

Efectos glomerulares del óxido nítrico

L. Rivas-Cabañero, M. Criado-Jiménez, J. M. Valdivielso y J. M. López-Novoa

Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca, Salamanca (España).

Introducción

El endotelio produce y libera distintos agentes vasoactivos que regulan el tono del músculo liso vascular, la función yuxtaglomerular, mesangial y posiblemente también la de las células tubulares^{1,2}. Uno de estos agentes es una molécula lábil, el llamado EDRF o factor relajante derivado de endotelio, descrito por Furchgott y Zawadzki en 1980³ y que ha sido identificado como óxido nítrico (NO), aunque estudios recientes han cuestionado la exacta composición química del EDRF. Nuevas evidencias que demuestran que la vasculatura mantiene una cierta producción de NO en situación basal ha incrementado el interés por este mediador⁴.

El NO es un gas incoloro ligeramente soluble en medio acuoso, que contiene un número impar de electrones, y por tanto, es un radical libre. Puede actuar tanto como agente oxidante o como agente reductor, pero se caracteriza por su baja reactividad química⁵. El NO se distingue por su corta vida media y por su habilidad para difundir libremente por las membranas celulares. Estas características hacen de esta molécula un buen candidato para ejercer su acción de forma autocrina o paracrina, aunque su corta vida media se opone a que pueda ser considerado como una hormona importante⁴.

El NO se sintetiza en varios tipos de células (endoteliales, macrófagos y tejido nervioso, preferentemente)⁶⁻⁸ a partir del extremo amino terminal de la L-arginina, formándose también una molécula de L-citrulina^{9,10}.

La generación del NO a partir de L-arginina^{11,12} está catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS), de la que existen al menos tres tipos principales de isoformas^{12,13}. En 1991, Bredt y cols.¹⁴ fueron los primeros en publicar el clonaje molecular de la NOS, señalando la existencia de tres sitios de unión para tres cofactores oxidativos (NADPH, FAD, FMN), así como

la secuencia consenso para un sitio de unión a la calmodulina. La secuencia carboxi terminal de la NOS recuerda a la citocromo P-450 reductasa, y de hecho, como se ha visto recientemente, la NOS cerebral puede funcionar como una citocromo P-450 reductasa¹⁵. En 1992, Lamas y cols. publicaron la caracterización de una isoforma constitutiva diferente a la de las células endoteliales¹⁶. La NOS del cerebro y la de las células endoteliales son idénticas en un 60 % a nivel de composición de aminoácidos. Ambas enzimas son constitutivas y se activan por aumentos de calcio en el citosol^{17,18}. Este catión se une a la calmodulina¹⁹, siendo este complejo el que activa la NOS. Se ha clonado un tercer tipo de NOS por dos grupos de trabajo^{20,21} a partir de los macrófagos, y parece ser idéntica en un 51 y 50 % a la del cerebro y a la de las células endoteliales, respectivamente. A diferencia de las NOS de cerebro y del endotelio, la NOS aislada de los macrófagos no es constitutiva, pero se induce por endotoxinas bacterianas y por τ -interferón, y es calcio independiente. Además de la L-arginina, la NOS necesita O₂, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavin adenina dinucleótido (FAD), flavin mononucleótido (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH₄) como cofactores.

La sustitución de uno o los dos átomos de nitrógeno del grupo guanidino terminal (N⁶) de la L-arginina origina análogos que antagonizan competitivamente la NOS²². De ellos, los más utilizados son la NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), la N⁶-L-arginina-metil-éster (L-NAME) y el N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO).

La hidrocortisona y dexametasona inhiben la expresión de la enzima inducible mediante un mecanismo que implica la inhibición de la síntesis de RNAm.

