

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

PAPEL DE LAS DIMETILARGININAS EN LA
HIPERTENSIÓN PORTAL Y CIRROSIS EXPERIMENTAL

EVA SERNA GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 de maig de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Jose M. Vila Salinas
- D. Angel Cogollado Torralba
- D. Francisco Javier Romero Gómez
- D. Francisco Pérez Vizcaino
- D^a. M. Dolores Ivorra Insa

Va ser dirigida per:

D. Salvador Lluch López

D^a. M. Antonia Noguera Romero

D^a. Paloma Lluch García

©Copyright: Servei de Publicacions
Eva Serna García

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7241-8

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

**PAPEL DE LAS DIMETILARGININAS
EN LA HIPERTENSIÓN PORTAL
Y CIRROSIS EXPERIMENTAL**

TESIS DOCTORAL

presentada por:

Eva Serna García

Valencia, 2008



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

D. Salvador Lluch López, Profesor Emérito de la Universidad de Valencia, Dña. M^a Antonia Noguera Romero, Profesora Titular de Farmacología de la Universidad de Valencia y Dña. Paloma Lluch García, Servicio de Hepatología, Hospital Clínico Universitario de Valencia.

CERTIFICAN

Que la Memoria Titulada “Papel de las dimetilargininas en la hipertensión portal y cirrosis experimental”, realizada por la licenciada en Farmacia **Dña. Eva Serna García**, ha sido llevada a cabo bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Valencia, a 10 de marzo de 2008

Fdo.:

D. Salvador Lluch

Fdo.:

Dña. M^a Antonia Noguera

Fdo.:

Dña. Paloma Lluch

Agradecimientos

Deseo expresar mi gran agradecimiento al grupo de Farmacología por formarme en la investigación y siempre estar ahí.

A todos los componentes del grupo “Endotelium Dream Team” del Departamento de Fisiología que me permitieron la ocasión de continuar en lo que más me gusta hacer, investigar.

Al Dr. Salvador Lluch, Catedrático de Fisiología y director de esta tesis, por su gran ayuda en la realización de ésta, y por transmitir conocimiento y energía cada día.

A la Dra. Paloma Lluch, del Servicio de Hepatología del Hospital Clínico y directora de esta tesis, por su interés y ayuda durante este tiempo.

A la Dra. M^a Antonia Noguera, Profesora Titular de Farmacología y directora de esta tesis, por su interés y gran apoyo en toda mi carrera investigadora.

Al Dr. José María Vila, Catedrático de Fisiología, por crear un ambiente tan agradable cada día, por su gran calidad humana.

A la Dra Pilar D’Ocon y Dra. Dolores Ivorra, Profesoras Titulares de Farmacología, por guiarme en mis primeros pasos en el laboratorio. Gracias de verdad.

A la Dra Gloria Segarra, Profesora Contratada de Fisiología, gracias por haber apostado por mi entrada en el laboratorio de Fisiología.

Al Dr. Pascual Medina, Profesor Titular de Fisiología, por haberme escuchado mis ideas en todo momento y por tu gran ayuda científica.

Al Dr. Martín Aldasoro, Profesor de Fisiología, por su ayuda en momentos importantes.

Como no, a mis compañeras... a mi Dra. Mariola por ser una gran compañera y una gran amiga, espero poder compartir más tiempo investigando a tu lado porque es un placer. A mi Belén por ser una persona tan estupenda y tan risueña. Gracias por esas risas...sois las mejores. No quiero olvidarme de otros/as compañeros/as que han sido importantes en algún momento de mi vida tanto profesional como personal como, Marina, Lara, Manolo, Raquel, Yolanda, Reme, Isabel, Ana, Edu, Vane, Laia...espero no olvidarme de nadie.

Al Dr. Carlos Hermenegildo y Dra. Susana Novella por compartir tantos momentos juntos dentro y fuera de la facultad. A la Dra. Inma Noguera por ser más que una compañera, una excelente persona.

A Mamen, del Departamento de Farmacología, por su gran energía positiva y ayudarme en todo momento, y a Eva, del Departamento de Fisiología, por ser tan dulce y siempre ofrecernos su sonrisa.

A mi familia, que aunque seamos pocos, somos un gran núcleo.

A Sabina, gracias por todo, por escucharme siempre y apoyarme en todas mis decisiones. Por ser el más bonito del mundo.

