Asn en la SON III.²⁰ Dado este nivel de similitud, resulta difícil concebir a partir de los datos estructurales actuales, el diseño de inhibidores estrictamente selectivos.

La expresión constitutiva de la SON III. Una visión obsoleta.

Numerosas evidencias experimentales han cambiado radicalmente la concepción de la SON III como un enzima de expresión constitutiva, dado por los numerosos estímulos que son capaces de cambiar su nivel de expresión basal, así como por la identificación y secuenciación de la región reguladora del gen de la SON III. Entre los más importantes elementos capaces de modificar los niveles de expresión se encuentran las fuerzas de cizalla que se generan sobre el endotelio vascular por el flujo de la sangre a través de los vasos.²¹ Al menos, seis elementos de respuesta a esas fuerzas se han identificado en esta región.^{22,23} Además de estos elementos de respuesta, la región promotora del gen de la SON III contiene otros elementos *cis* que incluyen sitios para Sp1 y GATA, elementos de respuesta a estrógenos, factor nuclear-1, AMP cíclico y sitios de unión para activadores de proteína (AP-1 y AP-2).^{23,24} La expresión de la SON III es aumentada por estímulos tan diversos como, agentes que inhiben PKC,²⁵ el estado proliferativo del endotelio,²⁶ peróxido de hidrógeno,²⁷ estrógenos,²⁸ factor de crecimiento del endotelio vascular,²⁹ insulina,³⁰ la forma básica del factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento epidérmico,³¹

el factor transformante del crecimiento tipo β ,³² bajas concentraciones de LDL oxidadas o su principal fosfolípido aterogénico, la lisofosfatidilcolina.³³ Otra amplia lista de factores está involucrada en la disminución de la expresión de la SON III, la cual incluye, TNF- α ,³⁴ eritropoyetina,³⁵ elevadas concentraciones de LDL oxidadas,³⁶ hipoxia³⁷ y productos avanzados de la glicosilación.³⁸ Existe una marcada discrepancia entre cantidades de ARNm, proteína y actividad de la SON III, lo cual demuestra un complejo mecanismo regulador a niveles post-transcripcionales y post-traslacionales. En el primero, un punto crítico de regulación lo constituye la estabilidad del ARNm. Las concentraciones de ARNm representan el balance de una compleja relación entre la transcripción del gen y la degradación del ARNm. La cinética de esta degradación está condicionada por las interacciones de determinadas proteínas con secuencias nucleotídicas en el ARNm, haciéndolo más o menos susceptible a la degradación endonucleotídica.³⁹

Muchos de los elementos que aumentan (VEGF e hipoxia) o disminuyen (TNF y productos avanzados de la glicosilación) la expresión de la SON III tienen su mecanismo de acción a través del incremento o disminución del tiempo de vida media del ARNm de la SON III. En resumen, la expresión de SON III está afectada por varios estímulos que pueden modificar la regulación de la SON III, tanto induciendo cambios en la cinética de transcripción como en la estabilidad del ARNm.

Pasó la transcripción; pero aún sigue el control

Miristilación. A diferencia de otras isoformas, la SON III es sometida a una reacción de acilación con el ácido mirístico sobre un residuo de glicina en su extremo amino terminal. Esta modificación es la responsable de que la SON III sea una enzima asociada a la membrana citoplasmática, a diferencia de las otras isoformas que poseen una localización predominantemente, aunque no exclusivamente, citoplasmática.⁴⁰ La localización topológica de la isoforma en la membrana citoplasmática es un evento crucial para su funcionamiento, ya que le permite un acercamiento espacial a factores requeridos para su funcionamiento tales como, la L-arginina, calcio y BH4.⁴¹ De hecho, estudios realizados con la SON III mutada para el sitio

de unión del ácido palmítico demuestran que esta modificación es requisito absoluto para su asociación con la membrana y desarrollar su actividad catalítica.⁴² Sin esta modificación, la SON III es totalmente citosólica.