La formación basal de NO puede modular la reactividad vascular. De hecho, la presencia del endotelio inhibe las contracciones inducidas por norepinefrina, serotonina y endotelina, y esta inhibición se previene en gran parte por L-NMMA^{1,23,24}. De forma análoga, la infusión de L-NMMA aumenta mucho la resistencia vascular periférica²⁵ y la presión sanguínea²⁶, lo que indica que el NO toma parte en la regu-

Correspondencia: Prof. J. M. López-Novoa.
Departamento de Fisiología y Farmacología.
Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca.
Avenida Campo Charro, s/n.
37007 Salamanca, (España).

lación de la presión sanguínea. Por lo tanto, el NO es un potente vasodilatador endógeno que, como mediador biológico, tiene dos papeles fisiológicos relevantes: la comunicación intercelular y la citotoxicidad. Además puede actuar sobre las plaquetas adheridas en la luz de los vasos sanguíneos inhibiendo la agregación y la adhesión plaquetaria²⁷⁻²⁹, teniendo un importante papel como anticoagulante^{27, 30-32}.

Las propiedades paramagnéticas de NO (número impar de electrones) contribuyen a que tenga gran afinidad por el grupo hemo³³, lo que explica que el NO se una a dicho grupo de la guanilato ciclasa. Esta unión provoca un incremento de la producción de GMPc en las células diana³⁴. Los mecanismos sugeridos por los cuales el GMPc produce vasorrelajación incluyen la modulación GMPc dependiente de las proteínas quinasas, de la fosforilación/defosforilación de las cadenas ligeras de miosina y del control de la homeostasis del calcio intracelular³⁵.

Los efectos hemodinámicos del NO y de su inhibición han sido revisados en varias ocasiones³⁶. Nosotros queremos revisar el papel del NO en la función renal y, más específicamente, en la función glomerular.

Oxido nítrico y función renal

El papel del NO en la función renal se ha estudiado mediante la inhibición de su síntesis o mediante su estimulación. En los estudios realizados inhibiendo su síntesis se ha observado que la administración de bajas dosis de L-NAME no modifica los niveles basales de flujo sanguíneo renal ni del filtrado glomerular. Del mismo modo, la administración intrarenal de un inhibidor de síntesis de NO distinto, el L-NMMA, no modifica la hemodinámica renal de forma importante^{37, 38}. Sin embargo, no se puede concluir que el L-NAME no tiene efecto sobre el tono basal renal, ya que hay evidencias que muestran que el efecto de la inhibición del NO sobre la hemodinámica renal, y sobre la natriuresis está ampliamente determinado por la dosis de antagonista y por la duración de la infusión³⁸. La administración intravenosa de bajas dosis de L-NAME produce a corto plazo una pronunciada y selectiva disminución de la diuresis y de la natriuresis, mientras que se necesitan períodos de infusión más largos o dosis mucho mayores de L-NAME para disminuir el flujo sanguíneo renal y el filtrado glomerular³⁹.

En los estudios realizados en presencia del sustrato de síntesis de NO, L-arginina, se ha comprobado que cuando se administra intrarenalmente sola o junto con L-NMMA no se altera ni la natriuresis, ni la diu-

resis, ni el flujo sanguíneo renal, ni el filtrado glomerular. La L-arginina es capaz de mejorar el filtrado glomerular en situaciones en las que está previamente disminuido, pero en situaciones basales no muestra ningún efecto, ni es capaz de aumentar la vasodilatación producida previamente por vasodilatadores endotelio dependientes (acetilcolina...) ³⁷. En riñón aislado de rata preconstreñido con noradrenalina⁴⁰, la L-arginina causa una respuesta bifásica, caracterizada por vasoconstricción seguida de acción vasodilatadora. La respuesta vasodilatadora desaparece y la respuesta constrictora aumenta tras retirar químicamente el endotelio con un detergente, el 3,3-colamidopropil dimetilamonio 1-propanosulfonato.

Se ha sugerido la posible participación del NO en la respuesta autorreguladora⁴¹, ya que el mantenimiento del flujo sanguíneo renal durante la vasoconstricción está acompañado de un incremento progresivo en la velocidad del flujo sanguíneo y en el «shear stress»⁴², por lo que se ha propuesto que el NO podría modular el incremento en la resistencia renovascular y que tal efecto debería ser más señalado a altos que a bajos niveles de presión de perfusión renal (PPR)⁴¹. Tal afirmación se basa en un estudio⁴³ en el que la administración intravenosa de grandes dosis de un inhibidor distinto, el L-NMMA, produjo un importante descenso en el flujo sanguíneo renal en riñones perfundidos con una baja PPR, pero no alteró el flujo sanguíneo renal cuando se infundía a alta PPR. Todo esto puede indicar que la producción de NO involucrada en la regulación de la excreción de sodio por el mecanismo de presión-natriuresis tiene un bajo umbral de inhibición; esto involucra al NO en la regulación de las resistencias vasculares renales.