Este trabajo ha sido subvencionado por el
Ministerio de Sanidad, Ministerio de
Educación y Generalitat Valenciana.

ANTECEDENTES	8
1. GENERALIDADES	10
1.1 Aporte sanguíneo al hígado.....	10
1.2 Hipertensión Portal y Cirrosis Hepática	12
2. ALTERACIONES HEMODINÁMICAS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA	14
2.1 Circulación Hiperdinámica.....	14
2.2 Implicación del NO en la HTP y cirrosis hepática	18
2.3 Implicación de los inhibidores de la NOS en la HTP y cirrosis hepática	25
2.4 Implicación de las isoformas DDAHs.....	30
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	36
MATERIAL Y MÉTODOS	40
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	42
1.1 Ratas SHAM-operadas o controles	42
1.2 Ratas con hipertensión portal prehepática (HTP).....	43
1.3 Ratas con cirrosis hepática por ligadura del conducto biliar (BDL).....	44
2. Estudios preliminares para la validación de los modelos experimentales	45
2.1 Parámetros hemodinámicos:.....	45
2.2 Parámetros bioquímicos.....	46
2.3 Estudio histológico	46
3. Estudios Funcionales	47
3.1 Material biológico.	47
3.2 Procedimiento experimental	48
3.3 Tensión pasiva óptima.....	50
3.4 Protocolos experimentales	50
3.5 Fármacos y soluciones.....	54
3.6 Análisis de los resultados de las curvas concentración-respuesta.....	55
4. Estudio de la expresión génica.....	55
4.1 Recogida de muestras	55
4.2 Extracción del ARN total.....	56
4.3 Calidad y cuantificación del ARN	57
4.4 Síntesis del ADN complementario (ADNc).....	58
4.5 Amplificación del ADNc (PCR-RT en tiempo real).....	60
4.6 Análisis de los resultados de expresión génica	65
4.7 Reactivos y soluciones	67
4.8 Tratamiento estadístico de los datos	67

5. Determinación de L-arginina y ADMA por HPLC	68
5.1 Preparación de la muestra	68
5.2 Condiciones del HPLC.....	68
5.3 Reactivos y soluciones	69
5.4 Expresión de resultados	69
RESULTADOS	70
1. Caracterización de los modelos experimentales	72
2. Estudios Funcionales	76
2.1 Respuesta al cloruro potásico (KCl).....	76
2.2 Respuesta a la acetilcolina	80
2.3 Estudio de la liberación inducida de NO.....	86
2.4 Estudio de la liberación basal de NO.....	93
3. Determinación de la expresión génica mediante PCR-RT	102
4. Determinación de los niveles de L-arginina y ADMA en el hígado	108
DISCUSIÓN	110
Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental	112
Justificación de los lechos vasculares elegidos	113
Respuesta contráctil al KCl en la hipertensión portal y en la cirrosis experimental	113
Respuesta relajante a la acetilcolina en la hipertensión portal y en la cirrosis experimental	115
Participación del NO y de las DDAHs en la respuesta relajante inducida por acetilcolina	117
Participación del NO y de las DDAHs en el tono vascular	118
Estudio de la expresión génica y medición de niveles de L-arginina y ADMA hepáticos.	120
CONCLUSIONES	126
BIBLIOGRAFÍA	130

ANTECEDENTES

1. GENERALIDADES

1.1 Aporte sanguíneo al hígado

El aporte sanguíneo que recibe el hígado procede de dos vías: arterial y venosa. La sangre arterial llega a través de la arteria hepática, procedente del tronco celíaco, y la sangre venosa, que deriva del intestino delgado y grueso, estómago, mesenterio, páncreas y bazo, pasa a la vena porta.

La sangre arterial constituye del 25% al 35% del flujo sanguíneo hepático total y aporta el 50% del oxígeno que consume el hígado. El resto es vehiculado por la vena porta, que transporta sangre rica en nutrientes procedentes de la absorción intestinal. El flujo sanguíneo hepático representa aproximadamente el 25% del gasto cardíaco y tiende a mantenerse constante debido a la capacidad de aumentar el flujo arterial cuando disminuye el flujo portal. Esta respuesta adaptativa de la arteria hepática adquiere relevancia en casos de hipertensión portal, ya que una parte considerable del flujo portal proviene de la extensa red de vasos colaterales portosistémicos, cuya llegada al hígado, en estos casos, está impedida.

