

# El sistema vasodilatador óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en pulmón de fetos sometidos a hipoxia crónica.

Daniel Miranda S<sup>1</sup>\*, María Mazzoni W<sup>1</sup>, Valeria Martínez A<sup>1</sup>,  
Rodrigo Montecinos M<sup>1</sup>, Víctor Reyes C<sup>2</sup>, Germán Ebensperger D<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Alumno Escuela de Medicina, Universidad de Chile. <sup>2</sup>Programa de Fisiopatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

## Resumen

*Rev Chil Estud Med* 2008; 5(1):13-18. **Introducción:** Al nacimiento, la circulación pulmonar pasa de un estado de alta a uno de baja resistencia, lo que implica el establecimiento de un nuevo balance entre vasoconstrictores y vasodilatadores. Un importante vasodilatador es NO, el que puede ser producido por la enzima eNOS. La falla de esta transición provoca un cuadro clínico llamado hipertensión pulmonar persistente, una de sus causas es hipoxia fetal crónica, observada en gestaciones a grandes altitudes. Se investigó si produce disminución de la expresión de eNOS en el pulmón. **Metodología:** El estudio se realizó en fetos de oveja de 80 % de gestación, gestados a 520 o a 3600 m.s.n.m. Se midió la expresión de eNOS en extractos proteicos de pulmón mediante inmunoblot. **Resultados:** No se observó diferencia significativa entre ambos grupos. **Conclusiones:** La hipoxia crónica no produce cambios significativos sobre la expresión de eNOS en el pulmón de fetos de oveja a esta edad gestacional.

**Keywords:** hipoxia fetal, hipertensión pulmonar, óxido nítrico sintasa.\*

## Introducción

LA RESISTENCIA VASCULAR pulmonar fetal es muy elevada en comparación con la observada en el recién nacido o en el adulto, tendiendo incluso a aumentar hacia el término de la gestación y previo al nacimiento. Esta alta resistencia vascular pulmonar determina que solo el 3-10 % del gasto cardíaco combinado fetal pase a los pulmones<sup>1</sup>, mientras que el 85 % del gasto cardíaco derecho cruza por el ductus arteriosus hacia la aorta descendente. Algunos de los mecanismos implicados en mantener la alta resistencia vascular pulmonar fetal son: la baja presión parcial de oxígeno ( $PO_2$ ), la baja producción de vasodilatadores como óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), y la producción aumentada de vasoconstrictores como endotelina-1 (ET-1) o leucotrienos<sup>2,3,4</sup>.

La adaptación a la vida extrauterina requiere de una rápida transición de la circulación pulmonar, desde un estado de bajo flujo y alta resistencia en la que se encuentra *in utero* a un estado

de alto flujo y baja resistencia a los pocos minutos después de nacer<sup>2,3</sup>. La habilidad de acomodar un aumento de 10 veces del flujo sanguíneo pulmonar requiere rápidas adaptaciones funcionales y estructurales que permitan la caída de la resistencia vascular pulmonar en el periodo postnatal inmediato. La liberación de sustancias vasodilatadoras como NO y PGI<sub>2</sub> juega un rol fundamental en establecer una eficiente circulación pulmonar en el recién nacido<sup>2,3,4</sup>.

Dentro de los mecanismos que contribuyen al cambio de la reactividad vascular pulmonar durante el proceso de desarrollo fetal y posteriormente durante el desarrollo post-natal, se encuentra el sistema óxido nítrico sintasa (NOS) - óxido nítrico (NO) - guanilil ciclasa soluble (sGC)- GMP cíclico (cGMP)- fosfodiesterasa 5 (PDE5)<sup>3,4,5</sup>. En esta cascada, el NO es producido por la conversión de L-arginina a L-citrulina, principalmente por acción de la enzima NOS endotelial (eNOS). El NO difunde del endotelio hacia las capas musculares del vaso

\*Correspondencia a da\_miranda@med.uchile.cl

pulmonar, donde estimula la enzima sGC, aumentando así la producción de cGMP<sup>6</sup>. El aumento de la concentración de cGMP, produce vasodilatación por dos mecanismos: el primero, estimulando proteínas quinasas de tipo G las que fosforilan canales de potasio de alta conductancia dependientes de calcio (canales KCa), promoviendo su apertura<sup>7,8</sup> y la hiperpolarización de la célula muscular lisa, lo cual inhibe la entrada de calcio por canales de calcio operados por voltaje (canales de calcio tipo L). En el segundo mecanismo el aumento de cGMP reduce la liberación de calcio desde depósitos intracelulares<sup>9</sup>. La reducción de la concentración intracelular de calcio en el músculo liso produce su relajación<sup>10</sup>. Además, el NO posee un importante efecto antimutagénico de las células musculares lisas, lo que contribuye a la disminución del tono vascular basal<sup>11</sup>.

