

Efecto de la temperatura corporal en la actividad de las sintetasas de óxido nítrico

Subtite QFB José Manuel Campos Peralta,* MMC Guadalupe Cleva Villanueva López,**

Cor MC José Luis Amezcua Gastélum*

RESUMEN. En el presente estudio se cuantificó la actividad de las sintetasas de óxido nítrico dependiente e independiente de calcio en los tejidos obtenidos de ratas anestesiadas y mantenidas a diferentes temperaturas (28, 37 y 40° C). Asimismo, se estudió el efecto de la temperatura corporal en la inducción de óxido nítrico producida por lipopolisacárido en rata. Para establecer si la temperatura afecta la actividad de las enzimas o altera la producción de óxido nítrico indirectamente a través de la liberación de otros mediadores, se estudió la respuesta a la fenilefrina en aortas aisladas de rata sometidas a diferentes temperaturas (28, 37 y 39° C) y a diversos tiempos de incubación con y sin lipopolisacárido, en presencia de L-arginina (precursor del óxido nítrico) o N-iminoetil-L-ornitina (inhibidor de la síntesis de óxido nítrico). En todos los casos los experimentos *in vivo* duraron 6 horas, excepto en el grupo con hipertermia (40° C) que sobrevivió menos de 3 horas. Se observó que durante la hipotermia (28° C) el tratamiento con lipopolisacárido no aumentó la actividad de las sintetasas de óxido nítrico. En contraste, la hipertermia por sí misma, aún sin tratamiento con lipopolisacárido, aumentó la actividad de ambas enzimas en el íleon e hígado y la de independiente de calcio en íleon, hígado y pulmón. Además, la hipertermia potenció el efecto inductor del lipopolisacárido en el hígado. La respuesta inicial de los anillos de aorta a la fenilefrina fue igual en todos los grupos. La incubación durante 5 horas (independientemente de la temperatura o de la presencia de lipopolisacárido) aumentó la dosis efectiva 50 a la fenilefrina, efecto que fue potenciado por la L-arginina e inhibido por N-iminoetil-L-ornitina, indicando aumento en la liberación de óxido nítrico. Los resultados de estos experimentos no son concluyentes y la presencia de lipopolisacárido por contaminación bacteriana de las soluciones no ha sido descartada. Se concluye que los cambios en la temperatura corporal alteran la síntesis de óxido nítrico *in vivo*, probablemente a través de la liberación de otros mediadores, como las citocinas o el lipopolisacárido de bacterias traslocadas, aunque, para confirmar esta hipótesis es necesario cuantificar esos mediadores simultáneamente a la valoración del óxido nítrico en ratas sometidas a hipertermia.

Palabras clave: Temperatura corporal, sintetasa del óxido nítrico.

SUMMARY. This is a trial for quantitative assessment of the nitric oxide synthetase, either dependent or not from calcium in resected tissue of rats which were under the effect of anesthetics at difference temperatures of 28, 37 and 40° C. Influence of body temperature on the induction of nitric oxide produced by lipopolysaccharid in rats was evaluated as well. Response to fenilephrine in the isolated aorta of rats submitted to different temperatures at 28, 37 and 39° C and the diverse incubation spans, with or without lipopolysaccharid in presence of L-arginine (precluder or nitric oxide) or N-iminoethyl-L-ornithyne (inhibitor of the nitric oxide synthesis) was assessed in order to determine if body temperature influences on the enzymatic activity or indirectly modifies the nitric oxide production through the release of other mediators. In vivo trials had a duration of six hours, except for the group of hyperthermia (40° C) because of their survival was less than three hours. Results demonstrated that in hypothermia (28° C) the treatment by lipopolisaccharid did not increase the nitric oxide synthetase activity. On the other hand, hyperthermia by itself, even without treatment by lipopolysaccharid, increased activity of both enzymes in íleon and liver; that which was independent of calium, increase in íleon, liver and lungs. Hyperthermia increased as well the inductor effect of lipopolysaccharid in liver. Initial response of the aorta sections to fenilephrine was the same in all cases. Incubation by five hours (regardless of temperature or presence of lipopolysaccharid) increase the 50-effective dose to fenilephrine and such an effect was potentiated by L-Arginine and inhibited by N-iminoethyl-L-ornithyne which indicates increased releasing of nitric oxide. These are not concluding results since the presence of lipopolysaccharid by bacterial contamination of fluids has not been discarded. It is concluded that changes in body temperature modify the *in vivo* synthesis of nitric oxide perhaps by the release of other mediators such as cytokines or the lipopolysaccharid of translocated bacteriae. It should be necessary to perform a quantitative evaluation of such mediators at the same time to the assessment of nitric oxide in rats under hyperthermia in order to determine the last hypothesis.