Palmitilación. La SON III posee dos residuos de ácido palmítico sobre las cisteínas 15 y 26 de su extremo amino terminal. Esta modificación es reversible y requiere previamente de la miristilación para tener lugar.⁴³ Esta modificación postranslacional estabiliza la asociación de la SON III con la membrana. Tanto la actividad enzimática como la distribución celular de variantes mutadas de SON III para sus sitios de palmitilación están notablemente alteradas aunque la actividad se ve afectada en menor magnitud que aquellas deficientes de los sitios de miristilación.⁴⁴

Fosforilación. La SON III es fosforilada por la acción de la PKA en al treonina 495 y la serina 1177, en un proceso que es independiente de calcio y que resulta en la activación de la SON III, *in vitro*⁴⁵ e *in vivo*.⁴⁶ Recientemente, se ha demostrado que la serina/treonina cinasa (Akt) también fosforila la NOS III en el serina 1177 tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual da lugar a la activación de la enzima.⁴⁷ La activación de la SON III por medio de la fosforilación mediada por la acción de la Akt, es en extremo interesante ya que puede lograr la activación de la SON III en condiciones de muy baja concentraciones de calcio,⁴⁸ posiblemente disminuyendo la constante de disociación de la calmodulina de la SON III.⁴⁹ Aunque algunos reportes indican que la SON III también es fosforilada en residuos de tirosina, este proceso parece estar condicionado con el número de pases *in vitro* durante el cultivo de las células endoteliales, indicando que este proceso puede perderse durante sucesivos pases,⁵⁰ tal y como ha sido avalado por numerosos reportes de diferentes laboratorios que han sido incapaces de detectar fosforilación sobre tirosina en la SON III.⁵¹⁻⁵⁴

Otras cinasas, parecen estar involucradas en la activación de SON III, posiblemente dependiendo del tipo de agonista, tal y como se ha demostrado para algunos miembros de la familia de las MAP cinasas, los cuales representan un papel importante en la activación de la SON III por el estradiol⁵⁵ o durante la activación de la SON III por el VEGF.

Interacción con otras macromoléculas. La calmodulina, solo el comienzo.

La primera proteína a la cual se le demostró una interacción funcional con la SON III fue la calmodulina (CaM),⁵⁶ lo cual explicaba la dependencia de calcio de la SON III para producir óxido nítrico. La interacción con la calmodulina incrementa el transporte electrónico del NADPH hacia el dominio reductasa y de este hacia el grupo hemo. Recientemente, se ha reportado que existe una secuencia en el extremo carboxi terminal del dominio reductasa que gobierna la síntesis de NO y la dependencia de calcio en la activación de la enzima por CaM. La modificación de esta secuencia se produce vía fosforilación, la cual origina cambios estructurales que favorecen el flujo de electrones a través del dominio reductasa.⁵⁷

Aunque inicialmente la única interacción descrita con otra proteína para la SON III fue con la calmodulina, nuevas interacciones han visto la luz en años recientes, y todas ellas son responsables de regular de alguna forma la actividad de la enzima. La estimulación por bradicinina de las células endoteliales produce una marcada interacción con una proteína fosforilada de 90 kD denominada ENAP-1.⁵⁸ Hasta el presente, no se sabe si esta interacción es directa o indirecta o si ENAP-1 se asocia a la misma fracción celular, a la cual se transloca la SON III por la estimulación con bradicinina. Otra proteína para la cual se ha demostrado interacción con SON III es la de choque térmico de 90 kD, Hsp90,⁵⁹ perteneciente a la familia de proteínas de choque térmico, las cuales afectan la actividad y función de otras proteínas actuando como "chaperonas" moleculares.⁶⁰ La unión de la Hsp90 a la SON III se ha reportado en respuesta a estímulos tan diversos como histamina, VEGF, fuerzas de cizalla, etc. y se postula que su mecanismo de acción consiste en facilitar el desplazamiento, mediado por calmodulina, de la caveolina-1 de la SON III,⁶¹ interacción que es expuesta más adelante. Finalmente, aunque con resultados contradictorios, no por ello menos interesantes, se ha reportado la interacción de SON III con fosfolípidos, en particular, con especies aniónicas como la fosfatidilcolina con la que se provoca tanto aumentos o reducciones de la actividad enzimática.^{62,62} Si la asociación con fosfolípidos posee alguna relevancia fisiológica, debe de ser

dilucidada en el futuro, Tal vez, los fosfolípidos puedan prevenir la activación de la SON III en el sitio equivocado como pudiera ser el complejo de Golgi.

El momento oportuno, pero en el lugar adecuado.

