

Shock hemorrágico: óxido nítrico en ratas anestesiadas y no anestesiadas

NOELIA D. ARRECHE¹, LAURA B. VALDEZ², TAMARA ZAORBORNJ², BELÉN BARATTO¹, MARIANA VATRELA¹, CARLA MARTÍNEZ¹, ALBERTO BOVERIS², ANA M. BALASZCZUK¹, ANDREA L. FELLETT¹

Recibido: 15/12/2008

Aceptado: 07/04/2009

Dirección para separatas:

Prof. Dra. Andrea Fellet
Cátedra de Fisiología
Facultad de Farmacia y
Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Junín 956 - Piso 7
(C1113AAD) Buenos Aires,
Argentina
Tel.-Fax 4964-8280/309
e-mail: afellet@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Antecedentes

En un trabajo previo mostramos que el estado hipovolémico inducido por una pérdida aguda de sangre se acompaña de una activación dinámica, heterogénea y dependiente del tiempo de la óxido nítrico sintetasa (NOS) cardíaca. Este sistema estaría involucrado en las alteraciones hemodinámicas que se observan luego de la depleción de volumen sanguíneo.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación del sistema del óxido nítrico (NO) mitocondrial en la respuesta adaptativa del sistema cardiovascular ante un *shock* hipovolémico en ratas anestesiadas y no anestesiadas.

Material y métodos

El estudio se llevó a cabo con cuatro grupos de animales (n = 7 por grupo): grupo A, ratas control anestesiadas; grupo C, ratas control no anestesiadas; grupo AH, ratas anestesiadas sometidas a una hemorragia (20% de la volemia) y grupo CH, ratas no anestesiadas sometidas a una hemorragia. Se evaluaron el consumo de oxígeno, la actividad funcional de la NOS mitocondrial (mtNOS) y la producción mitocondrial de NO.

Resultados

No se observaron diferencias significativas entre los valores de control respiratorio en los distintos grupos estudiados. La actividad funcional de la mtNOS fue menor en el grupo AH respecto del grupo A (12 ± 2 y 19 ± 1 , respectivamente). Este efecto fue de menor magnitud cuando la hemorragia se provocó en animales no anestesiados (17 ± 1 y 20 ± 1 , respectivamente). La producción mitocondrial de NO disminuyó en los grupos sometidos a una pérdida aguda de sangre, tanto no anestesiados como anestesiados, respecto de los animales controles.

Conclusiones

El sistema del NO mitocondrial estaría involucrado en la respuesta de adaptación del sistema cardiovascular frente a la depleción aguda de volumen. Esta participación dependería del grado de anestesia del animal.

REV ARGENT CARDIOL 2009;77:181-186.

Palabras clave > Hemorragia - Óxido nítrico - Mitocondria - Hipotensión

Abreviaturas

ANOVA	Análisis de la varianza de una variable	NO	Óxido nítrico
FC	Frecuencia cardíaca	NOS	Óxido nítrico sintetasa
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil éster	PAM	Presión arterial media
mtNOS	Óxido nítrico sintetasa mitocondrial		

INTRODUCCIÓN

El *shock* hemorrágico conduce frecuentemente a una disfunción de diferentes órganos vitales, lo que origina una incidencia elevada de morbimortalidad. (1) El corazón, uno de los órganos afectados, participa de

manera trascendente en la respuesta de adaptación del organismo ante la hipotensión inducida por la pérdida aguda de sangre. La adaptación cardiovascular durante este estado hipovolémico depende no sólo del control del sistema nervioso autónomo, sino también de la magnitud y de la velocidad del sangrado y de la