* Escuela Médico Militar.

** Escuela Militar de Graduados de Sanidad México, D.F.

Key words: Body temperature, nitric oxide synthetase.

La fiebre se considera no sólo un signo en respuesta a la agresión, sino un fenómeno que ayuda al huésped a defenderse; sin embargo, cuando es muy elevada o prolongada produce más daño que beneficio, como es el caso del golpe de calor, que es un síndrome complejo desencadenado por la hipertermia y caracterizado por hipotensión severa, delirio y convulsión que puede dar lugar a daño tisular, disfunción orgánica, coma y muerte.¹ El golpe de calor probablemente esté mediado por la liberación de citocinas o del lipopolisacárido (LPS) de las bacterias traslocadas del tracto gastrointestinal a la circulación.²

Por otra parte, el óxido nítrico (NO), considerado uno de los mediadores de la citotoxicidad de los macrófagos activados, se sintetiza a partir de uno de los átomos de nitrógeno del guanidino terminal de la L-arginina (L-Arg), dando como coproducto la L-citrulina³ y es a través de por lo menos dos sistemas enzimáticos.⁴ Uno es calcio dependiente y responsable de la liberación continua de pequeñas cantidades de NO y el otro es independiente de calcio y produce grandes cantidades sólo bajo el estímulo de citocinas, como el factor de necrosis tumoral (FNT), el interferón gamma y las interleucinas 1 o 2;⁵⁻⁷ el LPS⁸ y algunas exotoxinas.⁹ La hiperproducción de NO por este sistema se ha relacionado con la descompensación del choque.

Aunque el papel de la temperatura en la regulación de la síntesis del NO se desconoce, el hecho de que la liberación de citocinas aumente con la hipertermia y disminuya con la hipotermia,^{1,10,11} sugiere que, al menos indirectamente, los cambios en la temperatura corporal podrían alterar la producción de NO.

El propósito de este trabajo es cuantificar la actividad de las sintetasas de NO dependiente e independiente de calcio en los tejidos obtenidos de ratas tratadas con LPS y sometidas a temperaturas de 28, 37 y 40° C, así como determinar la respuesta a la fenilefrina de las aortas aisladas sometidas a diferentes temperaturas (28, 37 y 39° C) y a diversos tiempos de incubación con y sin LPS.

Material y métodos

1. Cuantificación de las sintetasas de óxido nítrico.

Se utilizaron ratas Wistar machos (250-350 g de peso), anestesiadas (pentobarbital sódico ip. 45 mg/kg), mantenidas a temperatura ambiente, permitiendo el cambio espontáneo en la temperatura corporal, entre 28 a 30° C (grupo en hipotermia), 37° C (grupo en normotermia) o entre 38 a 41° C (grupo en hipertermia) de temperatura rectal mediante la aplicación en una cama de hielo o de calor con una lámpara incandescente. Cada uno de los grupos del modelo de choque endotóxico (LPS de *E. coli* iv. 4 mg/kg) tuvo un grupo control que fue sometido a los mismos procedimientos de anestesia y de control de temperatura y recibió, en lugar de LPS, solución salina isotónica. Seis horas después los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia. Se extrajeron el cerebro, corazón, bazo, hígado, fleon terminal y pulmones para la determinación de la actividad de las sin-

tetasas de NO por el método de conversión de ¹⁴C-L-Arg en ¹⁴C-L-citrulina (Salter M, 1991).

2. Efecto de la temperatura en la respuesta a la fenilefrina en aortas aisladas de rata.

Se utilizaron ratas Wistar machos (250-300 g de peso). Se sacrificaron por dislocación cervical, inmediatamente después se abrió el tórax, se disecó la aorta torácica y se aisló un segmento de aproximadamente 2 cm. Se limpió de tejido conectivo y se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 5 mm, manteniendo la integridad del endotelio. En todos los casos los anillos fueron colocados en un dispositivo para estudio de órgano aislado, con un volumen de 15 mL, bañados con solución de Krebs, pH 7.4, que se preparó cada día de experimento.