Numerosos estudios indican que la localización de la SON III dentro de la célula determina su actividad y en particular, la caveola representa un papel crucial en el control de la actividad de la SON III. Los principales componentes de la caveola son colesterol, glicosfingolípidos y algunas proteínas estructurales como la caveolina-1.^{63,64} La localización de la SON III dentro de la caveola la mantiene inactiva por medio de la interacción de la caveolina-1 con la SON III.⁶⁵ Esta interacción, la cual tiene su localización estructural entre los aa 350 y 358 del dominio oxigenasa de la SON III, reduce marcadamente la actividad de esta interfiriendo con la unión de la calmodulina a bajas concentraciones de calcio.^{65,66} La localización de la SON III en la caveola representa numerosas ventajas, entre las que se puede señalar la interacción con el receptor de bradicinina y con el transportador del amino ácido L-arginina, cat-1. Los receptores para estrógeno y VEGF también colocalizan en la caveola, al igual que una bomba de calcio,⁶⁷⁻⁶⁹ lo cual facilita, sin lugar a dudas, la función de la enzima. Aunque la SON III caveolar es inactiva *per se*, la localización en la caveola es un elemento imprescindible para que la SON III pueda activarse.

De la ciencia básica a la clínica.

A pesar del tremendo impacto que tuvo la dilucidación mecanismo que controla la vasorelajación, el paso de los años ha evidenciado la participación del NO en la patofisiología de varias entidades, o procesos, con importancia clínica para al sistema cardiovascular.

Precondicionamiento isquémico (PC). En el año 1993, dos grupos de investigadores por separado^{70,71} descubrieron la reaparición de un efecto cardioprotector 24 h después de un evento isquémico miocárdico, al cual nombraron fase tardía del PC o Segunda Ventana. Este evento ha acaparado la atención de los investigadores en los últimos años, por su potencial explotación clínica, propiciada por su ventana de protección de 2 a 3 d, su efecto en la reducción del área de infarto y su efecto anti-atontamiento cardíaco.^{72,73} La fun-

ción de un iniciador de la Segunda Ventana del PC radica en avisar al miocardio de un peligro inminente, por lo que actúa esencialmente como un sistema de alarma celular para que el miocardio responda, cambiando hacia un fenotipo defensivo. Varios estudios han evidenciado que el NO es un iniciador de la Segunda Ventana.^{74,75} La fuente del incremento de NO durante el PC es la SON III,⁷⁶ la cual ha sido identificada no solo en células endoteliales sino también en el propio cardiomiocito.⁷⁷ De particular interés son los reportes de que la administración de nitroglicerina puede mimetizar la Segunda Ventana del PC, tanto por vía intravenosa o transdermal,^{78,79} independientemente del desarrollo o no de tolerancia a los nitratos, lo cual soporta la posibilidad de nuevas aplicaciones clínicas de estos fármacos. De igual forma, la inducción de la segunda ventana del PC, por medio de pruebas de esfuerzo en pacientes con coronariopatías brinda nuevos avales a la potencialidad clínica de este proceso.⁸⁰

Hipertensión arterial. El desarrollo de hipertensión arterial es un hecho bien estudiado en modelos animales tanto por la inhibición farmacológica a largo plazo de la síntesis de NO, o por la interrupción del gen de la SON III.⁸⁰ Sin embargo, el control de la presión arterial es un proceso multifactorial que comprende numerosas y en ocasiones, no muy bien comprendidas interacciones de diferentes sistemas, pero que en términos generales debe considerarse como un balance entre factores constrictores y vasorelajantes y no tratar de sobreestimar los valores individuales de cada factor. De hecho, el desarrollo de hipertensión en los modelos animales antes mencionadas no es estrictamente dependiente de la producción de NO, ya que ambas condiciones propician el aumento en la síntesis de angiotensina II, y TGF beta, los cuales redundan en un aumento del daño glomerular en el riñón, así como remodelación coronaria, hipertrofia de ventrículo izquierdo e hipertensión *per se*.^{81,82} Dentro de estas interacciones, la relación entre el sistema L-arginina-NO y el sistema renina-angiotensina II ha cobrado especial interés en el último lustro.⁸³ El NO es capaz de reprimir no solo la síntesis de la enzima convertidora de angiotensina, sino también, de los receptores tipo 1 de la angiotensina II, y así controlar potencialmente, tanto la producción como la acción de la Ang II.^{84,85}

Finalmente, los autores desean puntualizar un elemento acerca de la predisposición genética a la hipertensión para la cual, aunque no muy bien definida, se está produciendo una acumulación de evidencias que sugieren un sólida transmisión genética. En tal sentido, se han reportado al menos tres polimorfismos en el gen de la SON III.⁸⁶ De especial interés es el polimorfismo producido por el cambio de timidina por guanina en la posición 894 del exon 7,⁸⁷ lo cual da lugar al cambio de glutámico por asparagina en la posición 298 de la estructura de la SON III, en particular, en el dominio del grupo hemo. Este cambio está asociado desde el punto de vista bioquímico, a una disminución de la producción basal de SON por la enzima, lo cual pudiera explicar su contribución al desarrollo de un fenotipo hipertensivo.