Efectos sobre el glomérulo

El tejido glomerular es órgano diana para gran variedad de hormonas vasoactivas que ejercen una influencia considerable en los procesos de filtración, al menos en parte por la modulación de las resistencias vasculares pre y postglomerulares. La naturaleza dinámica de la microcirculación renal, que permite al glomérulo adaptarse a una gran variedad de condiciones, deriva de la disponibilidad tanto de mediadores vasodilatadores como vasoconstrictores, cuyo equilibrio determina finalmente la resistencia vascular renal.

Efecto sobre las arteriolas glomerulares

Las resistencias arteriolas glomerulares se incrementan por infusión de L-NMMA, pero este efecto

está distribuido de forma desigual: así, en la arteriola aferente la resistencia se incrementa en un 62 %, mientras que en la eferente lo hace en un 128 %; esto sugiere un efecto predominante del NO en la arteriola eferente. La presión hidrostática glomerular aumenta y el coeficiente de ultrafiltración disminuye casi en un 60 %. La vasoconstricción renal observada en estas condiciones puede deberse, al menos en parte, al fenómeno de autorregulación potenciado por el concurrente aumento de presión arterial. Dworkin y cols. (1984)⁴⁴ y Persson y cols. (1990)⁴⁵ observaron que la vasoconstricción estaba limitada a la arteriola aferente, debiéndose tal vez a un mecanismo miogénico⁴⁶. Estas observaciones coinciden con las de Roberson y cols. (1972)⁴⁷, que mostraban una pequeña participación de la arteriola eferente en la actividad autorreguladora renal.

El NO ejerce un efecto relajante en la microvasculatura renal, oponiéndose a la actividad vasoconstrictora simultánea y aportando una fina regulación de la microcirculación.

Efecto sobre el mesangio

La célula mesangial es un pericito dentro del glomérulo, cuya morfología recuerda a las células del músculo liso vascular. Está localizado adyacente al endotelio capilar y a la arteriola aferente. Este tipo celular responde a una variedad de sustancias vasoactivas vía los mismos sistemas de mensajeros intracelulares y con una función resultante similar a la de las células del músculo liso vascular.

Para investigar la posibilidad de que las células mesangiales puedan o no ser células diana para el NO, diversos autores han realizado experimentos en los que se cocultivan células mesangiales con células endoteliales de aorta bovina^{48,49}. Se añadió al cocultivo bradiquinina como estimulante de síntesis de NO por las células endoteliales y se midió el GMPc producido por las células mesangiales como marcador de acción del NO. Así se observó que la bradiquinina no es capaz de modificar los niveles de GMPc de las células mesangiales en ausencia de células endoteliales, pero cuando se añade bradiquinina al cocultivo se detectan incrementos sustanciales del GMPc producido por las células mesangiales^{48,49}. Este incremento de los niveles de GMPc en las células mesangiales en los cocultivos puede potenciarse por la superóxido dismutasa e inhibirse tanto por la hemoglobina, que se une al NO, como por el L-NMMA, que inhibe la producción de NO. Así se confirma que el NO producido por las células endoteliales es responsable del aumento de GMPc en las células mesangiales.

El NO disuelto en agua y añadido directamente a las células mesangiales también estimuló los niveles

de GMPc en estas células⁴⁸. En base a estas observaciones se concluye que las células mesangiales del glomérulo son células diana para el NO producido por las células endoteliales. Además, las células endoteliales de los capilares glomerulares, de forma similar a las células endoteliales vasculares de los grandes vasos, tienen la capacidad de producir NO en respuesta a agonistas como bradiquinina, ATP, trombina y factor activador de las plaquetas⁴⁹. En ausencia de células endoteliales no se detectan cambios en el GMPc de las células mesangiales con ninguno de estos agonistas.