La dosis efectiva 50 se obtuvo por extrapolación en las curvas dosis-respuesta de cada experimento.

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ e.e.m. de *n* observaciones. Para determinar la significación de las diferencias entre las medias de diversos grupos se utilizó análisis de varianza unifactorial o bifactorial según el caso.

Se consideraron significativas las diferencias a un nivel de $p < 0.05$.

Resultados

1. Curso temporal de la temperatura rectal en ratas tratadas con LPS.

En las ratas tratadas con LPS que se mantuvieron a temperatura ambiente sin control de la temperatura corporal, se observó que la temperatura rectal descende de 37° C a 33.3° C durante los primeros 90 minutos después del tratamiento. Conforme pasa el tiempo la temperatura se recupera hasta llegar a límites normales después de 3 h de administrado el LPS (Figura 1).

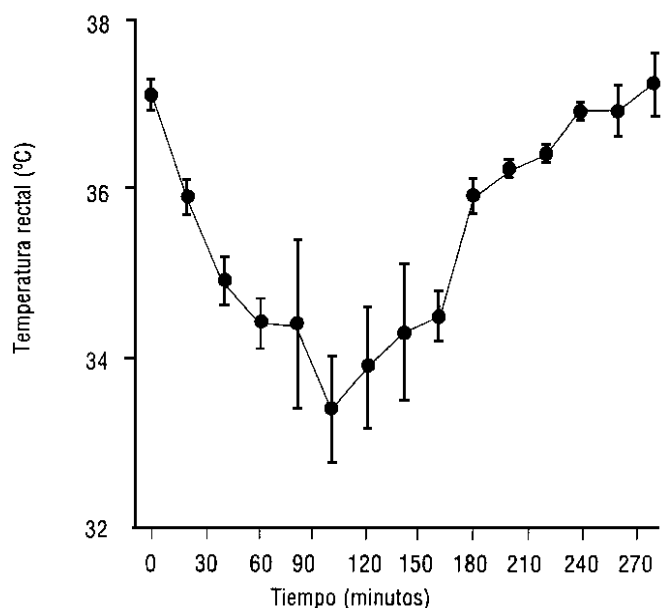


Figura 1. La figura muestra el curso temporal de la temperatura rectal en ratas a las que se les administro LPS (4 mg/kg iv). Los datos representan la media $\pm$ e.e.m. (*n* = 4).

Cuadro 1. Actividad de la sintetasa dependiente de calcio (pmol/min por mg de proteína, n = 4)

Grupo	Ileon	Hígado	Pulmón
1. 37° C sin LPS	24.7 ± 2.2	0	0.3 ± 0.2
2. 40° C sin LPS	41.4 ± 9.3	7.5 ± 3.9	0
3. 28° C con LPS	28.7 ± 7.2	0	0.8 ± 0.4
4. 37° C con LPS	36.0 ± 6.9	0.3 ± 0.2	0.9 ± 0.4
5. 40° C con LPS	29.6 ± 0.8	1.0 ± 0.5	1.6 ± 1.0

Media ± E.E.M.

LPS = Lipopolisacárido (4 mg/kg iv).

Cuadro 2. Actividad de la sintetasa independiente de calcio (pmol/min por mg de proteína, n = 4).

Grupo	Ileon	Hígado	Pulmón
1. 37° C sin LPS	0	5.2 ± 0.7	0
2. 40° C sin LPS	9.7 ± 1.1	14.0 ± 2.0	0.2 ± 0.1
3. 28° C con LPS	10.3 ± 5.8	4.7 ± 2.1	1.2 ± 0.6
4. 37° C con LPS	59.7 ± 10	15.1 ± 2.9	29.0 ± 5.9
5. 40° C con LPS	43.1 ± 14	33.4 ± 0.9	10.3 ± 2.1

Media ± E.E.M.