¹ Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, IQUIMEFA-CONICET

² Cátedra de Físicoquímica, Laboratorio de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

especie estudiada. (2) La pérdida aguda de volumen sanguíneo induce inestabilidad hemodinámica, disminución en la perfusión tisular e hipoxia celular, entre otras alteraciones. (3) Existen evidencias que muestran que el aumento de la producción de óxido nítrico (NO) durante una hemorragia descompensada contribuye a la hiporreactividad vascular y, probablemente, a la alteración de la regulación autonómica de la función cardíaca. (4, 5) En estudios previos mostramos que el estado hipovolémico inducido por una pérdida aguda de sangre se acompaña de una activación dinámica, heterogénea y dependiente del tiempo de la NO sintetasa (NOS) cardíaca. El aumento de la producción de NO en el corazón sería de origen endotelial en las fases más tempranas (60 min) luego de la pérdida de sangre. Sin embargo, en las etapas más tardías (120 min), la expresión de la isoforma inducible es la que predomina y constituye la principal fuente de producción de NO en esta fase. (6) Resultados de nuestro laboratorio muestran que la inhibición del sistema del NO, con L-NAME, atenúa la respuesta taquicardizante inducida por el estado hipovolémico. (6) Es conocido que las funciones que ejerce el NO sobre el sistema cardiovascular están mediadas por la reacción del NO con diferentes moléculas blanco que incluyen a las hemoproteínas, grupos tioles y anión superóxido. En la mitocondria se encuentran varias hemoproteínas (citocromo c oxidasa), grupos tioles (enzima glutatión peroxidasa) y proteínas que contienen residuos de cisteína que son una fuente celular importante de producción de anión superóxido y contribuyen de esta manera a varias de las funciones biológicas del NO. (7) Se han observado alteraciones en la actividad de la NOS mitocondrial (mtNOS) en diferentes situaciones, como adaptación a una biodisponibilidad menor de oxígeno e hipoxia, adaptación a temperaturas bajas y procesos relacionados con la vida y la muerte celular, entre otras. (8, 9) Sin embargo, el papel del NO mitocondrial en la respuesta de adaptación del organismo al *shock* hemorrágico se conoce muy poco. En este trabajo quisimos evaluar si la producción mitocondrial de NO modularía la eficiencia del mecanismo de adaptación cardiovascular ante un desequilibrio homeostático inducido por la depleción aguda de volumen y, además, si esta respuesta dependería del estado de consciencia del individuo estudiado. La concentración de NO en el estado estacionario modularía la actividad bioenergética y funcional de las mitocondrias regulando de esta manera la actividad celular en el estado hipovolémico. Teniendo en cuenta la hipótesis planteada, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación del NO mitocondrial en la respuesta de adaptación del sistema cardiovascular ante un *shock* hemorrágico en ratas anestesiadas y no anestesiadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho (230-250 g). Los animales se mantuvieron en un ambiente con humedad y

temperatura controlada con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas. Los animales fueron alimentados con una dieta balanceada provista por Nutrientos Purina, Argentina y con agua *ad libitum* hasta el día de los experimentos. Todos los animales incluidos en los protocolos experimentales se trataron de acuerdo con los lineamientos y los principios de la Disposición N° 6344-96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación.

Animales no anestesiados durante la hemorragia

Los animales fueron anestesiados con éter y mantenidos en este estado durante toda la cirugía. Se les canuló la arteria femoral derecha e izquierda para la medición de la presión arterial media (PAM) y de la frecuencia cardíaca (FC) y para realizar el sangrado, respectivamente. Los animales fueron colocados en jaulas metabólicas 24 horas antes del momento de realizar el experimento.

Animales anestesiados durante la hemorragia

Los animales fueron anestesiados con etiluretano (1,0 g/kg peso, ip). La temperatura corporal fue monitorizada con un termómetro rectal y mantenida entre 36 y 38 °C durante todo el tiempo experimental. Se practicó la traqueotomía mediante un tubo de polietileno (PE-240) con el objetivo de mantener una ventilación pulmonar correcta. Luego se canuló la arteria femoral derecha e izquierda para la medición de la PAM y de la FC y para realizar el sangrado, respectivamente. La medición de la PAM se realizó mediante un transductor de presión (Statham P23 ID, Gould Inst. Cleveland, OH) y se registró con un polígrafo (Physiograph E & M Co, Houston, TX). Los valores de FC se obtuvieron a partir de la señal de presión pulsátil latido a latido mediante un tacógrafo preamplificador (S77-26 tachometer, Coulbourn Inst., Allentown, PA). Para la adquisición de datos se utilizó el programa Labtech Notebook (Laboratory Tech., Wilmington, MD). Se realizó la monitorización continua de los valores de la PAM y de la FC. El *shock* hemorrágico se indujo por una pérdida del 20% del volumen sanguíneo total, durante 2 min, a velocidad de flujo constante. El volumen de sangrado (20% de la volemia) se calculó individualmente a partir del volumen sanguíneo total correspondiente al peso corporal de cada animal.