Para demostrar el efecto biológico del NO sobre las células mesangiales se mide el área de superficie planar de estas células por análisis de imagen digitalizado⁴⁸. La disminución en el área de superficie planar de las células mesangiales se ha utilizado como valoración *in vitro* de la contracción de las células mesangiales. Se ha descrito asimismo que la angiotensina II reduce significativamente el área de superficie planar de células mesangiales en cultivo^{50,51}. El NO, en las mismas concentraciones que se requieren para aumentar el GMPc, inhibe los efectos contráctiles de la angiotensina II⁴⁸, e incluso tiende a causar un aumento de su área de superficie planar.

Se puede concluir, por tanto, que el NO inhibe la contracción de las células mesangiales inducida por angiotensina II y puede ser considerado un agente relajante de las células mesangiales, con un efecto similar al que presenta en los vasos. Esto nos lleva a considerar la posibilidad de que el NO pueda interactuar con otros efectos de la angiotensina II, como el transporte de macromoléculas a través del mesangio⁵². Recientes trabajos de De Nicola y cols. (1992)⁵³ apoyan el concepto de que el NO es un antagonista fisiológico de angiotensina II tanto a nivel tubular como glomerular.

Un efecto adicional del NO es su capacidad de inhibir la contracción y la proliferación mesangial inducida por factores de crecimiento. Garg y Hassid (1989)⁵⁴ fueron los primeros en demostrar que el S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP), sustancia que libera NO lentamente durante varias horas, y sustancias que liberan NO dentro de la célula, así como el nitroprusiato sódico y el dinitrato de isosorbide, previenen o reducen la incorporación de timidina trititada al DNA inducida por el suero en células mesangiales en cultivo. Los efectos antiproliferativos del SNAP se inhiben por hemoglobina. El SNAP, el nitroprusiato sódico y el dinitrato de isosorbide también incrementan los niveles de GMPc en las células mesangiales de rata a las mismas concentraciones que se necesitan para obtener el efecto antiproliferativo. Adicionalmente, el 8-Br-GMPc, análogo del GMPc, que entra en la célula, inhibe también la prolifera-

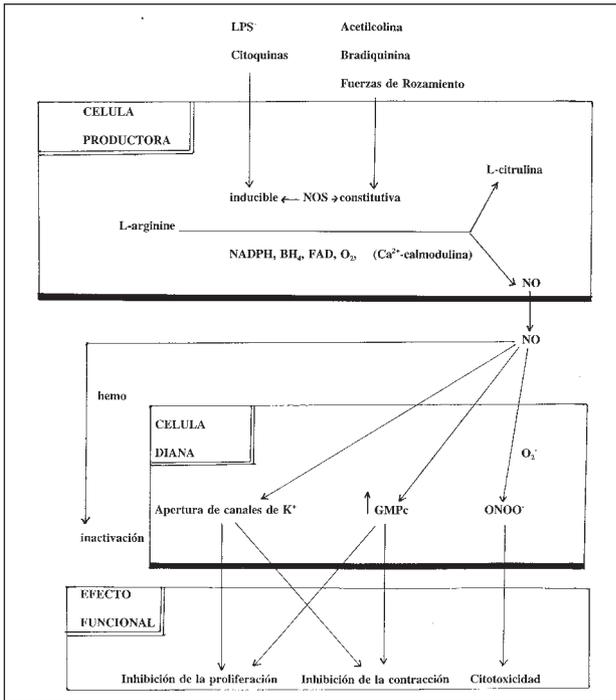


Fig. 1.—Esquema de producción y efectos celulares del óxido nítrico.

ción de las células mesangiales. De estos estudios se concluye que el NO inhibe la mitogénesis de las células mesangiales y que este efecto está mediado vía GMPc.