LPS = Lipopolisacárido (4 mg/kg iv)

2. Actividad de las sintetisas de óxido nítrico. (Los datos se expresan en los cuadros 1 y 2).

a. Los animales tratados con LPS y sometidos a hipertermia (40° C) no sobrevivieron más de 3 horas, mientras que en otros grupos se determinó el experimento 6 horas después de la administración de LPS.

b. La actividad de la sintetasa de óxido nítrico en corazón y cerebro fue la misma en todos los grupos.

c. En los animales mantenidos en hipotermia (28° C) y en los que permanecieron a 37° C sin la administración de LPS, la actividad de las sintetisas en pulmón, hígado e íleon fue semejante.

d. La hipertermia (40° C) aumentó significativamente la actividad de la sintetasa dependiente de calcio en hígado e íleon, y de la independiente de calcio en orden creciente en pulmón, hígado e íleon de los animales sin la administración de LPS (Figuras 2 y 3).

e. El tratamiento con LPS aumentó la actividad de la sintetasa independiente de calcio en el pulmón, hígado e íleon de los animales mantenidos a 37° C. Estos cambios no se dieron en el grupo con hipotermia (28° C), mientras que la hipertermia (40° C) potenció el efecto del LPS en hígado (Figura 4).

3. Efecto de la temperatura en la respuesta a la fenilefrina en aortas aisladas. (Los datos se expresan en el cuadro 3).

a. Se observa que en todos los casos (con y sin LPS y de 28 a 39° C), después de 5 horas de incubación, la curva dosis respuesta a la fenilefrina se desplazó a la derecha, lo que se reflejó en aumento de la DE50.

b. Los valores de la DE50 a la fenilefrina, después de 5 horas, tienden a ser mayores en los anillos incubados con LPS independientemente de la temperatura.

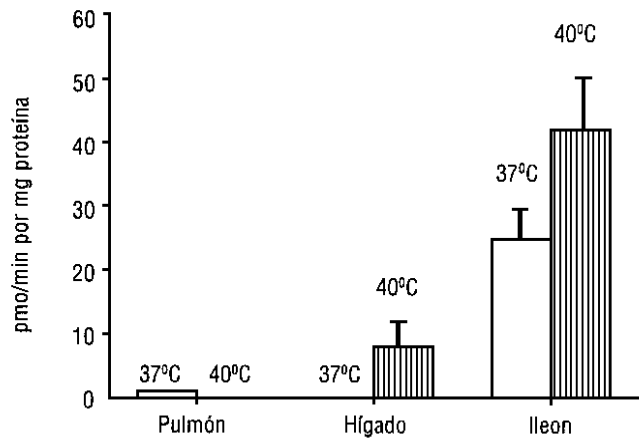


Figura 2. La figura muestra la actividad de la sintetasa de NO dependiente de calcio en pulmón, hígado e íleon a diferentes temperaturas sin tratamiento con LPS. Los datos representan la media ± e.em. (n = 4).

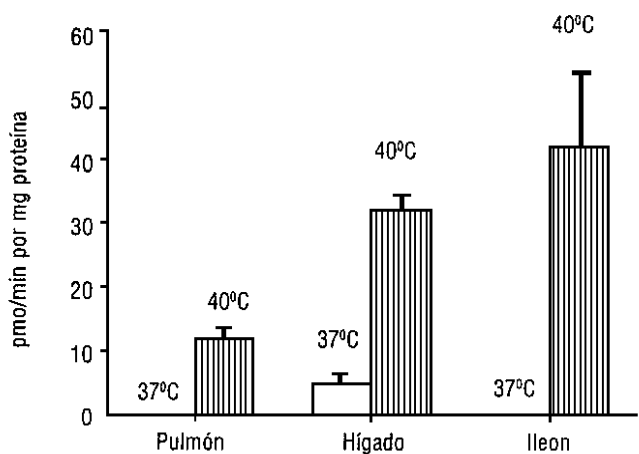


Figura 3. La figura muestra la actividad de la sintetasa de NO independiente de calcio en pulmón, hígado e íleon a diferentes temperaturas sin tratamiento con LPS. Los datos representan la media ± e.em. (n = 4).