Diversos factores controlan la producción de NO, regulando la actividad de eNOS, su expresión a nivel transcripcional y postranscripcional<sup>12,13,14,15</sup>. En el feto de oveja, se ha visto que el mRNA, la proteína y la actividad de eNOS en el pulmón aumentan en el último cuarto de la gestación<sup>16</sup> lo que contribuye a la regulación del tono vascular en este último periodo de vida fetal<sup>2</sup>. Aún cuando NO no es el único vasodilatador responsable de la disminución de la resistencia vascular pulmonar al nacer, su liberación parece contribuir de manera muy significativa a este proceso<sup>3</sup>.

La hipertensión pulmonar persistente es una de las principales causas de patología en recién nacidos de término; su incidencia es aproximadamente 1 por cada 500 nacidos vivos, y su mortalidad varía entre un 20% y un 50% de los casos. Componentes importantes en esta patología son la vasoconstricción pulmonar y el consiguiente aumento de la resistencia vascular pulmonar, incluyendo una disfunción endotelial, con disminución de producción de factores vasodilatadores y aumento de la producción de factores vasoconstrictores, lo cual produce una hipoxemia severa y mantenida en el recién nacido<sup>3,17,18</sup>. El aumento de la resistencia vascular pulmonar neonatal puede deberse, entre otras cosas, a un aumento del grosor de las capas musculares de las arterias pulmonares y de las arteriolas pulmonares periféricas, en respuesta a la hipoxia fetal crónica<sup>19</sup>.

La hipoxia fetal es una complicación frecuente durante el embarazo y el parto. El feto crece y se desarrolla en un ambiente intrauterino de baja  $PO_2$ , la que puede ser consecuencia, entre otras, de una menor oxigenación de la sangre materna como la que ocurre por exposición a las grandes altitu-

des<sup>19</sup>.

Puesto que la hipoxia fetal crónica es una causa importante de hipertensión pulmonar, y que esta patología implica, entre otros factores un desbalance entre mecanismos vasoconstrictores y mecanismos vasodilatadores en la circulación pulmonar, y que NO es un importante vasodilatador, en este trabajo se evaluó si la hipoxia crónica *in utero* produce una disminución de la expresión de eNOS en la etapa fetal, lo que podría contribuir a un mayor riesgo de hipertensión pulmonar al nacer. Para ello se comparó la expresión de eNOS entre fetos de oveja gestados en tierras bajas y fetos de oveja gestados en tierras altas en el altiplano andino.

## Materiales y Métodos

### Animales

Fueron utilizados cinco fetos de oveja gestados en tierras bajas (Santiago, 520 metros sobre el nivel del mar) que constituyen el grupo control o C, y cinco fetos de oveja gestados en tierras altas (Putre, 3580 metros sobre el nivel del mar), que constituyen el grupo H o hipóxico, con un 80% de gestación cursada. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética sobre la Investigación en los Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Protocolos CBA 040 y 097) y siguen las recomendaciones de Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Being of the American Physiological Society y de UK Animals Scientific Procedures Act., 1986.

### Protocolo de disección

Luego de una extracción por cesárea, los fetos fueron sometidos a eutanasia mediante una sobredosis anestésica con tiopental sódico (Tiopental L.CH., 100mg/kg) y aplicación de cloruro de potasio (KCl) saturado. Los pulmones fueron trozados, congelados rápidamente en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80^{\circ}C$  hasta su uso.

### Preparación de extracto libre de células

Se prepararon extractos totales de pulmón adaptando una metodología ya descrita<sup>20</sup>. Se homogeneizó un trozo de pulmón en 5 volúmenes de un buffer de lisis de composición: 150mM NaCl, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCL pH 7,4, 14mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,1% Tween-20, suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,5mm, leupeptina 0,002 mm y pepstatina a 0,001 mm). El homogeneizado se incubó en hielo por 30 minutos con

agitación ocasional y luego se centrifugó a 10000g por 10 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante (extracto total), cuya concentración de proteínas se midió por el método de Bradford<sup>21</sup> y se congeló a -80 °C en alícuotas hasta su uso.