Aterosclerosis. El NO desempeña un papel significativo en la aterogénesis. El proceso aterosclerótico está asociado con una reducida producción de NO por el endotelio; incluso en pacientes con coronariopatías, segmentos angiográficamente normales muestran una contracción paradójica a la acetilcolina,⁸⁸ lo cual sugiere que alteraciones en la funcionalidad del endotelio, en términos de producción o biodisponibilidad de NO, precede la progresión hacia lesiones más avanzadas.

Varios estudios han demostrado alteraciones en los niveles de expresión de la SON III y liberación de NO en arterias con lesiones ateroscleróticas clínicamente relevantes.⁸⁹ En células endoteliales tratadas *in vitro* con LDL oxidadas, la activación por calcio-calmodulina de la SON III está seriamente alterada, posiblemente por un incremento en la expresión de caveolina-1, lo cual reduce en un incremento del complejo caveolin-1-SON III.^{90,91}

Con relación a los efectos de las lipoproteínas sobre la expresión de SON III, diversos estudios *in vitro* han demostrado que las concentraciones de ARNm de la SON III disminuyen notablemente por la exposición a concentraciones aterogénicas de LDL.⁹² Estos hallazgos pueden tener importantes implicaciones, ya que brindan un mecanismo por el cual la hipercolesterolemia induce cambios tempranos en la funcionalidad de la SON III, que pudieran tener significación en la patofisiología del proceso aterosclerótico.

Terapia génica. Algo más que una quimera.

La terapia génica tiene por objetivo intervenir en un proceso patológico para detener o revertir hacia el estado normal un tejido u órgano a través de la transferencia y expresión de genes específicos. En los últimos diez años, las SON, y la SON III en particular, han recibido considerable atención como un candidato para la terapia génica en el sistema cardiovascular. En particular, los más importantes avances se han logrado en el restablecimiento de la función vasomotora y en el control de la hiperplasia de la íntima. Sin embargo, aunque los estudios en animales han demostrado resultados impactantes, los vectores para la transferencia disponibles hasta el presente deben superar algunas limitaciones técnicas y de seguridad para acometer una terapia génica eficiente y segura en el sistema cardiovascular humano. Las potencialidades de la SON III son indiscutibles.

Función vasomotora. La habilidad para restaurar las funciones vasomotoras en arterias disfuncionales representa un excelente escenario para evaluar la efectividad de la transferencia del gen de la SON III. La transferencia *ex vivo* del gen de la SON III en arterias de conejos hipercolesterolémicos,⁹³ arterias coronarias de puerco⁹⁴ y vena safena humana⁹⁵ mejora marcadamente la relajación vascular inducida por una serie de agonistas vasoactivos. *In vivo*, la transferencia del gen de la SON III también ha logrado restaurar o aumentar la vasorelajación mediada por NO en varios modelos incluyendo arterias normales,⁹⁶ vasos ateroscleróticos,⁹⁷ o en vasos dañados durante el procedimiento de angioplastia.⁹⁸

Hiperplasia de la íntima. Desde hace muchos años, se conoce que los donantes de NO o los compuestos que incrementan el GMPc intracelular inhiben la proliferación⁹⁹ y la migración de las células musculares lisas,¹⁰⁰ así como la síntesis de colágeno,¹⁰¹ todos elementos clave en la hiperplasia de la íntima. La inhibición de esta hiperplasia ha sido lograda por medio de la transferencia del gen de la SON III en varios modelos de daño vascular,¹⁰²⁻¹⁰⁴ principalmente a través de su efecto citostático sobre las células musculares lisas.

CONCLUSIONES

En algo más que una década, el conocimiento acerca de los pormenores de la producción de NO por el

endotelio vascular ha cambiado abruptamente, al extremo de que muchas de las concepciones de aquel entonces hoy resultan obsoletas o están en pleno proceso de cambio. Este vertiginoso cambio no solo demuestra cuán sorprendente y versátil es este mediador biológico, conservado a través de millones de años de evolución, sino además, cuánto ha cambiado el conocimiento de la vía metabólica de la L-arginina-óxido nítrico una vez que ha sido abordado por una ciencia cada vez más cerca de las bases moleculares de la propia vida.