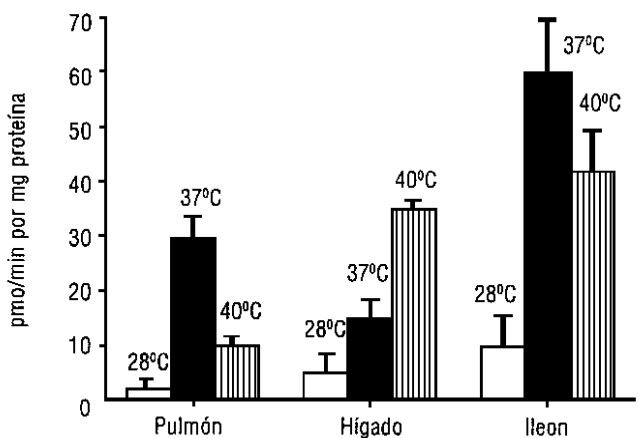


Figura 4. La figura muestra la actividad de la sintetasa de NO independiente de calcio en pulmón, hígado e íleon a diferentes temperaturas de ratas a las que se les administró LPS (4mg/kg i.v.). Los datos representan la media ± e.em. (n = 4).

c. La L-Arg aumenta el desplazamiento de la curva dosis respuesta a la fenilefrina en todos los casos. Los cambios mencionados (desplazamiento de la curva después de 5 horas y efecto de la L-Arg) fueron menores en los anillos incubados a 28° C.

Cuadro 3. Dosis efectiva 50 a fenilefrina en anillos de aorta de rata con endotelio
(1×10^{-8} M, $n = 4$)

Grupo	LPS	Inicial	5 h	L-Arg	L-NIO
28° C	Sí	1.8 ± 0.6	4.7 ± 0.1	6.0 ± 2.0	3.5 ± 0.6
	No	1.5 ± 0.5	4.0 ± 0.7	5.2 ± 1.2	2.9 ± 0.3
37° C	Sí	3.6 ± 0.9	8.3 ± 2.0	17 ± 5.1	5.8 ± 1.6
	No	2.6 ± 0.3	7.6 ± 0.9	23 ± 16	3.5 ± 2.4
39° C	Sí	2.2 ± 0.8	22 ± 14	15 ± 0.3	4.1 ± 0.2
	No	2.3 ± 0.1	8.6 ± 0.2	11 ± 5.3	6.4 ± 3.2

Media $\pm$ E.E.M.L-Arg = L-arginina (300 μ M)

LPS = Lipopolisacárido (100 ng/mL)

L-NIO = N-Iminoetil-L-ornitina (30 μ M)

d. La recuperación de la respuesta con L-NIO fue completa en los anillos incubados a 28° C, mientras que a 37 y 39° C el efecto fue parcial.

Discusión

El cambio de la temperatura rectal de los animales tratados con LPS que permanecieron a temperatura ambiente (15° C) fue semejante al informado por Derijk y cols.¹² La hipotermia que se produce durante los primeros 100 min se atribuye a la liberación de FNT y la posterior recuperación se ha relacionado con el aumento en IL-1, IL-6 y prostaglandina D2.¹²

En el presente estudio se valoró el efecto de la temperatura en la síntesis de NO, utilizando el modelo de choque endotóxico producido por LPS en la rata. Este es el modelo que más se ha empleado para estudiar la inducción de la síntesis de NO *in vivo*.^{13,14} Al igual que lo informado por otros autores,¹⁴ se observó inducción de la síntesis de NO en el pulmón, hígado e íleon después de 6 horas de la administración de la endotoxina. Aunque se piensa que en dicho modelo el estímulo para la síntesis de NO es el LPS,¹³ es probable que también participen diferentes citocinas (FNT, IL-1, IL-6) que liberan los macrófagos al ser estimulados por LPS¹⁵ y que a su vez son capaces de inducir la síntesis de NO.⁵⁻⁷ Además, se sabe que esas citocinas potencian la inducción de la sintetasa de NO producida por LPS en células aisladas.⁵⁻⁷

En el presente trabajo se observó aumento en la actividad de ambas sintetetasas en el hígado e íleon y de la independiente de calcio en el pulmón de los animales sometidos solamente a hipertermia, a diferencia de los tratados con LPS en los que aumentó sólo la sintetasa independiente de calcio. Es importante destacar que estos animales sobrevivieron menos de tres horas, tiempo que resultaría insuficiente para la inducción de la síntesis de por LPS, pero no por FNT.