### Inmunoblot

Las proteínas del extracto fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalantes, posteriormente fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, bajo condiciones estándar (40 mA por una hora para la electroforesis y 50 V por 2 horas para la transferencia)<sup>23</sup>. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada por incubación con leche descremada al 4 % en buffer fosfato salino (PBS) por una hora y luego se incubó durante una hora con un anticuerpo primario monoclonal anti eNOS (Transduction Laboratories, 1:250) o un anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -actina (Sigma, 1:5000) (como proteína de referencia) en leche al 0,4 % en PBS y tween-20 al 0,1 %. En seguida se lavó la membrana 3 veces por 10 minutos con PBS tween-20 al 0,1 % y se incubó con un anticuerpo secundario monoclonal anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Jackson Immunoresearch, West Grove, USA, 1:5000) en leche al 0,2 % en PBS y tween-20 al 0,1 % por una hora, lavando nuevamente otras 3 veces la membrana después de la incubación. La señal de eNOS o de  $\beta$ -actina fue visualizada por quimioluminiscencia con un kit comercial (Super Signal ECL, Pierce) seguida de autorradiografía. Se realizaron experimentos de inmunoblot preliminares con distintas cantidades de extracto pulmonar y diferentes tiempos de exposición durante la autorradiografía, para determinar las condiciones adecuadas de semicuantificación (Figura 1). En estos experimentos se determinó utilizar tiempos óptimos de exposición de 30 segundos para eNOS y de 5 segundos para  $\beta$ -actina en la semicuantificación final (Figura 1A) y cargar 10  $\mu$ g de proteína de extracto pulmonar por pista (Figura 1B).

### Análisis de Resultados

Las señales obtenidas por inmunoblot fueron escaneadas y posteriormente analizadas por densitometría mediante el programa Scion Image (Scion Image Beta 4.02 Win; Scion Corporation, MD, USA). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  error estándar de la razón eNOS/ $\beta$ -Actina. El análisis estadístico de los datos fue realizado con un test de Mann-Whitney, considerando un  $p = 0,05$

como significativo al comparar los promedios entre los grupos<sup>24</sup>.

### Resultados

La razón eNOS/ $\beta$ -Actina del grupo H (0,784  $\pm$  0,130) no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo C (0,776  $\pm$  0,075) (Figura 2).

### Discusión

En este trabajo no se detectaron cambios en la expresión de eNOS en pulmón de fetos de oveja de 80 % de gestación, gestados en altura, en comparación con fetos de oveja gestados en tierras bajas. Estos resultados difieren de lo observado en un modelo de HPP producido por hernia diafragmática en humanos, donde el análisis post mortem de los pulmones de estos recién nacidos indica una disminución de la inmunodetección de eNOS en los vasos pulmonares<sup>25</sup>. Por otra parte, el análisis post mortem de pulmones fetales humanos sometidos a hipoxia e HTP producto de una linfangiectasia pulmonar congénita muestra un aumento de la expresión de eNOS<sup>26</sup>, lo que concuerda con la regulación de la expresión de eNOS por los Factores de Transcripción Inducibles por Hipoxia (HIF)<sup>27</sup>. Algo similar se ha observado en ratas adultas sometidas a hipoxia crónica, las que aumentan la expresión pulmonar de eNOS<sup>28</sup>. Tomados en conjunto, estos antecedentes sugieren que la regulación de eNOS bajo condiciones de hipoxia y/o hipertensión pulmonar varía según el modelo y la patología. Nuestros resultados tienen varias posibles explicaciones. Primero, que la expresión de eNOS por acción de hipoxia crónica se vea afectada solo durante el último tercio o el último cuarto de la gestación, justo cuando debería producirse el aumento de la expresión y la actividad de eNOS durante el desarrollo del feto de oveja<sup>2</sup>. Dado que analizamos fetos de oveja con un 80 % de gestación, es posible que no estuviéramos dentro de la ventana de tiempo en que la hipoxia crónica afecta la expresión de esta enzima. Segundo, la expresión de eNOS no es suficiente para determinar su función, ya que la enzima puede ser activada por fosforilación en un residuo de serina o inactivada por fosforilación en un residuo de treonina<sup>29</sup>, y nuestro estudio no da cuenta del estado de fosforilación de eNOS en ambos grupos experimentales. Tercero, es posible que los cambios de expresión de eNOS no intervengan en la génesis de la hipertensión pulmonar como resultado de la