BIBLIOGRAFIA

- Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle acetylcholine. **Nature**, **288**, 373, 1980.
- Palmer R.M.J., Ferrige AG., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. **Nature**, **327**, 524, 1987.
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **84**, 9265, 1987.
- Alderto, W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **J. Biochem.**, **357**, 593, 2001.
- Moncada S. and Higgs E.A. The L-arginine-nitric pathway. **N. Engl. J. Med.**, **329**, 2002, 1993.
- Stamler J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, **78**, 931, 1994.
- Umans J.G., Levi R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. **Annu. Rev. Physiol.**, **57**, 771, 1995.
- Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion molecules to vascular endothelium. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **148**, 1482, 1987.
- Garg U.C., 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.**, **83**, 1774, 1989.
- Kolpakov V., Gordon D., Kulik T.J. Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, **76**, 305, 1995.
- De Caterina R., Libby P., Peng H.B., Thannickal V.J., Rajavashisth T.B., Gimbrone M.A. Jr, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J. Clin. Invest.**, **96**, 60, 1995.
- Gauthier T.W., Scalia R., Murohara T., Guo J.P., Lefer A.M. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **15**, 1652, 1995.
- Heinecke J.W. Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.**, **8**, 268, 1997.
- Stuehr D.J., Kwon N.S., Nathan C.F., Griffith O.W., Feldman P.L. and Wiseman J. N-omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **J. Biol. Chem.**, **266**, 6259, 1991.
- Tarpey M.M. and Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species. **Cir. Res.**, **98**, 224, 2001.
- Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martasek P., Hogg N., Masters B.S., Karoui H., et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**, 9220, 1998.
- Raman C.S., Li H., Martasek, P., Kral V., Master, B.S. and Poulos T. L. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. **Cell**, **95**, 939, 1998.
- Li H., Raman C.S., Glaser C.B., Blasko E., Young T.A., Parkinson J. F., et al. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, **274**, 1276, 1999.
- Chen P.F., Tsai A.L., and Wu K.K. Cysteine 99 of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) is critical for tetrahydrobiopterin-dependent NOS-III stability and activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **215**, 1119, 1995.
- Fischmann T.O., Hruza A., Niu X.D., Fossetta J.D., Lunn C.A., Dolphin E. et al. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. **Nat. Struct. Biol.**, **6**, 233-242, 1999.
- Fisher A.B., Chien S., Bakarat A., Neren, R. Endothelial cellular response to altered shear stress. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, **281**, L529, 2001.
- Nishida K, Harrison D.G., Navas J.P, Fisher A.A., Dockery S.P, Uematsu M., et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. **J. Clin. Invest.**, **90**, 2092, 1992.
- Noris M., Morigi M, Donadelli R., Aiello S., Poppolo M., Todeschini M., et al. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. **Circ. Res.**, **76**, 536, 1995.
- Sessa W.C., Harrison J.K, Barber C.M., Zeng D, Durieux M.E., D'Angelo D.D., Lynch K.R., and Peach M.J. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, **267**, 15274, 1992.
- Ohara Y., Sayegh H.S., Yamin J.J., and Harrison D.G. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide syn-