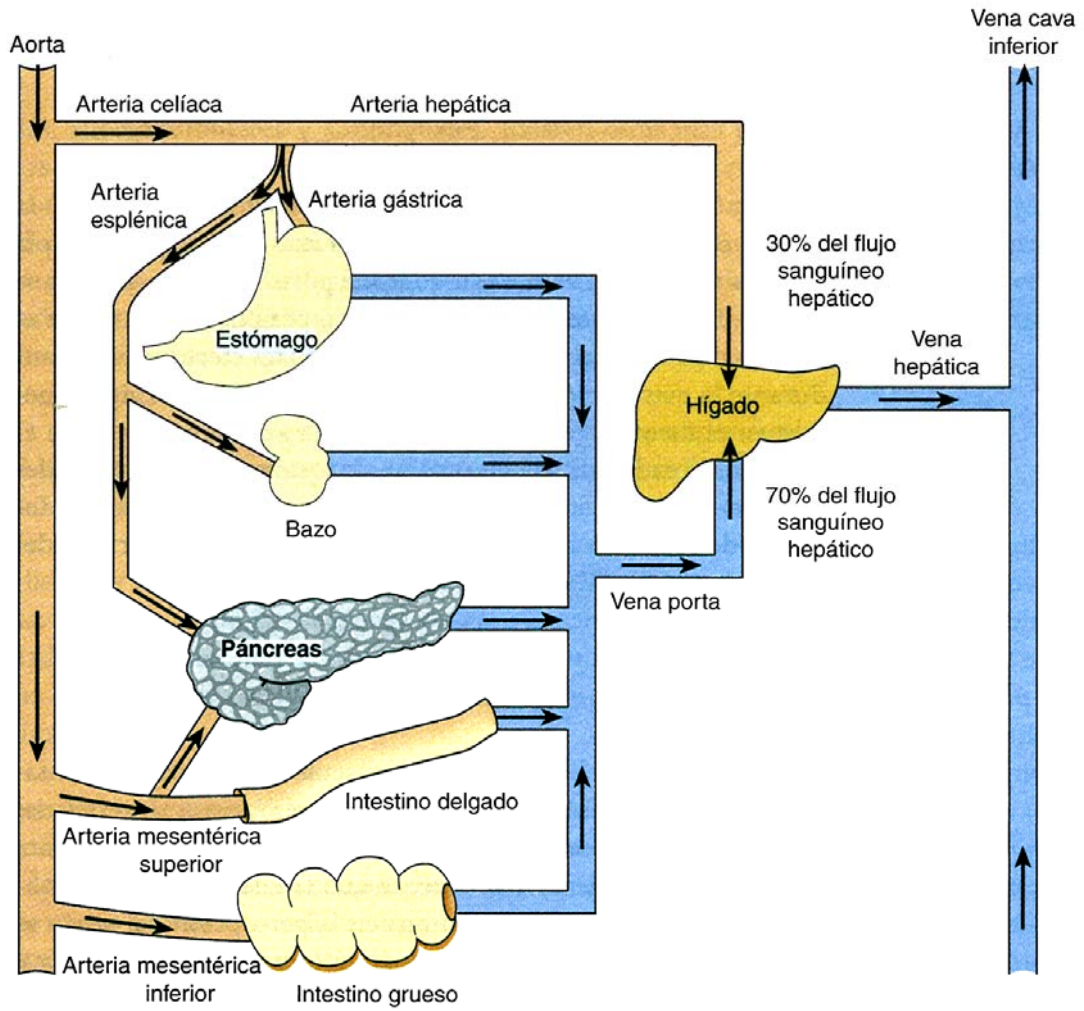


Figura 1. Representación de la irrigación sanguínea del hígado.

1.2 Hipertensión Portal y Cirrosis Hepática

La **hipertensión portal** (HTP) es un incremento de la presión en la vena porta por obstrucción anatómica o funcional del flujo sanguíneo en el sistema venoso portal. Este aumento de presión reduce el paso de sangre a través del hígado y promueve la generación de una nueva circulación colateral por una activa angiogénesis. Esta nueva circulación deriva parte de la sangre portal a la circulación sistémica sin pasar por el hígado. La presión portal puede estar elevada por diversos motivos:

- Incremento del flujo venoso a la vena porta.
- Incremento del flujo de la arteria hepática.
- Incremento de las resistencias intrahepáticas debido, entre otros factores, a un aumento de vasoconstrictores endógenos como endotelina (ET) y angiotensina (AgII) por la activación de las células estrelladas hepáticas^{1, 2} (alteraciones funcionales), o bien debido a anomalías morfológicas (alteraciones estructurales).