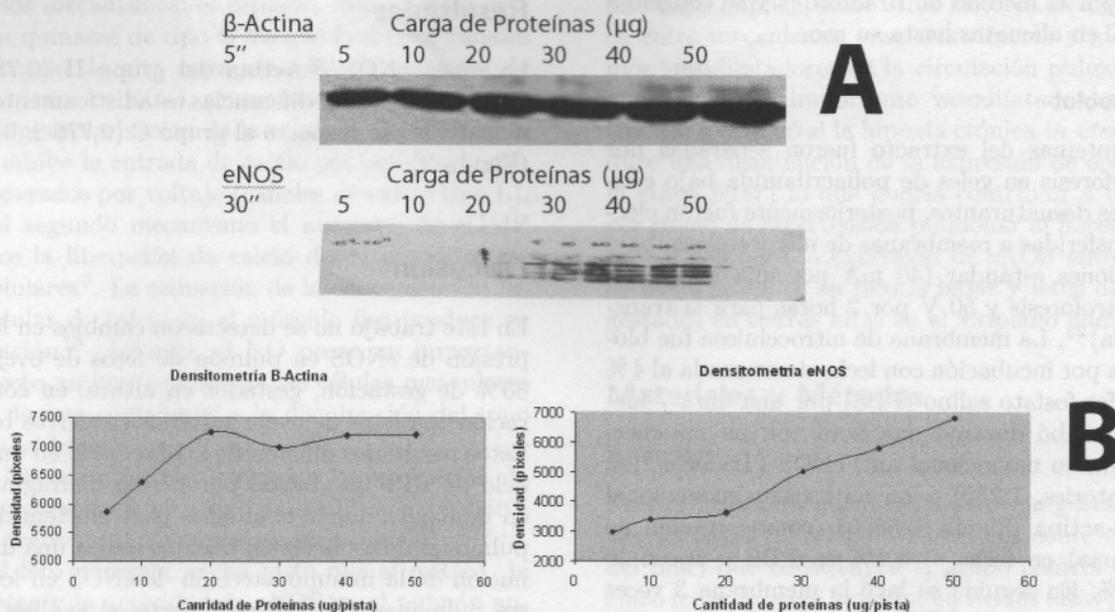


Fig. 1: **A:** Placas autorradiográficas obtenidas en experimentos preliminares para la calibración del método, a distintas cantidades de proteína y tiempos de revelado. **B:** Análisis densitométrico de las Curvas de Calibración obtenidas para probar la eficacia del método planteado, obtenidas a partir de las placas de la Figura 1A. En ambos casos, a 10 $\mu$ g de proteína se encuentran ambas dentro del rango lineal de sensibilidad, por lo tanto se usó esa cantidad de proteínas por muestra para nuestros experimentos finales.

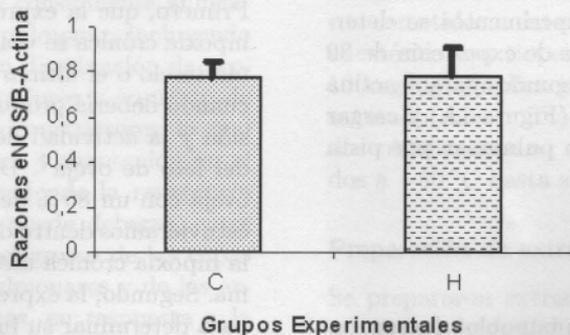


Fig. 2: La figura muestra claramente la diferencia no significativa en las razones eNOS/ $\beta$ -Actina obtenidas entre los grupos control (C) e hipóxico (H).

hipoxia crónica en este modelo experimental. Estudios futuros deberían estar enfocados a determinar si existen cambios de actividad de la enzima en fetos de oveja de término crónicamente hipóxicos o en recién nacidos.

## Notas y Agradecimientos

Se agradece el financiamiento de esta unidad de investigación a la Universidad de Chile, a través del ICBM de la Facultad de Medicina. Además, a los proyectos Fondecyt 1010636, 1020599 y 1050479. Además se agradece especialmente a nuestros tutores, y a todas las personas que trabajan en el laboratorio del Dr. Roberto Reyes en el Programa de Fisiopatología de la Sede Oriente de la Facultad de Medicina.