Las células mesangiales de rata pueden estimularse para expresar la forma inducible de la NOS *in vitro*. Estas células requieren sencillos estimulantes para producir NO, a diferencia de las células mesangiales humanas, que requieren múltiples citoquinas. La citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral α (TNF- α) estimula la actividad de la NOS en células de músculo liso vascular y células mesangiales bovinas⁴⁹. El tratamiento con TNF- α o con LPS induce la síntesis de NO independiente de calcio (NOS inducible) en células endoteliales de arteria renal y aorta bovina⁵⁵, células que claramente expresan liberación de NO regulada por calcio (NOS constitutiva) en condiciones basales. El pretratamiento con interferón τ (IFN- τ) inhibe la estimulación de la NOS inducible estimulada por el TNF- α , pero no es capaz de inhibir la estimulación observada en presencia de agonistas de calcio. Este es un efecto sorprendente, ya que en los macrófagos el IFN- τ actúa de forma sinérgica con el TNF- α , mientras que antagoniza su efecto en las células endoteliales⁵⁶. Por otra parte, se ha visto que el tratamiento de las células mesangiales con interleuquina 1 (TNF- α) o lipopolisacárido (LPS) induce la NOS. Las células mesangiales glomerulares respon-

den al NO con elevaciones de la concentración intracelular de GMPc. El TNF- α aumenta los niveles de GMPc en las células mesangiales de forma tiempo y concentración dependiente.

Si las células mesangiales poseen o no la NOS constitutiva no está claro. Ganz y cols. (1991)⁵⁷ sugieren que las células mesangiales la tienen, ya que demuestran que la acetilcolina provoca una apertura de los canales de potasio y una disminución en el potasio citosólico, lo cual se inhibe por el L-NMMA y por el azul de metileno. Este mismo grupo demostró que se produce una tinción positiva con anticuerpos de NOS constitutiva en células mesangiales de rata en cultivo. Sin embargo, fueron incapaces de demostrar tinción positiva en todo el glomérulo, concluyéndose que los resultados de tinción positiva obtenidos en los cultivos podrían ser artefactos o tinciones no específicas. Por otra parte, no se detectan cambios en la concentración de GMPc en presencia de agonistas de la NOS constitutiva^{48,49}. En un estudio reciente se ha investigado la localización del RNAm de la NOS constitutiva en partículas microdisecionadas del riñón⁵⁸. Las mayores cantidades de RNAm se encontraron en los túbulos colectores de la médula más interna, y las cantidades más bajas en el glomérulo, en los túbulos colectores de la médula externa y de la corteza y en el asa estrecha de la médula interna. El NO podría producirse dentro del glomérulo directamente durante procesos de inflamación o de sepsis y mediar alteraciones en la función mesangial sin que exista daño endotelial o infiltración de otras células.

Acciones glomerulares del NO y fisiopatología renal

Alteraciones en la liberación de factores relajantes y contráctiles derivados del endotelio en condiciones fisiológicas y/o en enfermedades renales causan cambios marcados en la función y la hemodinámica renal. En condiciones fisiológicas, la liberación de NO contribuye a la función renal normal y su inhibición produce un marcado descenso del flujo sanguíneo renal. El fracaso renal isquémico, la hipertensión, la diabetes, la hiperlipidemia, la arterioclerosis y la toxicidad por ciclosporina A están asociados a un descenso en la formación de NO y a un aumento en la liberación de factores contráctiles como la endotelina y el factor contráctil derivado del endotelio-2^{1,2}.

De esta forma, tanto el NO derivado del endotelio como la endotelina pueden afectar profundamente a las células mesangiales, a las yuxtaglomerulares, a la función glomerular y a la hemodinámica renal, pu-

diendo actuar como un sistema de regulación local de la función del riñón en condiciones fisiológicas.

Por su localización anatómica estratégica entre la sangre circulante, el músculo liso vascular, las células yuxtaglomerulares y las mesangiales, el endotelio puede jugar un papel importante como tejido diana de daños renales tales como la isquemia, hipertensión, rechazo al trasplante renal, agentes tóxicos y/o drogas. De hecho, los cambios inducidos por estos estímulos pueden mediar o promover alteraciones en la hemodinámica renal y las funciones características de ciertas enfermedades renales¹⁹.

Es también probable que el NO pueda jugar un papel en la respuesta inflamatoria del glomérulo. Las células mesangiales son determinantes fundamentales en la regulación del filtrado glomerular. La síntesis excesiva de NO y de GMPc en estas células no sólo puede alterar la filtración glomerular, sino que puede incluso causar daño tisular, contribuyendo así a la patogénesis de ciertas formas de glomerulonefritis vistas en modelos animales. Esta hipótesis se confirma con recientes observaciones que demuestran que los esteroides antiinflamatorios antagonizan potentemente la actividad de la NOS inducida por IL-1 y TNF- α en las células mesangiales. Esta inhibición de la NOS previamente inducida por citoquinas puede ser uno de los aspectos de la acción beneficiosa de los glucocorticoides y de la ciclosporina A observada en ciertas enfermedades renales⁵⁹.