La regulación del flujo sanguíneo portal depende de cambios en la presión y resistencia de los vasos en un sistema hidrodinámico determinado por la ley de Ohm. La ley de Ohm establece que $\Delta P = Q \times R$ donde ΔP es la presión intrahepática, Q es el flujo sanguíneo y R son las resistencias periféricas intrahepáticas vasculares.

El incremento de las resistencias puede ser consecuencia de las anomalías en la arquitectura vascular del tejido conectivo, interrumpiendo la organización normal del parénquima del hígado. Esto provoca adaptación del sistema portal como aparición de cortocircuitos (“shunts”) colaterales y esplenomegalia.

La **cirrosis hepática** es una enfermedad crónica del hígado, consistente en la destrucción progresiva del tejido hepático normal y su sustitución por tejido fibroso que conducirá a una insuficiencia hepática e hipertensión portal. Desde el punto de vista anatomopatológico, la cirrosis hepática se caracteriza por la presencia simultánea de tres signos:

- Necrosis hepatocitaria.
- Fibrosis hepática.
- Nódulos de regeneración (macro o micronódulos si son mayores o menores de 3 mm).

Además, en pacientes con insuficiencia hepatocelular, sobre todo si se asocia a HTP, se ha comprobado la presencia de una circulación hiperdinámica y cambios como:

- Aumento de fibrogénesis y procesos inflamatorios.
- Alteraciones estructurales de unión intercelular en el endotelio.
- Anomalías en la regulación del tono vascular intrahepático.
- Aparición de linfoangiogénesis.

La cirrosis que cursa con HTP se asocia con una alteración de la función circulatoria desarrollando una vasodilatación esplácnica que condiciona un efecto de hipovolemia efectiva provocando en primer lugar una retención de sodio y agua a nivel renal seguido de ascitis en la cavidad peritoneal. El deterioro progresivo conduce a un fracaso renal conocido como síndrome hepatorenal con pronóstico grave para el paciente.

2. ALTERACIONES HEMODINÁMICAS EN LA CIRROSIS HEPÁTICA

2.1 Circulación Hiperdinámica

Los cambios morfológicos que se producen en la arquitectura hepática conllevan un aumento de las resistencias vasculares intrahepáticas y la aparición de HTP. Este hecho fue demostrado en pacientes cirróticos³⁻⁶ y en ratas cirróticas.⁷ Como resultado a esta resistencia al paso de sangre a través del hígado en la HTP, se produce el desarrollo de una circulación colateral y shunts portosistémicos^{4, 8} que comunican el sistema portal con el sistémico. Las resistencias vasculares en esta circulación colateral son inferiores a las del hígado cirrótico (no a las de un hígado sano), por lo que ayudan a descomprimir la circulación portal. Sin embargo, estos vasos colaterales comportan importantes complicaciones, entre ellas, el desarrollo de varices gastroesofágicas y hemorragias digestivas. El porcentaje de mortalidad por el sangrado de varices gastroesofágicas en pacientes con cirrosis es elevado.

La vasopresina es un potente vasoconstrictor que ha sido usado para tratar este sangrado⁹ ya que disminuye la velocidad del flujo sanguíneo en vena porta, arteria mesentérica superior, y en varices esofágicas.¹⁰ Este carácter vasoconstrictor en el sistema portal colateral ha sido demostrado en ratas cirróticas con ligadura del conducto biliar (BDL: “bile duct ligation”),¹¹ y en ratas con hipertensión portal debida a una ligadura parcial de la vena porta.¹² Las sustancias más empleadas en clínica son análogos de la vasopresina (ornipresina y terlipresina), de la somatostatina (octeótrido) y agonistas alfa-adrenérgicos (midodrine y noradrenalina), y en algunos estudios se ha asociado el uso de un expansor plasmático como la albúmina para aumentar la eficacia terapéutica.