## Referencias

- COHN HE, SACKS EJ, HEYMAN MA, RUDOLPH AM. Cardiovascular responses to hypoxemia and acidemia in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 120: 817-824.
- ABMAN SH, STEVENS T. Perinatal pulmonary vasoregulation. Implications for the pathophysiology and treatment of neonatal pulmonary hypertension. En Haddad GG and Lister G, ed. *Tissue Oxygen Deprivation. From Molecular to Integrated Function*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp 367-431, 1996.
- ABMAN SH. Abnormal vasoreactivity in the pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Res* 1999; 20: e103-e109.
- GHANAYEM NS, GORDON JB. Modulation of pulmonary vasomotor tone in the fetus and neonate. *Respir Res* 2001; 2: 139-144.
- ABMAN SH, CHATFIELD BA, HALL SL, MCMURTRY IF. Role of endothelium-derived relaxing factor during transition of pulmonary circulation at birth. *Am J Physiol* 1990; 259: H1921-H1927.
- MONCADA S, HIGGS A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med* 1993; 27: 2002-12.
- CARRIER GO, FUCHS LC, WINECOFF AP, GIULUMIAN AD, WHITE RE. Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channel. *Am J Physiol* 1997; 273: H76-H84.
- HAMPL V, HUANG JM, WEIR EK, ARCHER SL. Activation of the cGMP-dependent protein kinase mimics the stimulatory effect of nitric oxide and cGMP on calcium-gated potassium channels. *Physiol Res* 1995; 44: 39-44.
- LINCOLN TM, CORNWELL, TL. Towards an understanding of the mechanism of action of cAMP and cGMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels* 1991; 28: 129-137.
- ARCHER SL, HUANG JMC, HAMPL V, NELSON DP, SHULTZ PJ, WEIR EK. NO and cGMP cause vaso-relaxation by activation of charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7583-7587.
- MIZUNO S, KADOWAKI M, DEMURA Y, AMESHIMA S, MIYAMORI I, ISHIZAKI T. P42/44 Mitogen-Activated protein kinase regulated by P53 and Nitric Oxide in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 2: 184-92.
- FIKE CD, ASCHNER JL, ZHANG Y, KAPLOWITZ MR. Impaired NO signaling in small pulmonary arteries of chronically hypoxic newborn piglets. *Am J Physiol* 2004; 286: L1244-L1254.
- KNOWLES RG, MONCADA S. Nitric Oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
- CASANELLO P, SOBREVÍA L. Intrauterine growth retardation is associated with reduced activity and expression of the cationic amino acid transport systems y+/hCAT-1 and y+/hCAT-2B and lower activity of nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Cir Res* 2002; 91: 127-134.
- CHICOINE LG, PAFFETT ML, YOUNG TL, NELIN LD. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287(1):L60-8.
- HALBOWER A, TUDER RM, FRANKLIN WA, POLLOCK JS, FORSTERMANN U, ABMAN SH. Maturation-related changes in endothelial NO synthase immunolocalization in the developing ovine lung. *Am J Physiol* 1994; 267: L585-L591.
- GONZÁLEZ A, MONTESINOS G. Hipertensión pulmonar. En: *Pediatría Meneghelo*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, 1997; 1488-1492.
- AGUSTI AG, RODRÍGUEZ-ROISIN R. Effect of Pulmonary hypertension on gas exchange. *Eur Respir J* 1993; 6(9):1371-7.
- STOLL BJ, KLIEGMAN RM. El feto y el Recién nacido. En: *Nelson Tratado de Pediatría*. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, 2001; 541-542.
- WHITE CR, HAO X, PEARCE WJ. Maturation differences in soluble guanylate cyclase activity in ovine carotid and cerebral arteries. *Pediatr Res* 2000; 47(3):369-75.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
- PENIN F, ARCHINARD P, MORADI-AMELI M, GODINOT C. Stoichiometry of the oligomycin-sensitivity-conferring protein (OSCP) in the mitochondrial F0F1-ATPase determined by an immunoelectrotransfer blot technique. *Biochim Biophys Acta* 810(3):346-53.
- ZAR JH. Multiple comparisons. In: *Biostatistical Analysis*, 2nd Ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 1984; 185 - 205.
- SHEDATA SM, SHARMA HS, MOOI WJ, TIBBOEL D. Pulmonary hypertension in human newborns with congenital diaphragmatic hernia is associated with

decreased vascular expression of nitric-oxide synthase. *Cell Biochem Biophys* 2006; 44(1):147-55.

26. HOEHN T, WILLIAM M, MCPHADEN AR, STANNIGEL H, MAYATEPEK E, WADSWORTH RM. Endothelial, inducible and neuronal nitric oxide synthase in congenital pulmonary lymphangiectasia. *Eur Respir J* 2006; 27(6):1311-5.