La proliferación de células mesangiales, endoteliales y epiteliales glomerulares es una característica importante de muchas formas de glomerulonefritis. La activación del GMPc en las células del músculo liso vascular (por sustancias que liberan NO) está asociada con una disminución de la incorporación de timidina al DNA y de la proliferación de las células del músculo liso vascular en cultivo⁶⁰. La ET-1, por otra parte, es un potente mitógeno mesangial⁶¹. Así, una liberación reducida de NO y/o un aumento de producción de ET-1, particularmente si ésta ocurre en las células endoteliales glomerulares, podría contribuir a la patogénesis de ciertas formas proliferativas de glomerulonefritis.

Un tratamiento obvio abordado para aumentar la síntesis de NO puede ser administrar su precursor, la L-arginina. Sin embargo, el aumento de L-arginina en la dieta no altera significativamente los niveles plasmáticos de la misma. Por otra parte, los niveles intracelulares de L-arginina son ya altos y su suministro adicional no es normalmente paso limitante para la enzima constitutiva. En condiciones patológicas asociadas a exceso de síntesis de NO podría ser posible disminuir la síntesis de NO disminuyendo los niveles plasmáticos de L-arginina. La administración de arginasa de hígado bovino a ratas con shock endotóxico

provoca una disminución en los niveles de arginina circulante y un incremento en la presión arterial⁶².

Conclusión

Decidir cuál es el papel del NO en el organismo puede resultar controvertido debido a la dualidad de acciones que presenta. Por un lado, tal y como anteriormente hemos señalado, el NO es un potente citotóxico por su acción desacopladora de la cadena de transporte de electrones. Por otra parte, el NO causa relajación de células contráctiles (mesangiales), conduciendo así a un estado de hiperfiltración glomerular. Estos dos efectos son perjudiciales para el organismo y pueden ser desencadenantes de diversas patologías.

Por otra parte, la liberación de NO contribuye al mantenimiento del filtrado glomerular en situaciones de hipertensión arterial³⁹ y en aquellas en que la liberación de sustancias vasoconstrictoras locales está aumentada. Se sabe que en situaciones de fracaso renal agudo tóxico, la síntesis glomerular de NO está aumentada⁶³, quizá como mecanismo compensador del acusado descenso de la filtración glomerular y del flujo sanguíneo renal. Además, se sabe que el NO tiene un marcado efecto antiproliferativo⁶⁴, lo que puede contribuir a evitar o retrasar la aparición de enfermedades como las glomerulonefritis de tipo proliferativo.

De todo esto se deduce la importancia de una fina y estrecha regulación de los mecanismos que pueden conducir a la estimulación e inhibición de la síntesis de NO. El desbalance de estos mecanismos puede conducir al desencadenamiento de diversas patologías. En general se acepta que el NO sintetizado por la NOS inducible es dañino y el sintetizado por la NOS constitutiva es beneficioso; no es que el NO resultante sea distinto en un caso y en otro, sino que cuando se pone en marcha la NOS inducible es por la existencia de sustancias como interleucinas etc., que se liberan en distintas patologías y procesos de inflamación, y son las que realmente son perjudiciales. Los mecanismos que regulan la liberación de NO en el organismo de forma tan fina como para mantener un perfecto equilibrio deben ser más ampliamente estudiados.

Bibliografía

1. Lüscher TF y Vanhoutte PM: *The endothelium: Modulator of cardiovascular function*. Boca Ratón. CRC Press USA, 1990.
2. Vane JR, Aenggard EE y Botting RM: Mechanism of disease: Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323:27-37, 1990.
3. Furchgott RF y Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376, 1980.