Además, la existencia de esta circulación colateral provoca que toxinas intestinales escapen del metabolismo hepático y no puedan ser depuradas, pasando a la circulación sistémica y produciendo encefalopatía hepática.^{4, 8}

Sin embargo, estas alteraciones morfológicas no son el único factor que determina la existencia de HTP. El aumento del flujo sanguíneo esplácnico que drena al sistema portal, determinado por la vasodilatación esplácnica y sistémica, es uno de los mecanismos más importantes para el mantenimiento y agravamiento de la HTP en condiciones de aumento de las resistencias al flujo portal.^{4, 8, 13-15}

La vasodilatación del lecho esplácnico es un factor primordial en la disminución de las resistencias vasculares periféricas. No obstante, se ha observado que también pueden contribuir la dilatación vascular arterial central, la cutánea, la cerebral y la muscular.^{8, 13, 16, 17} Kowalski y Abelmann documentaron por primera vez la existencia de la circulación hiperdinámica en pacientes con enfermedad hepática crónica avanzada hace más de 50 años.¹⁸ Este síndrome se caracteriza por la presencia de vasodilatación arterial sistémica con disminución de la presión arterial, aumento del gasto cardiaco (por incremento tanto de la frecuencia cardiaca como del volumen sistólico) y aumento del flujo sanguíneo regional. Desde entonces sigue siendo motivo de estudio la patogenia y las repercusiones clínicas de la vasodilatación arterial crónica existente en los pacientes cirróticos.

Como consecuencia de la vasodilatación esplácnica y sistémica, se produce una disminución del volumen central total, con el consiguiente estímulo de los barorreceptores y receptores de volumen vasculares y la activación del sistema nervioso simpático, el eje renina-angiotensina-aldosterona y la hormona antidiurética. Esta activación neurohumoral produce retención renal de agua y sodio. La retención renal de sodio es la alteración más precoz y común de la función renal en los pacientes cirróticos y es debida a la reabsorción de sodio mediante la acción del eje renina-angiotensina y

estimulación de los adrenoceptores α_1 .¹⁹⁻²¹ La retención renal de agua es más compleja y se produce por un aumento de la secreción de la hormona antidiurética, asociada a una disminución del filtrado glomerular y a una disminución de la síntesis renal de prostaglandinas.²²

Esto comporta una expansión plasmática y un aumento del volumen plasmático^{4, 23, 24} que produce un estado circulatorio hiperdinámico. Tanto la vasodilatación arterial como la expansión del volumen plasmático, son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la circulación hiperdinámica observada en la HTP.

Un hecho que contribuye a la marcada vasodilatación a nivel esplácnico y periférico existente en la cirrosis es la disminución de la reactividad de la vasculatura periférica en respuesta a vasoconstrictores.^{25,26} Tras la infusión de vasoconstrictores como noradrenalina, vasopresina o angiotensina II, se observa en pacientes cirróticos una respuesta vascular disminuida.^{25, 26} La causa de esta hiporreactividad se ha localizado en el endotelio vascular, puesto que se corrige al destruir el mismo.²⁷

El endotelio vascular libera sustancias relajantes inducidas por diversas sustancias como acetilcolina, bradiquinina, sustancia P, ionóforo de calcio A-23187. Entre las sustancias relajantes liberadas se encuentra el NO y prostaciclina y sustancias vasoconstrictoras como tromboxano A₂, formadas éstas últimas por la vía de la ciclooxigenasa (COX). Diversos estudios han puesto de manifiesto la persistencia de relajación a la acetilcolina estando inhibida la formación de prostaciclina y de NO, confirmando la existencia de un tercer factor relajante endotelial.²⁸ Este factor produce hiperpolarización de la membrana de las células del músculo liso por lo que se le ha denominado factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).²⁹⁻³¹ Además, parece que la participación del EDHF en la relajación endotelio-dependiente sea mayor a medida que disminuye el tamaño del vaso,³² mientras que en vasos de

mayor calibre, el principal responsable sería el NO. Es posible que en circunstancias normales el NO y el EDHF actúen sinérgicamente, de forma que cada factor potencie los efectos del otro.³³ Sin embargo, también se ha descrito que la síntesis de NO inhibe la actividad vascular del EDHF, por lo que es posible que en diversas patologías en las que la síntesis de NO esté disminuida, la producción y los efectos del EDHF puedan incrementarse para paliar, en parte, la carencia de NO.³⁴ En estos casos el EDHF contribuiría en mayor medida a mantener la relajación dependiente del endotelio, adquiriendo más importancia en la homeostasia vascular. Se han propuesto diversas sustancias que podrían actuar como EDHF, entre ellas, el ácido epoxieicosatrienoico³⁵⁻³⁷, el peróxido de hidrógeno^{38, 39}, la anandamida⁴⁰, péptido natriurético tipo C⁴¹, y la teoría más aceptada hasta el momento es la que implica a los canales de potasio.⁴²