27. COULET F, NADAUD S, AGRAPART M, SOUBRIER F. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promote.

*J Biol Chem* 2003; 278(47):46230-40.

28. CHICOINE LG, AVITIA JW, DEEN C, NELIN LD, EARLEY S, WALKER BR. Developmental differences in pulmonary enos expression in response to chronic hypoxia in the rat. *J Appl Physiol* 2002; 93(1):311-8.

29. FLEMING I, BUSSE R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 2003; 284: R1-12.

14 CASARETO P, SOUBRIER F. Hypoxia-induced expression of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased activity and expression of the cellular nitric oxide synthase system. *Am J Physiol* 2001; 281(1):H111-117.

15 CASARETO P, SOUBRIER F, NADAUD S, COULET F, AGRAPART M, SOUBRIER F. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promote. *J Biol Chem* 2003; 278(47):46230-40.

16 HALBOWER A, TYBER J, FARRAR W, FOLLOK J, FORTSMAN T, ARMAN S. Maturation-related changes in endothelial NO synthase expression in the developing mouse lung. *Am J Physiol* 1994; 267(1):H111-117.

17 GOZALTA A, MONTESORO G, HINTELA J, HANSSON E. Endothelial nitric oxide synthase in the developing mouse lung. *Am J Physiol* 1994; 267(1):H111-117.

18 AGUIRRE AG, RODRIGUEZ-HORN B. Effect of pulmonary hypertension on the expression of endothelial nitric oxide synthase in the rat. *Eur Respir J* 1993; 6(1):131-7.

19 STOLL BJ, KLEMMER RM. El Niño y el Niño Pacifico. *En: Nelson Tratado de Pediatría*. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid; 2001: 641-642.

20 WHITE CJ, HAO X, PARSON WJ. Maturation differences in soluble guanylate cyclase activity in ovine carotid and aortic arteries. *Respir Res* 2003; 4(1):13-21.

21 PARSON WJ. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a dye-binding method. *Anal Biochem* 1976; 73:248-54.

22 PEARCE F, ARCHER SF, MORRIS-ARTS M, GORDON J. Characterization of the oligonucleotide-primed complementary DNA (cDNA) in the mitochondrial coding region (COXII) in the mitochondrial DNA of rat liver determined by an immunoprecipitation PCR technique. *Genomics* 1993; 17(3):346-53.

23 ZAR JH. Multiple comparisons in biostatistical analysis. 2nd ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 1984: 146 - 205.

24 ARCHER SF, SHARMA HS, MOO WJ, TIBBO D. Pulmonary hypertension in human newborns with congenital diaphragmatic hernia is associated with

decreased vascular expression of nitric-oxide synthase. *Cell Biochem Biophys* 2006; 44(1):147-55.

Referencias

1. COLE TJ, KEMNER VA, HUNGER A. Cardiovascular response to hypoxia and ischemia in fetal lambs. *Am J Physiol* 1997; 273(1):H111-117.

2. ARMAN SH, KEMNER VA, HUNGER A. Fetal pulmonary hypertension: pathogenesis, clinical presentation, and treatment. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 8(1):1-6.

3. ARMAN SH. Abnormal ventricles in the pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Respir Res* 1999; 20: e103-e108.

4. OKAWAYAMA NS, GORDON JB. Modulation of pulmonary vasomotor tone in the fetus and neonate. *Respir Res* 2001; 2: 136-144.

5. ARMAN SH, CHAFFIELD BA, HALL SJ, MCKENRY JF. Role of endothelin-derived relaxing factor during transition of pulmonary circulation at birth. *Am J Physiol* 1990; 259: H1921-H1927.

6. MORCADA S, HIGGS A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2012-17.

7. CARRERI GO, FUCHS LC, WINKLER AT, CHILIMIAN AJ, WHITE RE. Nitrovasodilation does not increase microvessel flow in CGMP-induced stimulation of Ca-activated K channel. *Am J Physiol* 1997; 273: H1108-1114.

8. HANFT V, HANFT JAL, WANG ER, ARCHER SF. Activation of the eNOS-dependent protein kinase mimics the stimulatory effect of nitric oxide on calcium-activated potassium channels. *Respir Res* 1998; 4: 39-44.

9. ARCHER SF, SHARMA HS, MOO WJ, TIBBO D. Pulmonary hypertension in human newborns with congenital diaphragmatic hernia is associated with decreased vascular expression of nitric-oxide synthase. *Cell Biochem Biophys* 2006; 44(1):147-55.