- thase by protein kinase C. **Hypertension**, **25**, 415, 1995.
26. Arnal J.F., Yamin J., Dockery S, and Harrison D.G. Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, **267**, C1381, 1994.
 27. Drummond G.R, Cai H., Davis M.E., Ramasamy S., and Harrison D.G. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. **Circ. Res.**, **86**, 347, 2000.
 28. Tan E.Q., Gurjar M.V., Sharma R.V., and Bhalla R.C. Estrogen receptor-alpha gene transfer into bovine aortic endothelial cells induces eNOS gene expression and inhibits cell migration. **Cardiovasc. Res.**, **43**, 788, 1999.
 29. Kroll J. and Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **252**, 743, 1998.
 30. Kuboki K., Jiang Z.Y., Takahara N., Ha S.W., Igarashi M., Yamauchi T., *et al.* Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and *in vivo*: a specific vascular action of insulin. **Circulation**, **101**, 676, 2000.
 31. Zheng J., Bird I.M., Melsaether A.N., and Magness R.R. Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is necessary but not sufficient for basic fibroblast growth factor- and epidermal growth factor-stimulated expression of endothelial nitric oxide synthase in ovine fetoplacental artery endothelial cells. **Endocrinology**, **140**, 1399, 1999.
 32. Inoue N., Venema R.C., Sayegh H.S., Ohara Y., Murphy T.J., and Harrison D.G. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **15**, 1255, 1995.
 33. Zembowicz A., Tang J.L., and Wu K.K. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine. **J. Biol. Chem.**, **270**, 17006, 1995.
 34. Yoshizumi M., Perella, M., Burnett, J. Lee M.E. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. **Cir. Res.**, **73**, 205, 1993.
 35. Wang X.Q. and Vaziri N.D. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. **Hypertension**, **33**, 894, 1999.
 36. Laufs U., La Fata V., Plutzky J., and Liao J.K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. **Circulation**, **97**, 1129, 1998.
 37. McQuillan L.P., Leung G.K., Marsden P.A., Kostyk S.K, and Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, **267**, H1921, 1994.
 38. Rojas A., Romay S., González D., Herrera B., Delgado R., Otero K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by derived-advanced glycosylation end products. **Cir. Res.**, **86**, 50, 2000.
 39. Sachs A.B. Messenger RNA degradation in eukaryotes. **Cell**, **74**, 413, 1993.
 40. Liu J., Garcia-Cardena G., and Sessa W.C. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. **Biochemistry**, **34**, 12333, 1995.
 41. Wu K.K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, **962**, 140, 2002.
 42. Sakoda T., Hirata K., Kuroda R., Miki N., Suematsu M., Kawashima S., and Yokoyama M. Myristoylation of endothelial cell nitric oxide synthase is important for extra cellular release of nitric oxide. **Mol. Cell Biochem.**, **152**, 143, 1995.
 43. Liu J., Garcia-Cardena G., and Sessa W.C. Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. **Biochemistry**, **35**, 13277, 1996.
 44. Shaul PW, Smart E.J., Robinson L.J., German Z., Yuhanna I.S., Ying Y., *et al.* Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. **J. Biol. Chem.**, **271**, 6518, 1996.
 45. Chen Z.P, Mitchellhill K.I., Michell B.J., Stapleton D., Rodriguez-Crespo I., Witters L.A., *et al.* AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. **FEBS Lett.**, **443**, 285, 1999.
 46. Toyoshima H., Nasa Y., Hashizume Y., Koseki Y., Isayama Y., Kohsaka Y., *et al.* Modulation of cAMP-mediated vasorelaxation by endothelial nitric oxide and basal cGMP in vascular smooth muscle. **J Cardiovasc. Pharmacol.**, **32**, 543, 1998.
 47. Fulton D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y, Walsh K., *et al.* Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, **399**, 597, 1999.
 48. McCabe T.J., Fulton D., Roman L.J., and Sessa W.C. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, **275**, 6123, 2000.
 49. Michel J.B., Feron O., Sacks D., and Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. **J. Biol. Chem.**, **272**, 15583, 1997.
 50. Garcia-Cardena G., Fan R, Stern D.F., Liu J., and Sessa W.C. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. **J. Biol. Chem.**, **271**, 27237, 1996.
 51. Corson M.A., James N.L., Latta S.E., Nerem R.M., Berk B.C., and Harrison D.G. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. **Circ. Res.**, **79**, 984, 1996.
 52. Couet J., Li S., Okamoto T., Ikezu T., and Lisanti M.P. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. **J. Biol. Chem.**, **272**, 6525, 1997.
 53. Venema V.J., Marrero M.B., and Venema R.C. Bradykinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation promotes endothelial nitric oxide synthase translocation to the cytoskeleton. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **226**, 703, 1996.
 54. Venema V.J., Zou R., Ju H., Marrero M.B., and Venema R.C. Caveolin-1 detergent solubility and association with endothelial nitric oxide synthase is modulated by tyrosine phosphorylation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **236**, 155, 1997.
 55. Chen Z., Yuhanna I.S., Galchevagarova Z., Karas R.H., Mendelsohn R.E., and Shaul P.W. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. **J Clin. Invest.**, **103**, 401, 1999.
 56. Ohara Y., Sayegh H.S., Yamin J.J., and Harrison D.G. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C. **Hypertension**, **25**, 415, 1995.
 57. Lan P. and Gross S.S. Disabling a c-terminal autoinhibitory control element in NOS III by phosphorylation provides a molecular explanation of NO synthesis by diverse physiological stimuli. **J. Biol. Chem.**, **277**, 19087, 2002.
 58. Venema R.C., Sayegh H.S., Arnal J.F., and Harrison D.G. Role of the enzyme calmodulin-binding domain in membrane association and phospholipid inhibition of endothelial nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, **270**, 14705, 1995.
 59. Garcia-Cardena G., Fan R., Shah V., Sorrentino R., Cirino G, Papapetropoulos A. *et al.* Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. **Nature**, **392**, 821, 1998.
 60. Walsh D., Grantham J., Zhu X.O. Wei L.J. van Oosterum M., Taylor R. *et al.* The role of heat shock proteins in mammalian differentiation and development. **Environ. Med.**, **43**, 79, 1999.
 61. Gratton J.P., Fontana J., O'Connor D.S., Garcia-Cardena G., McCabe T.J., and Sessa W.C. Reconstitution of an endothelial nitric oxide synthase, hsp90 and caveolin-1 complex *in vitro*: evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. **J. Biol. Chem.**, **275**, 22268, 2000.
 62. Ohashi Y., Katayama M., Hirata K., Sumatsu M., Kawashima S., and Yokoyama M. Activation of nitric oxide synthase from cultured aortic endothelial cells by phospholipids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **195**, 1314, 1993.
 63. Smart E.J., Graf G.A., McNiven M.A., Sessa W.C., Engelman J.A., Scherer P.E., *et al.* Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. **Mol. Cell Biol.**, **19**, 7289, 1999.