Protocolo experimental

Se utilizaron cuatro grupos experimentales:

1. Ratas controles anestesiadas (A): después de un período de estabilidad de 15 minutos, se midieron los valores basales de PAM durante 5 minutos. Luego se registraron continuamente los valores de PAM y de FC durante 120 minutos (n = 7).
2. Ratas controles no anestesiadas (C): después de un período de estabilidad de 15 minutos, se midieron los valores basales de PAM durante 5 minutos. Luego se registraron continuamente los valores de PAM y de FC durante 120 minutos (n = 7).
3. Ratas anestesiadas sometidas a hemorragia (AH): después de un período de estabilización de 15 minutos, se midieron los valores de PAM y de FC durante 5 minutos y las ratas fueron sujetas a hemorragia del 20% de la volemia. Luego se registraron continuamente los valores de PAM y FC durante 120 minutos (n = 7).
4. Ratas no anestesiadas sometidas a hemorragia (CH): después de un período de estabilización de 15 minutos, se midieron los valores de PAM y de FC durante 5 minutos y las ratas fueron sujetas a hemorragia del 20% de la volemia. Luego se registraron continuamente los valores de PAM y FC durante 120 minutos (n = 7).

Aislamiento de la fracción mitocondrial del corazón: finalizado el tiempo experimental, los animales de los cuatro grupos fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se extrajeron los corazones y se colocaron en manitol 0,23 M, sacarosa 0,07 M, EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) (MSTE). Los tejidos fueron homogeneizados con un homogenizador Teflon Potter-Elvehjem en MSTE (9 ml/g de corazón). Se centrifugó el homogenato a 700 g durante 10 min, se separó el sobrenadante y éste se centrifugó a 8.000 g durante 10 min. Se separó la fracción mitocondrial, se lavó y se suspendió en *buffer* MSTE. Todos los procedimientos se realizaron a una temperatura de 0-2 °C. La cuantificación de las proteínas en cada una de las fracciones mitocondriales se realizó mediante el método de Lowry. (10)

Respiración mitocondrial y actividad funcional de la mtNOS: en las fracciones mitocondriales provenientes de cada grupo de animales se determinó el consumo de oxígeno polarográficamente con un electrodo tipo Clark en una cámara de 1,5 ml a 30 °C en el siguiente medio de reacción: manitol 0,23 M, sacarosa 0,07 M, Tris-HCl 20 mM, *buffer* fosfato 5 mM, EDTA 1 mM (pH 7,4), saturado con aire (O₂ 225 mM), y con 0,5-1,0 mg de proteína mitocondrial/ml. Las mitocondrias se suplementaron con succinato 7 mM como sustrato, en ausencia (estado 4) o en presencia (estado 3) de 0,5 mM de ADP 5 mM. El consumo de oxígeno se expresó en ng-át O/min.mg proteína. El control respiratorio (estado 3/ estado 4) se calculó según lo descrito por Boveris y colaboradores en 1999. (10) La respiración en el estado 3 regulada por la mtNOS, denominada actividad funcional de la mtNOS, se calculó como la diferencia entre el estado 3 de la respiración [mitocondrial en una condición de máximo nivel de NO intramitocondrial [agregado de arginina 1 mM y de Cu,Zn-superóxido dismutasa (SOD) 0,5 μM] y una condición de mínima producción de NO [agregado de L-NAME 2 mM y oxihemoglobina (HbO₂) 10 mM]. (8)