4. King AJ, Brenner BM: Endothelium-derived vasoactive factors and the renal vasculature. *Am J Physiol* 260 (Regulatory Integrative Comp Physiol 29):R653-R662, 1991.
5. López-Novoa JM, Rivas-Cabañero L y Rodríguez-Barbero A: Vasoactive hormones and hypertension. A cellular and molecular point of view (en prensa).
6. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R y Leaf CD: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27:8706-8711, 1988.
7. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ y Moncada S: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5159-5162, 1989.
8. Garthwaite J, Charles SJ, Chess-Williams R: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor suggest role as intercellular messenger in the brain. *Nature Lond* 336:385-388, 1988.
9. Marletta MA: Nitric oxide: Biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci* 14:488-492, 1989.
10. Palmer RMJ y Moncada S: A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 348-352, 1989.
11. Moncada S, Palmer RMJ y Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
12. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3064, 1992.
13. Lowenstein CJ, Snyder SH: Nitric oxide, a novel biology messenger. *Cell* 70:705-707, 1992.
14. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR y Snyder SH: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718, 1991.
15. Klatt P, Heinzel B, John M, Kastner M, Bohme E y Mayer B: Ca²⁺/calmodulin-dependent cytochrome C reductase activity of brain nitric oxide synthase. *JBiol Chem* 267:11374-11378, 1992.
16. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P y Michel T: Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6348-6352, 1992.
17. Mulsch A, Bassege E y Busse R: Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: Evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340:767-770, 1989.
18. Mayer B, Schmidt K, Humbert P y Bohme E: Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: A cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca²⁺-dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 164:678-685, 1989.
19. Luscher TF, Bock HA, Yang Z y Diederich D: Endothelium-derived relaxing and contracting factors: Perspectives in nephrology. *Kidney Int* 39:575-590, 1991.
20. Xie KW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KN, Lee TD, Ding A, Troso T y Nathan C: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225-228, 1992.
21. Lyons CR, Orloff GJ y Cunningham JM: Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *JBiol Chem* 267:6370-6374, 1992.
22. Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS y Moncada S: L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153:1251-1256, 1988.
23. Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF y Moncada S: A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 96:418-424, 1989.
24. Yang Z, Von Segesser L, Bauer E, Sulz P, Tschudi M y Luscher TF: Different activation of the endothelial L-arginine and cyclooxygenase pathway in the human internal mammary artery and saphenous vein. *Circ Res* 68:52-60, 1991.
25. Vallance P, Collier J y Moncada S: Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 997-1000, 1989.
26. Rees DD, Palmer RMJ y Moncada S: The role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3375-3378, 1989.
27. Radomski MW, Palmer RMJ y Moncada S: Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Brit J Pharmacol* 92:181-187, 1987.
28. Ignarro LJ: Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released by artery and vein. *Circ Res* 65:1-21, 1989.
29. Palmer RMJ, Ferrige AG y Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526, 1987.
30. Azuma H, Ishikawa M y Sekizaki S: Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 88:411-415, 1986.
31. Furlong B, Henderson AH y Lewis MJ: Endothelium-derived relaxing factor inhibits *in vitro* platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 90:687-692, 1987.
32. Sneddon JM y Vane JR: Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2800-2804, 1988.
33. Ignarro LJ: Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:535-560, 1990.
34. Craven PA y De Rubertis FR: Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide and related activators by heme and hemeproteins: Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl heme complex in enzyme activation. *JBiol Chem* 253:8433-8443, 1978.
35. Rapaport RM, Draznin MB y Murad F: Endothelium-dependent vasodilator- and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Trans Ass Am Physicians* 96:19-30, 1983.
36. Moncada S y Higgs EA: Endogenous nitric oxide physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21:361-374, 1991.
37. Lahera V, Salom MG, Fiksen-Olsen MJ, Raji L y Romero JC: Effects of NG-nitro-L-arginine methylester and L-arginine on acetylcholine renal response. *Hypertension* 15:659-663, 1990.
38. Lahera V, Salom MG, Fiksen-Olsen MJ y Romero JC: Mediator role of endothelium-derived nitric oxide in renal vasodilatory and excretory effects of bradykinin. *Am J Hypertension* 4:260-262, 1991.
39. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S y Romero JC: Effects of N^G-nitro-L-arginine methylester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol* (in press).
40. Bhardwaj R y Moore PK: The effect of arginine and nitric oxide on resistance blood vessels of the perfused rat kidney. *Br J Pharmacol* 97:739-744, 1989.
41. Romero JC, Bentley MD, Vanhoutte PM y Knox FG: Intrarenal mechanisms that regulate sodium excretion in relation to changes in blood pressure. *Mayo Clinic Proc* 64:1406-1424, 1989.
42. Olensen SP, Clapham DE y Davies PF: Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* 331:168-170, 1988.
43. Salom MG, Lahera V, Fenoy FJ, Roman R y Romero JC: Role of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) in the renal response to changes in renal perfusion pressure (abstract). *J Am Soc Nephrol* 1(4):670, 1990.