64. Parton R.G. Caveolae and caveolins. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, **8**, 542, 1996.
65. Ju H., Zou R., Venema V.J., and Venema R.C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. **J. Biol. Chem.**, **272**, 18522, 1997.
66. Michel J.B., Feron O, Sacks D., and Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca 21-calmodulin and caveolin. **J. Biol. Chem.**, **272**, 15583, 1997.
67. Kim H.P., Lee J.Y., Jeong J.K., Bae S.W., Lee H.K., and Jo I. Non genomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **263**, 257, 1999.
68. Feng Y., Venema V.J., Venema R.C., Tsai N., Behzadian M.A., and Caldwell R.B. VEGF-induced permeability increase is mediated by caveolae. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **40**, 157, 1999.
69. Fujimoto T. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. **J. Cell. Biol.**, **120**, 1147, 1993.
70. Marber M.S., Latchman D.S., Walker J.M., Yellon D.M. Cardiac Stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. **Circulation**, **88**, 1264, 1993.
71. Kuzuya T., Hoshida S., Yamashita N., Fuji H., Oe H., Hori M., et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. **Cir. Res.**, **72**, 1293, 1993.
72. Baxter G.F., Goma F., Yellon D.M. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: time-course and dose-dependency studies in rabbit myocardium. **Basic Res. Cardiol.**, **92**, 159, 1997.
73. Punn A., Mockridge J.W., Farooqui S., Marber M.S., Heads R.J. Sustained activation of p 42 /p44mitogen-activated protein kinase during recovery from simulated ischemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes. **Biochem. J.**, **350**, 891, 2000.
74. Bolli R., Bhatti Z.A., Tang X-L, Qiu Y., Zhang Q., Guo Y., Jadoon A.K. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. **Circ. Res.**, **81**, 42, 1997.
75. Qiu Y., Rizvi A., Tang X-L., Manchikalapudi S., Takano H., Jadoon A.K., et al. Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. **Am. J. Physiol.**, **273**, H2931, 1997.
76. Downey M.J., Cohen M.V. Preconditioning: What it is and how it works. **Dialogues in Cardiovascular Medicine**, **2**, 179, 1997.
77. Kelly R.A., Balligand J.L., Smith T.W. Nitric oxide and cardiac function. **Circ. Res.**, **79**, 363, 1996.
78. Takano H., Tang X-L., Qiu Y., Guo Y., French B.A., Bolli R. Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant sensitive mechanism. **Circ. Res.**, **83**, 73, 1998.
79. Massoud A., Lessar M.D., Marcus F, Stoddard V.M., Dawn B.D., Venus, G., et al. Delayed preconditioning-mimetic action of nitroglycerin in patients undergoing coronary angioplasty. **Circulation**, **103**, 2935, 2001.
80. Álvarez J.A., Rivas E., Stusser R.J., Hernandez-Cañero A., García-Barreto D., Barrera D., Hernández R, Rojas A. Evidence for ischemic Preconditioning Induced by Exercise in patients with Coronary Disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, **39**, 2669, 2002.
81. Baylis C., Harvey J., Engels K. Acute nitric oxide blockade amplifies the renal vasoconstrictor actions of angiotensin II. **J. Am. Soc. Nephrol.**, **5**, 211, 1994.
82. Bataineh A., Raj L. Angiotensin II, nitric oxide, and end-organ damage in hypertension. **Kidney Int.**, **68**, 14, 1998.
83. Raj L. Role of angiotensin II nitric oxide interaction. **Hypertension**, **37**, 767, 2001.
84. Ichiki T., Usui M., Kato M., Funakoshi Y., Ito K., Egashira K. et al. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. **Hypertension**, **31**, 342, 1998.
85. Usui M., Ichiki T., Katoh M., Egashira K., Takeshita A. Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland. **Hypertension**, **32**, 527, 1998.