Producción de NO: para determinar la producción de NO se midió espectrofotométricamente a 577-591 nm (Beckman DU 7400 espectrofotómetro de diodo *array*) la oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina a 37 °C. (11) Se utilizó el medio de reacción K₂HPO₄/KH₂PO₄ 50 mM (pH 7,4), L-arginina 1 mM, CaCl₂ 1mM, NADPH 0,1 mM, ditiotreitól 10 mM, SOD 2 mM, catalasa 0,1 mM y oxihemoglobina 30 mM. Se realizaron experimentos control agregando al medio de reacción NG-metil-L-arginina (L-NMMA) 1 mM con el objeto de considerar solamente la oxidación de la hemoglobina sensible al L-NMMA debida a la formación de NO y se expresó como nmol NO/min.mg proteína.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media ± error estándar de la media (EEM). Para el análisis de los datos se utilizó el análisis de la varianza de una variable (ANOVA) seguido *a posteriori* de una prueba de Bonferroni para múltiples comparaciones. Se empleó la prueba de la *t* de Student para comparar los datos apareados o no apareados entre dos grupos. Se consideró significativo el 5% de probabilidad. Para el análisis estadístico se utilizó el programa de estadística GraphPad Prism versión 3.02 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Cambios en la presión arterial media y en la frecuencia cardíaca

En la Figura 1 (gráficos A y B) se ilustra el curso temporal de la PAM en los grupos AH y CH. La pérdida de sangre en los animales anestesiados indujo

una reducción de la PAM; este parámetro se estabilizó en valores cercanos a 50 ± 5 mm Hg (*p < 0,01 *versus* valores basales) a los 15 min del sangrado. Dicha hipotensión se mantuvo a lo largo de todo el período experimental. El pretratamiento con L-NAME no atenuó la hipotensión inmediata ocasionada por la hemorragia en estos animales, pero restauró los valores de PAM sin que se observaran a partir de los 30 min diferencias significativas con respecto a los valores basales. En los animales no anestesiados, la hipotensión inmediata inducida por la hemorragia fue de similar magnitud a la observada en los animales anestesiados (25 ± 4 mm Hg a los 2 min); dicho parámetro se estabilizó en valores cercanos a 100 mm Hg luego de 5 min del sangrado. Este valor de PAM se mantuvo a lo largo de todo el tiempo experimental.

En los gráficos C y D de la Figura 1 se ilustra el curso temporal de la FC. En el grupo AH, la hemorragia indujo, luego de la esperada taquicardia refleja, una respuesta bradicardizante seguida de un incremento gradual en las fases más tardías (FC basal = 322 ± 6; FC 60 min = 352 ± 7*; FC 120 min = 382 ± 6*, *p < 0,01 *versus* valores basales). El pretratamiento con L-NAME anuló los cambios en la FC inducidos por la hemorragia (basal FC = 328 ± 10, FC 60 min = 334 ± 15, FC 120 min = 335 ± 17). En los animales no anestesiados no se observó la respuesta bradicardizante. La FC aumentó progresivamente después de la hemorragia, luego se estabilizó (45 min) y se mantuvo hasta finalizado el tiempo experimental (FC basal = 353 ± 7, FC 60 min = 396 ± 6*; FC 120 min = 392 ± 4*, *p < 0,01 *versus* valores basales).

Función respiratoria mitocondrial: en la Tabla 1 se puede observar que no hubo diferencias significativas en el control respiratorio entre los grupos A, AH, C y CH. El consumo de oxígeno en el estado 4 aumentó en el grupo AH respecto del grupo A, mientras que este parámetro no se modificó en los animales del grupo CH respecto del grupo C. El consumo de oxígeno en el estado 3 luego de la hemorragia mostró un patrón similar de respuesta al del estado 4 tanto en los animales anestesiados como en los no anestesiados. La respiración mitocondrial regulada por mtNOS, denominada actividad funcional de la mtNOS, fue menor en el grupo AH respecto del grupo A (12 ± 2 y 19 ± 1, respectivamente). Sin embargo, esta disminución fue de menor magnitud en los animales no anestesiados en comparación con el grupo C (17 ± 1 y 20 ± 1, respectivamente) (Tabla 1).