Se ha demostrado que la menor respuesta contráctil de los vasos mesentéricos que se observa en la cirrosis podría ser debida a un incremento en la síntesis de óxido nítrico (NO) u otros factores relajantes derivados del endotelio como el EDHF.⁴³ Por otro lado, esta hiporreactividad se puede relacionar con un fallo o desensibilización de los receptores de las sustancias vasoconstrictoras,⁴⁴ con una alteración en la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares⁴⁵ o con una menor producción de inositol trifosfato (IP_3).⁴⁶

Las consecuencias clínicas del estado hiperdinámico en la cirrosis hepática no sólo se producen en el territorio hepato-esplácnico, sino que afectan a diversos órganos, cerebro, glándulas suprarrenales, corazón, y cuya importancia clínica aun se desconoce.^{4, 8}

- A nivel pulmonar, como consecuencia de la dilatación de la vascularización pulmonar, se produce una alteración del intercambio gaseoso

que conduce a hipoxemia, en ausencia de enfermedad cardiaca o respiratoria que lo justifique, conocida como síndrome hepatopulmonar.^{47, 48}

- A nivel cerebral, la aparición de vasodilatación podría participar en el desarrollo y mantenimiento de encefalopatía hepática. Existe una estrecha relación entre el flujo sanguíneo cerebral, el edema cerebral y la profundidad del coma.⁴⁹ La vasodilatación cerebral aumentaría la superficie capilar y favorecería la difusión de sustancias tóxicas, contribuyendo al desarrollo de la encefalopatía.⁵⁰ Sin embargo, en situaciones crónicas el cerebro mantiene la capacidad de regular el flujo sanguíneo en relación a sus necesidades metabólicas, siendo éste normal o bajo a pesar de la circulación hiperdinámica sistémica.⁵¹

- A nivel renal, la vasodilatación esplácnica y sistémica produce una disminución del volumen central efectivo y como consecuencia una activación de las sustancias vasoactivas que provocan retención renal de agua y sodio.¹⁹⁻²¹

- A nivel cardiaco se observa que, a pesar de que los pacientes cirróticos tienen un gasto cardiaco elevado en condiciones de reposo o basales, cuando se somete a éstos a un estrés físico o farmacológico responden inadecuadamente. Estas alteraciones cardiacas se conocen con el término de miocardiopatía del paciente cirrótico.⁵²⁻⁵⁴

2.2 Implicación del NO en la HTP y cirrosis hepática

Los mecanismos responsables de los cambios hemodinámicos observados en la cirrosis hepática han sido ampliamente estudiados. Se ha sugerido la intervención de diferentes sustancias vasodilatadoras como responsables de la hiporreactividad vascular. Entre ellas se encuentra el NO, uno de los candidatos principales en la génesis de las alteraciones fisiopatológicas observadas en la HTP y la cirrosis hepática.⁵⁵

El NO es un radical libre altamente reactivo sintetizado a partir de L-arginina, y es un poderoso vasodilatador derivado del endotelio. Juega un

papel importante en la regulación del tono vascular y es un regulador de la fisiología cardiovascular que reduce la contractilidad cardíaca y vascular. Los efectos del NO dependen de su concentración y de su interacción con otros radicales libres y con especies reactivas del oxígeno tales como el anión superóxido para formar peroxinitrito, especie altamente reactiva y mucho más tóxica que el NO. A altas concentraciones el NO puede interactuar con algunos metales de transición, con proteínas que contienen el grupo hemo o grupos tioles.⁵⁶

En la cirrosis hepática coexisten dos eventos fisiopatológicos opuestos: un déficit en la producción de NO en la microcirculación hepática⁵⁷⁻⁶⁰ y una sobreproducción de NO en el territorio vascular esplácnico y sistémico. Este déficit de NO se acompaña de una respuesta vascular disminuida del hígado cirrótico al NO⁶¹⁻⁶³ contribuyendo a un tono intrahepático elevado y por tanto, a un aumento de las resistencias vasculares intrahepáticas.⁵⁸

Estudios experimentales han mostrado el importante papel que juega el NO como regulador del flujo esplácnico y hepático mediante la modulación de las resistencias vasculares en la HTP.^{64, 65} En el modelo experimental de rata con HTP, la inhibición aguda de la producción de NO produce un aumento del tono vascular y suprime la vasodilatación causada por acetilcolina en los vasos colaterales portosistémicos.⁶⁶ Si la inhibición es crónica se produce un aumento de las resistencias esplácnicas y porto-colaterales.⁶⁷