Es probable que en el presente estudio, la hipertermia haya dado lugar a la liberación de citocinas y LPS, lo que explicaría el aumento "temprano" en la actividad de las sintetetasas de NO. Este mecanismo explicaría también porqué en los animales sometidos a hipertermia y tratados con LPS

la actividad de la sintetasa independiente de calcio fue mayor que en los que únicamente recibieron la endotoxina. Sin embargo, no puede descartarse el que la temperatura afecte directamente la actividad de la enzima.

Bernard y cols.¹⁶ observaron que en macrófagos aislados, activados con LPS, la hipertermia aumenta la producción de nitritos y nitratos (metabolitos del NO) y que ese efecto fue inhibido por la monometil-L-Arg, por lo que estiman que la hipertermia puede amplificar la inducción de la síntesis de NO. En el trabajo mencionado no se midió la actividad de la enzima y no se estudió la participación de las citocinas liberadas por el propio macrófago.

En este trabajo observamos que la hipotermia evitó el aumento en la actividad de las sintetetasas de NO producido por el LPS, lo que, al igual que los experimentos de Vidrio y García Márquez¹⁷ y Kader,¹⁸ sugiere que la hipotermia disminuye la producción de NO. Sin embargo, no se puede descartar algún efecto de la hipotermia en la producción de citocinas, puesto que se sabe que la disminución en la temperatura corporal produce disminución en la liberación de estos mediadores.¹²

Los experimentos realizados en los anillos de aorta se hicieron con el objeto de investigar el efecto de la temperatura en la producción de NO en un sistema aislado. Se observó que la DE50 a la fenilefrina inicial, no fue afectada por la temperatura y que en todos los casos de incubación desplazó la curva dosis respuesta hacia la derecha (tanto en preparaciones con como en las sin LPS) sólo después de 5 horas de incubación. Aunque la DE50 tendió a ser mayor en los anillos con endotoxina, no hubo diferencia significativa con respecto al comportamiento de los anillos sin LPS. En todos los casos la L-Arg aumentó el desplazamiento de la curva hacia la derecha y el L-NIO produjo recuperación de la respuesta a la fenilefrina. En las preparaciones incubadas a 28° C los cambios fueron menores y el efecto del L-NIO fue completo; sin embargo, las diferencias no fueron significativas.

Los hallazgos sugieren inducción de la síntesis de NO a las 5 horas (independiente del tratamiento con LPS) lo que podría explicarse por contaminación de la solución de Krebs, como ha sido informado por Rees.⁸ Para aclarar esa afirmación es necesario realizar los experimentos en presen-

cia de polimixina B que atrapa el LPS e inhibe su acción.¹⁹ Por otra parte, la hipotermia no inhibió completamente, ni la hipertermia potenció la inducción de la liberación de NO, lo que sugiere que en los experimentos *in vivo*, el efecto de la temperatura probablemente esté mediado por el cambio en la producción de citocinas. En el caso de la hipertermia producida *in vivo*, podría agregarse el paso de LPS a la circulación por traslocación bacteriana, lo que potenciaría el efecto de las citocinas sobre la liberación de NO. Es necesario cuantificar citocinas y LPS en los animales sometidos a las diferentes temperaturas.

Los resultados relatados en la literatura y el presente estudio sugieren que los cambios en la temperatura corporal alteran los mecanismos de regulación de la síntesis de NO. En forma empírica se ha dicho desde hace mucho tiempo que la fiebre es benéfica en la respuesta a las infecciones. Probablemente la fiebre, al estimular directa o indirectamente la producción de NO contribuya a facilitar la actividad citotóxica de los macrófagos; sin embargo, es probable que cuando, como también es conocido empíricamente, la fiebre es muy elevada o prolongada resulte más tóxica que benéfica al dar lugar a producción excesiva de NO, como podría ser el caso en el golpe de calor.