Actividad bioquímica de la mtNOS: la capacidad de las mitocondrias cardíacas de producir NO se evaluó mediante la determinación de la actividad de la mtNOS de la fracción mitocondrial en presencia de los sustratos y cofactores correspondientes. Nuestros resultados mostraron que la producción mitocondrial de NO disminuyó en los grupos AH y CH (48% y 59%, respectivamente) en comparación con los grupos controles (Figura 2).

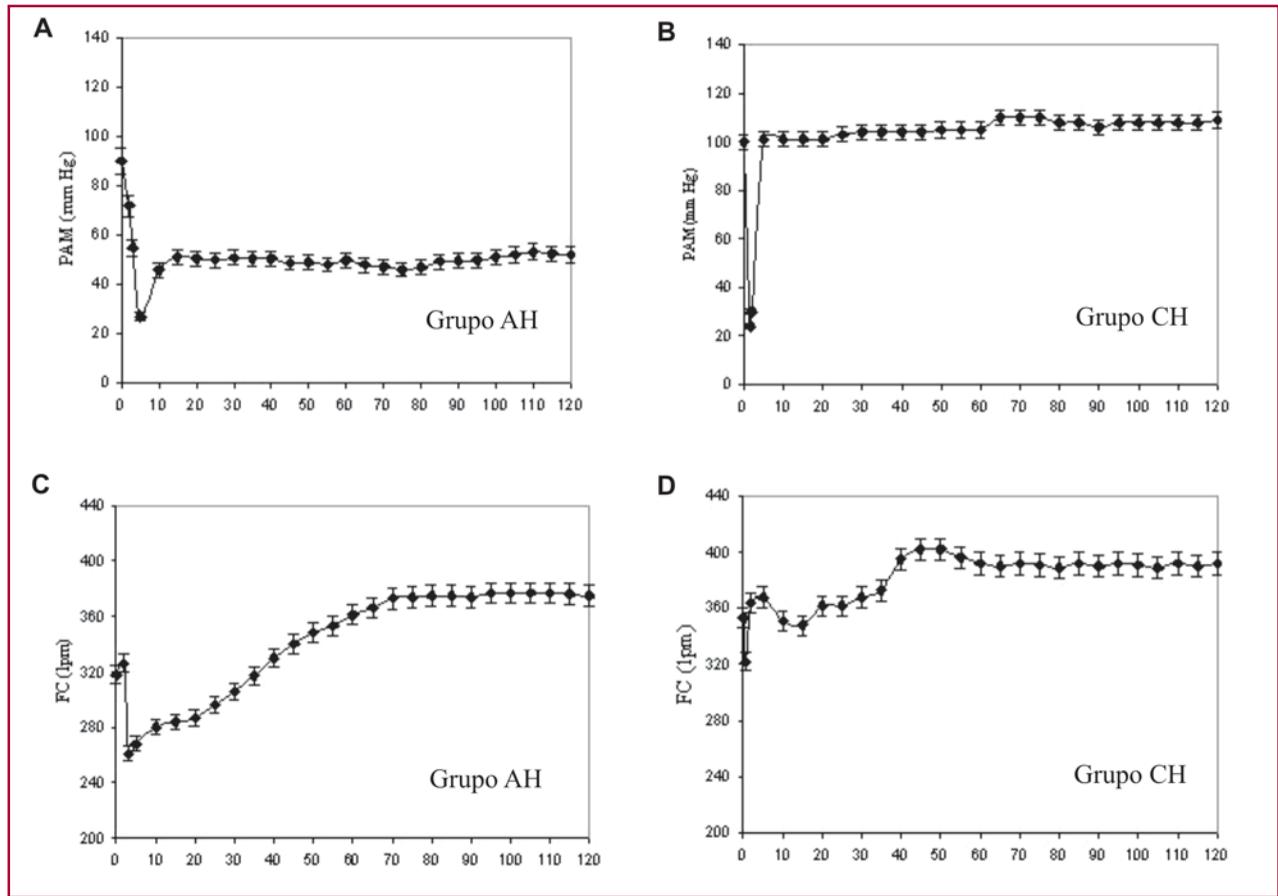


Fig. 1. Curso temporal de la presión arterial media (PAM) (A y B) y de la frecuencia cardíaca (FC) (C y D). Ratas anestesiadas con hemorragia (AH) y ratas no anestesiadas con hemorragia (CH); *p < 0,01 versus valores basales (n = 7 por grupo).

Succinato	Respiración mitocondrial (ng-át O/min.mg proteína)			
	Grupo A	Grupo AH	Grupo C	Grupo CH
Origen				
Estado 3	223 ± 10	251 ± 8 [#]	225 ± 10	211 ± 9
Estado 4	111 ± 8	144 ± 8 ^{*#}	109 ± 8	95 ± 5
Control respiratorio	2,03	1,75	2,06	2,22
L-arginina (a)	205 ± 14	232 ± 14	202 ± 16	213 ± 14
L-NMMA (b)	249 ± 26	263 ± 22	248 ± 31	250 ± 12
Actividad mtNOS (b - a / a x 100)	19	12	20	17

Animales control (anestesiados: grupo A; no anestesiados: grupo C) y animales con hemorragia (anestesiados: grupo AH; no anestesiados: grupo CH). Valores correspondientes a media ± EEM. *p < 0,05 versus C; [#]p < 0,05 versus A (n = 7 por grupo).