86. Hingorami A.D. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase. **Atherosclerosis**, **154**, 521, 2001.
87. Veldmon B.A., Spiering W, Doevendans P.A., Vervoort G., Kroon A.A., Smits P. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene is a determinant of the baseline production of nitric oxide. **J. Hypertension**, **20**, 2023, 2002.
88. Ludmer P.L., Selwyn A.P., Shook T.L., Wayne R.R., Mudge G.H., Alexander R.W. et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. **N. Engl. J. Med.**, **315**, 1046, 1986
89. Oemar B.S., Tschudi M.R., Godoy N., Brovkovich V., Malinski T., Luscher T.F. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. **Circulation**, **97**, 2494, 1998.
90. Feron O., Dessy C., Moniotte S., Desager J.P., Balligand J.L. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. **J. Clin. Invest.**, **103**, 897, 1999.
91. Blair A., Shaul P.W., Yuhanna I.S., Conrad P.A., Smart E.J. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. **J. Biol. Chem.**, **274**, 32512, 1999.
92. Vidal F., Colomé C., Martínez-González J., Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins downregulate nitric oxide synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. **Eur. J. Biochem.**, **252**, 378, 1998.
93. Mozes G., Kullo I.J., Mohacsi T.G., Cable D.G., Spector D.J., Crotty T.B., et al. Ex vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to atherosclerotic rabbit aortic rings improves relaxations to acetylcholine. **Atherosclerosis**, **141**, 265, 1998.
94. Cable D.G., O'Brien T., Kullo I.J., Schwartz R.S., Schaff H.V., Pompili V.J. Expression and function of a recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in porcine coronary arteries. **Cardiovasc. Res.**, **35**, 553, 1997.
95. Cable D.G., O'Brien T., Schaff H.V., Pompili V.J. Recombinant endothelial nitric oxide synthase transduced human saphenous veins: gene therapy to augment nitric oxide production in bypass conduits. **Circulation**, **96**, 173, 1997.
96. Kullo I.J., Mozes G., Schwartz R.S., Gloviczki P., Tsutsui M., Katusic Z.S., O'Brien T. Enhanced endothelium-dependent relaxations after gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to rabbit carotid arteries. **Hypertension**, **30**, 314, 1997.
97. Channon K.M., Qian H.S., Neplioueva V., Blazing M.A., Olmez E., Shetty G.A., et al. *In vivo* gene transfer of nitric oxide synthase enhances vasomotor function in carotid arteries from normal and cholesterol-fed rabbits. **Circulation**, **98**, 1905, 1998.
98. Von der Leyen H.E., Gibbons G.H., Morishita R., Lewis N.P., Zhang L., Nakajima M., et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: *in vivo* transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **92**, 1137, 1995.
99. Garg U.C., 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.**, **83**, 1774, 1989.
100. Sarkar R., Meinberg E.G., Stanley J.C., Gordon D., Webb R.C. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, **78**, 225, 1996.
101. Kolpakov V., Gordon D., Kulik T.J. Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, **76**, 305, 1995.
102. Shears L.L., Kibbe M.R., Murdock A.D., Billiar T.R., Lizonova A., Kovesdi I., et al. Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs *in vivo*. **J. Am. Coll. Surg.**, **187**, 295, 1998.
103. Shears L.L., Kawaharada N., Tzeng E., Billiar T.R., Watkins S.C., Kovesdi I., et al. Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis. **J. Clin. Invest.**, **100**, 2035, 1997.
104. Tsao P.S., Wang B., Buitrago R., Shyy J.Y., Cooke J.P. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. **Circulation**, **96**, 934, 1997.