Los posibles mecanismos implicados en la reducción de la respuesta vascular al NO en hígados cirróticos son:

1- **Alteración en la difusión del NO hacia el músculo liso vascular.**^{68, 69}

2- **Aumento en la inactivación del NO por anión superóxido.** Concentraciones excesivas de anión superóxido pueden causar una

disminución en la biodisponibilidad del NO en tejidos vasculares,⁷⁰ incluyendo la circulación intra-hepática en la cirrosis.⁷¹

3- **Fallos a nivel de la cascada de guanosín 3',5'cíclico monofosfato (GMPc).** El NO estimula directamente la guanilato ciclasa soluble, aumentando los niveles de GMPc, con la consiguiente disminución del Ca²⁺ intracelular, provocando vasodilatación (Figura 2).^{56, 72, 73}

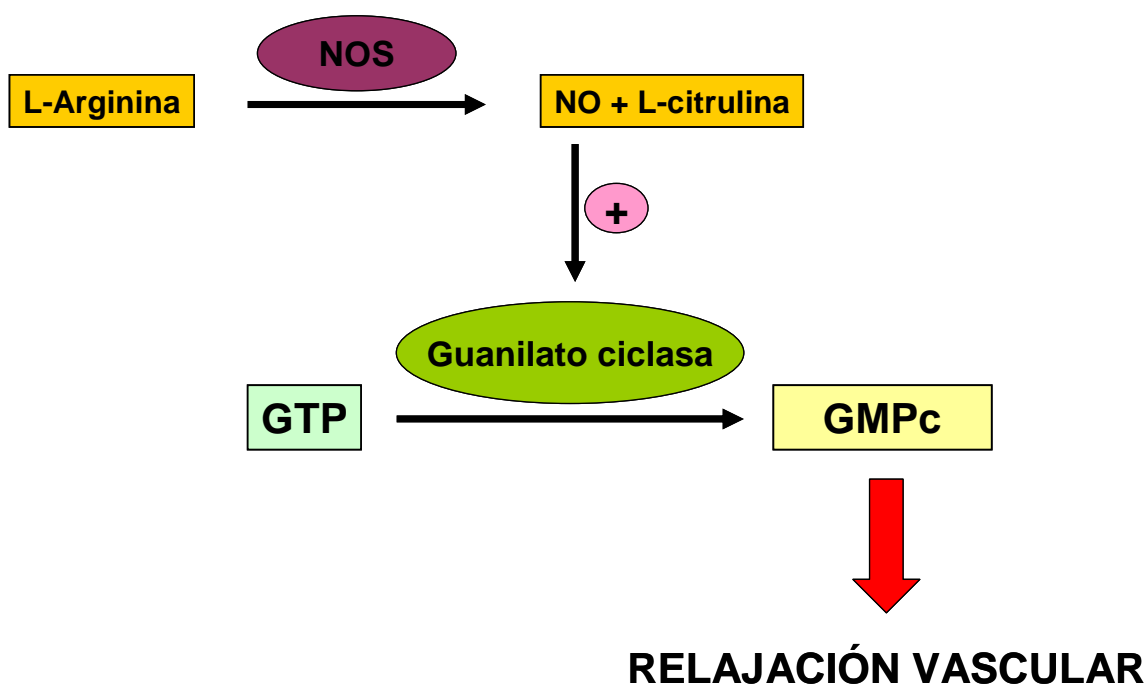


Figura 2. Mecanismo de relajación del músculo liso mediante el sistema óxido nítrico-GMP cíclico. NOS: óxido nítrico sintasa, GTP: guanosín-5-trifosfato.

Loureiro-Silva y colaboradores⁷⁴ observan que la fosfodiesterasa-5 (PDE-5), enzima encargada de degradar el GMPc,^{75, 76} puede ser un modulador en el tono vascular intrahepático, ya que su sobreexpresión está implicada en una reducción de la respuesta vasodilatadora del NO en hígados cirróticos de rata. Por tanto, la utilización de inhibidores de la PDE-5 sería una estrategia terapéutica para reducir el incremento de las resistencias vasculares intrahepáticas en la cirrosis.