Tabla 1. Consumo de oxígeno mitocondrial y actividad funcional de la mtNOS

DISCUSIÓN

El principal hallazgo de este trabajo es que la respuesta de adaptación cardiovascular a la depleción de volumen inducida por una hemorragia aguda involucra al sistema del óxido nítrico mitocondrial y su efecto sobre el metabolismo energético es diferente en animales anestesiados y no anestesiados.

La pérdida de sangre correspondiente al 20% de la volemia indujo un descenso rápido y significativo de

la presión arterial tanto en los animales anestesiados como en los no anestesiados (70% y 76%, respectivamente). Sin embargo, sólo los animales anestesiados mantuvieron este estado hipotensivo durante todo el tiempo experimental. Estas observaciones sugieren que la hipotensión inmediata no dependería del estado de consciencia. El sistema del NO y otros factores neurohormonales (catecolaminas, endotelinas, vasopresina, sistema renina-angiotensina), como también la depleción del volumen sanguíneo, serían responsa-

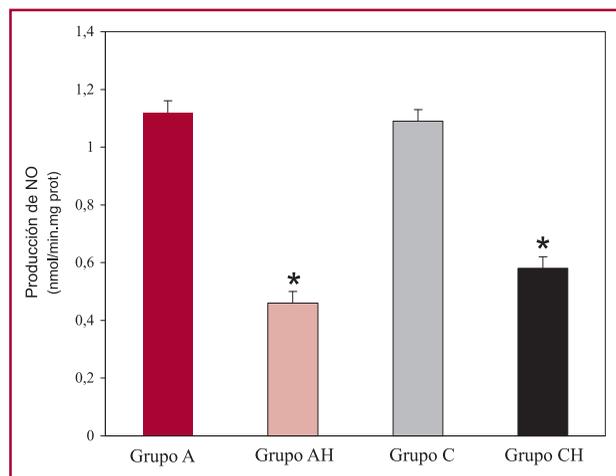


Fig. 2. Producción mitocondrial de NO. Animales control (anestesiados: grupo A; no anestesiados: grupo C) y animales con hemorragia (anestesiados: grupo AH; no anestesiados: grupo CH). Valores expresados como media \pm EEM. * $p < 0,05$ versus A o C ($n = 7$ por grupo).