44. Dworkin LD, Hostetter TH, Rennke HG y Brenner BM: Haemodynamic basis for glomerular injury in rats with deoxycorticosterone-salt hypertension. *J Clin Invest* 73:1448-1461, 1984.
45. Persson PB, Ehmke H, Nafz B y Kirchheim R: Sympathetic modulation of renal autoregulation by carotic occlusion in conscious dogs. *Am J Physiol* 258 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 27):F364-F370, 1990.
46. Auckland K: Myogenic mechanisms in the kidney. *J Hypertens* 7, Suppl 4: S71-S76, 1989.
47. Robertson CR, Deen WM, Troy JL y Brenner BM: Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. Hemodynamics and autoregulation. *Am J Physiol* 223:1191-1200, 1972.
48. Shultz PJ, Schorer AE y Raji L: Effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide on rat mesangial cells. *Am J Physiol* 258 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 27):F162-F167, 1990.
49. Marsden PA, Brock TA y Ballermann BJ: Glomerular endothelial cells response to calcium-mobilizing agonists with release of ED RF. *Am J Physiol* 258 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 27):F1295-F1303, 1990.
50. Mene P y Dunn MJ: Eicosanoids and control of mesangial cell contraction. *Circ Res* 62:916-925, 1988.
51. Mene P, Simonson MS y Dunn MJ: Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev* 69:1347-1424, 1989.
52. Shultz PJ y Raji L: The glomerular mesangium. Role of initiation and progression of renal injury. *Am J Kidney Dis* 17 (Suppl 1):8-14, 1991.
53. De Nicola L, Blantz RC y Gabbai FB: Nitric oxide and angiotensin II. *J Clin Invest* 89:1248-1256, 1992.
54. Garg UC y Hassid A: Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide generating vasodilators. *Am J Physiol* 257:F60-F66, 1989.
55. Lamas S, Michel T, Brenner B y Marsden P: Nitric oxide synthesis in endothelial cells: evidence for a pathway inducible by TNF- α . *Am J Physiol* 261:C634-C641, 1991.
56. Lamas S, Michel T, Collins T, Brenner B y Marsden P: Effects of Interferon τ on Nitric Oxide Synthase activity and Endothelin 1 production by vascular endothelial cells. *Am Soc Clin Invest* 90:879-887, 1992.
57. Ganz MB, Kasner SE y Unwin R: Acetylcholine (ACh) induces nitric oxide (NO) dependent opening of K⁺ channels in mesangial cells (MCs) (Abstract). *J Am Soc Nephrol* 2:512, 1991.
58. Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H y Marumo F: Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase messenger RNAs in microdissected rat nephron segments. *J Clin Invest* 90:659-665, 1992.
59. Pfeilschifter J, Kunz D y Muhl H: Nitric oxide: An inflammatory mediator of glomerular mesangial cells. *Nephron* 64:518-525, 1993.
60. Garg UC y 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* 83:1774-1777, 1989.
61. Simonson MS, Wann S, Mene P, Dubyak GR, Kester M, Nakazato Y, Sedor JR y Dunn MJ: Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 83:708-712, 1989.
62. McCall T y Vallance P: Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. *TIPS* 13:1-6, 1992.
63. Rivas-Cabañero L, Montero A y López-Novoa JM: Glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin-induced renal failure. *Eur J Pharmacol* 270:119-121, 1994.
64. Raji L y Shultz PJ: Endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide: Effects on and production by mesangial cells and the glomerulus. *J Am Soc Nephrol* 3:1435-1441, 1993.