Conclusiones

1. La hipertermia (38 - 40° C) aumentó la actividad de la sintetasa de NO independiente de calcio en el íleon, hígado y pulmón de la rata anestesiada y la de la dependiente de calcio en íleon e hígado.
2. La hipertermia aumentó la inducción de la síntesis de NO a través de la enzima calcio independiente en el hígado de los animales tratados con LPS.
3. La hipotermia (28° C) evitó la inducción de la síntesis de NO por LPS en ratas anestesiadas.
4. Ni la hipotermia ni la hipertermia cambiaron la respuesta inicial a la fenilefrina en las aortas aisladas de rata.
5. Después de 5 horas de incubación, independientemente de la presencia de LPS y de la temperatura del baño (hiper, normo o hipotermia), la curva dosis respuesta a la fenilefrina en las aortas aisladas fue desplazada a la derecha, lo que se reflejó en aumento en la DE50. Este fenómeno se potenció con la incubación con L-Arg.
6. Independientemente de la presencia de LPS y de la temperatura del baño, la respuesta a la fenilefrina en las aortas aisladas se recuperó con L-NIO después de la incubación durante 5 horas y el tratamiento con L-Arg.
7. Puesto que se sabe que la hipertermia aumenta y la hipotermia disminuye la liberación de citocinas y debido a que en este trabajo los cambios en la producción de NO dependientes de la temperatura sólo se observaron *in vivo*, se piensa que la temperatura modula indirectamente la producción de NO, probablemente al alterar la liberación de citocinas.

8. Es necesario realizar experimentos en los que se mida, simultáneamente a la valoración de la producción de NO, la liberación de citocinas en animales sometidos a hiper o hipotermia.

Referencias

1. Bouchama A, Al-Sedairy S, Siddiqui S, Shail E, Rezeig M. Elevated pyrogenic cytokines in heatstroke. *Chest* 1993;104:1498-1502.
2. Hall DM, Buettner GR, Matthes RD, Gisolfi CV. Hypertermia stimulates nitric oxide formation: electron paramagnetic resonance detection of NO-heme in blood. *J Appl Physiol* 1994;77:548-553.
3. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Transac* 1989;17:542-543.
4. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Advances in Enzymology*, Ed. Alton Meister. Wiley, Nueva York 1992;Vol. 65:pp.287-346.
5. Gerard C et al. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1993;177:547-550.
6. Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. *Comp Biochem Physiol* 1994;108:11-18.
7. Koide M, Kawahara Y, Tsuda T, Nakayama I, Yokoyama M: Expression of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1994;23(Suppl):145-148.
8. Rees DD, Celletti S, Palmer RMJ, Moncada S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:541-547.
9. Fast DJ et al. Staphylococcal exotoxins stimulate nitric oxide-dependent murine macrophage tumoricidal activity. *Infection Immunity* 1991;59:2987-2993.
10. Tomasovic SP, Klostergaard J. Hyperthermic modulation of macrophage-tumor cell interactions. *Cancer and Metastasis Reviews* 1989;8:215-229.
11. Ryan AJ, Mathes RD, Mitros FA, Gisolfi CV. Heat stress does not sensitize rats to the toxic effects of bacterial lipopolysaccharide. *Med Sci Sports Exerc* 1994;26:687-694.
12. Derijk RH, Van Kampen M, Van Rooijen N, Berkenbosch F. Hypothermia to endotoxin involves reduced thermogenesis, macrophage-dependent mechanisms, and prostaglandins. *Am J Physiol* 1994;266:R1-R8.
13. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
14. László F, Whittle BJR, Moncada S. Interactions of constitutive nitric oxide with PAF and thromboxane on rat intestinal vascular integrity in acute endotoxaemia. *Br J Pharmacol* 1994;113:1131-1136.
15. Blondiau C, Lagadec P, Lejeune P, Onier N, Cavaillon J, Jeannin JF. Correlation between the capacity to activate macrophages *in vitro* and the antitumor activity *in vivo* of lipopolysaccharides from different bacterial species. *Immunobiology* 1994;190:243-254.
16. Bernard C, Merval R, Esposito B, Tedgui A. Elevated temperature accelerates and amplifies the induction of nitric oxide synthesis in rat macrophages. *Eur J Pharmacol* 1994;270:115-118.
17. Vidrio H, García Márquez. Reversal by hypothermia of vasodilator-induced tachycardia in anesthetized rats. *Arch Int Pharmacodyn* 1987;288:217-228.
18. Kader A, Frazzini VI, Baker CJ, Solomon RA, Trifiletti RR. Effect of mild hypothermia on nitric oxide synthesis during focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 1994;35:272-277.
19. Fukuoka S, Matsumoto M, Azumi R, Karube I. Thin film formation by rough form lipopolysaccharide and interaction with cationic antibiotic polymyxin b. *Microbios* 1994;78(316):169-176.