bles de la respuesta vascular sistémica observada en este modelo experimental. Se ha comunicado un aumento en los niveles circulantes de estos factores durante un *shock* hemorrágico. (12-15)

Al evaluar la respuesta cronotrópica, se observa que el patrón de respuesta inducido por el estado hipovolémico fue diferente entre los animales anestesiados y no anestesiados. La pérdida aguda de sangre indujo, luego de la inmediata y esperada taquicardia refleja, una breve bradicardia seguida por un incremento gradual y progresivo de la frecuencia cardíaca a los 60 y a los 120 minutos (14% y 18%, respectivamente) en los animales anestesiados. Sin embargo, la fase bradicardizante fue de muy corta duración, seguida de un incremento gradual en los animales no anestesiados. La identificación del NO como la molécula mensajera que controla la presión arterial y la frecuencia cardíaca constituye un hito en la comprensión del modo de acción del NO en diversos escenarios fisiológicos. Hace apenas 20 años hubiera sido difícil aceptar la hipótesis de que un gas tóxico ejerciera funciones importantes como mediador del metabolismo celular. En la actualidad ha adquirido creciente interés el papel que desempeña el NO como regulador paracrino o autocrino de la función miocárdica. (16, 17) Existen evidencias que muestran que en el corazón de rata el NO modularía las respuestas betaadrenérgicas inhibiendo la liberación de norepinefrina de las terminales nerviosas simpáticas y facilitando el tono vagal. (18) De esta manera, el NO contribuiría al control autonómico de la frecuencia cardíaca y de la fuerza de contracción en las etapas más tempranas del *shock* hemorrágico. Sin embargo, este efecto estaría atenuado en los animales no anestesiados, al menos en parte, por un tono simpático basal mayor.

El corazón participa de una manera trascendente en la respuesta de adaptación ante la hipotensión inducida por el estado hipovolémico. La pérdida de sangre constituye un estímulo estresante para el sistema cardíaco al causar disminución de la precarga y de la perfusión tisular. (19) En la Tabla 1 se puede observar que las mitocondrias de los corazones aislados de los grupos A, AH, C y CH presentaron valores altos de control respiratorio, lo cual indica que las organelas eran capaces de realizar adecuadamente el proceso de fosforilación oxidativa. Además, en este trabajo hemos demostrado que la pérdida aguda de sangre indujo una disminución de la actividad funcional de la mtNOS, evaluada a través del consumo de O_2 , en los dos grupos de animales. Sin embargo, estos cambios fueron de menor magnitud en los animales no anestesiados. Además, nuestros resultados mostraron que el estado hipovolémico inducido por hemorragia se acompaña de una disminución en la producción mitocondrial de NO tanto en los animales anestesiados como en los no anestesiados. Nuevamente, los cambios observados en los animales no anestesiados fueron de menor magnitud. La mayor concentración de NO en los animales no anestesiados sometidos a hemorragia estaría relacionada con una actividad mayor del sistema nervioso simpático que presentan estos animales, entre otros factores. Este hecho explicaría al menos en parte la rápida recuperación de la presión arterial y la taquicardia que presentan estos animales luego de la pérdida de sangre.

CONCLUSIONES

En resumen, el presente estudio muestra que la pérdida aguda de sangre disminuye la producción mitocondrial de NO en el tejido cardíaco modulando la eficiencia del mecanismo de adaptación cardiovascular ante un desequilibrio homeostático inducido por la depleción aguda de volumen y esta respuesta dependería de la administración o no de anestesia al individuo estudiado.

SUMMARY

Hemorrhagic Shock: Nitric Oxide in Anesthetized and Non Anesthetized Rats

Background

We have previously demonstrated that hypovolemia induced by acute bleeding is accompanied by a dynamic, heterogeneous and time-dependent activation of the cardiac nitric oxide synthase (NOS). This system might be involved in the hemodynamic anomalies observed after blood volume depletion.

Objective

To assess the role of the mitochondrial nitric oxide (NO) system in the adaptive response of the cardiovascular system in anesthetized and non anesthetized rats under hypovolemic shock.

Material and Methods

Animals were divided in four groups (n=7 animals per group): Group A, anesthetized control rats; group C, non anesthetized control rats; group AB, anesthetized rats subjected to bleeding (20% of blood volume), and group CB, non anesthetized rats subjected to bleeding. Oxygen consumption, functional activity of mitochondrial NOS (mtNOS) and mitochondrial production of NO were assessed.

Results

There were no significant differences in the values of respiratory parameters among the different study groups. Group AB had less functional activity of mtNOS compared to group A (12 ± 2 and 19 ± 1 , respectively). This effect was even lower in non anesthetized animals subjected to bleeding (17 ± 1 and 20 ± 1 , respectively). Mitochondrial production of NO decreased in anesthetized and non anesthetized animals with acute bleeding compared to controls.

Conclusions

Mitochondrial NO system might be involved in the adaptive response of the cardiovascular system under acute volume depletion, depending on the animal's degree of anesthesia.

Key words > Hemorrhage - Mitochondria - Nitric Oxide - Hypotension

BIBLIOGRAFÍA

- Cooke WH, Ryan KL, Convertino VA. Lower body negative pressure as a model to study progression to acute hemorrhagic shock in humans. *J Appl Physiol* 2004;96:1249-61.
- Schadt JC, Ludbrook J. Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1991;260:H305-18.
- Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 2001;345:588-95.
- Thiemermann C, Wu CC, Szabo C, Perretti M, Vane JR. Role of tumour necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in a rat model of endotoxin shock. *Br J Pharmacol* 1993;110:177-82.
- Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Cardiac and regional haemodynamics, inducible nitric oxide synthase (NOS) activity, and the effects of NOS inhibitors in conscious, endotoxaemic rats. *Br J Pharmacol* 1995;116:2005-16.
- Balaszczuk AM, Arreche ND, Mc Laughlin M, Arranz C, Fellet AL. Nitric oxide synthases are involved in the modulation of cardiovascular adaptation in hemorrhaged rats. *Vascul Pharmacol* 2006;44:417-26.
- Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 2003;27:325-55.
- Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 2005;396:444-55.
- Franco MC, Antico Arciuch VG, Peralta JG, Galli S, Levisman D, López LM, et al. Hypothyroid phenotype is contributed by mitochondrial complex I inactivation due to translocated neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 2006;281:4779-86.
- Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ. Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol* 1999;301:188-98.
- Boveris A, Alvarez S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1186-93.
- Fujisawa Y, Mori N, Yube K, Miyataka H, Miyatake A, Abe Y. Role of nitric oxide in regulation of renal sympathetic nerve activity during hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol* 1999;277:8-14.
- Moreno C, Lopez A, Llinas MT, Rodriguez F, Lopez-Farre A, Nava E. Changes in NOS activity and protein expression during acute and prolonged Ang II administration. *Am J Physiol* 2002;282:31-7.
- Sharma JR, Setlur R. Vasopressin in hemorrhagic shock. *Anesth Analg* 2005;101:833-4.
- Bitterman H, Phillips GR 3rd, Dragon G, Lefer AM. Potentiation of the protective effects of a converting enzyme inhibitor and a thromboxane synthetase inhibitor in hemorrhagic shock. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;242:8-14.
- Musialek P, Lei M, Brown HF, Paterson DJ, Casadei B. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, I(f). *Circ Res* 1997;81:60-8.
- Cotton JM, Kearney MT, MacCarthy PA, Grocott-Mason RM, McClean DR, Heymes C, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibition on basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo. *Circulation* 2001;104:2318-23.
- Yoshihide F, Naoko M, Kouichi Y, Hiroshi M, Aikira M, Youichi A. Role of nitric oxide in regulation of renal sympathetic nerve activity during hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol* 1999;277:8-14.
- Zaobornyj T, Valdez LB, La Padula P, Costa LE, Boveris A. Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium. II. mtNOS activity. *J Appl Physiol* 2005;98:2370-5.