El NO es sintetizado a partir de L-arginina gracias a la actuación de una enzima denominada **NO-sintasa (NOS)**. Esta enzima pertenece a la familia de las flavoproteínas y de ella se han descrito dos grupos de sintasas.^{77, 78} La primera es la NOS constitutiva (cNOS) que es la responsable de la síntesis de pequeñas cantidades de NO en condiciones fisiológicas y cuya actividad es regulada por la concentración de Ca^{2+} intracelular. Existen dos variedades de cNOS, productos de genes distintos y de distinta localización pero con características bioquímicas similares (Tabla 1).

1- La NOS neuronal (nNOS o NOS1) se encuentra principalmente en células neuronales pero también puede estar en otros tejidos como aorta, músculo esquelético y endometrio. Es productora del NO que actúa como neurotransmisor.

2- La NOS endotelial (eNOS o NOS3) que se localizó en un primer momento en células endoteliales, pero que puede expresarse en plaquetas y células mesangiales renales. Está implicada en la regulación de la homeostasis vascular, y es posiblemente un importante factor en la regulación de la circulación hiperdinámica de la cirrosis.

En el segundo grupo está la NOS inducible (iNOS o NOS2), que se sintetiza de novo en macrófagos, células de la musculatura lisa vascular, células hepáticas estrelladas y hepatocitos en respuesta al lipopolisacárido, endotoxinas y citoquinas inflamatorias. Sintetiza cantidades masivas de NO durante largos períodos de tiempo independientemente de cualquier estímulo hemodinámico o mecánico.^{56, 77} Su actividad es independiente del Ca^{2+} intracelular (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades de las tres isoformas de la enzima NOS.

Propiedad	NOS1	NOS2	NOS3
Nombre	nNOS	iNOS	eNOS
Tejido preferencial donde se expresa	Neuronal, epitelial	Macrófagos, musculatura lisa	Endotelio
Expresión	Constitutiva	Inducible	Constitutiva/variable
Requerimientos de Ca ²⁺	Si	No	Si
Cromosoma	12	17	7
Tamaño	150-160 kDa	125-135 kDa	133 kDa

La NOS es catalíticamente activa como homodímero y cada dímero coordina un átomo de zinc.⁷⁹ La NOS posee dos grandes módulos protéicos: uno es un módulo reductasa carboxiterminal (también denominado diaforasa) con un dominio reductasa de la coenzima NADPH (donante de electrones), un dominio reductasa de la coenzima flavín-dinucleótido de adenina (FAD), un dominio reductasa de la coenzima flavín mononucleótido (FMN) y un dominio que se une a calmodulina; y el segundo es un módulo oxidasa aminoterminal con un dominio oxigenasa de la coenzima tetrahidrobiopterina (BH₄), un dominio oxigenasa del tipo hemo y el dominio de unión al sustrato L-arginina.⁷⁷

En un principio se pensaba que la vasodilatación que se desarrolla a nivel esplácnico y sistémico en la cirrosis hepática y posterior desarrollo de un estado hiperdinámico, era debida a un aumento de la expresión de iNOS. No obstante, esta hipótesis no ha podido ser demostrada⁸⁰⁻⁸² e incluso la inhibición de iNOS no previene el desarrollo de la circulación hiperdinámica ni la hiporrespuesta vascular en la HTP.^{83, 84}

Hay estudios que sugieren que la principal vía de sobreproducción de NO, causante de esta vasodilatación, proviene de la isoforma eNOS⁵⁵ ya que existe un incremento en la expresión proteica de eNOS,^{80-82, 85, 86} un aumento en la actividad de eNOS^{82, 87} y un aumento de la liberación de NO en respuesta al flujo y al estrés de rozamiento en la arteria mesentérica superior en ratas con HTP.⁸⁸ Esta sobreproducción de NO puede ser explicada como una adaptación crónica del endotelio vascular al aumento del flujo esplácnico en la HTP, comportando una disminución del tono vascular.

Incluso hay autores que observan un aumento en la expresión proteica de nNOS en las arterias mesentéricas de ratas con ligadura parcial de la vena porta, produciendo una vasodilatación no colinérgica, no adrenérgica, independiente del endotelio.⁸⁹

Por el contrario, a nivel hepático, la cirrosis produce disfunción endotelial y un déficit en la producción de NO vía eNOS.⁵⁷⁻⁶⁰ La reducción de esta síntesis puede ser debida a la disminución de la actividad de la eNOS en el hígado cirrótico^{57, 59, 60, 90} y sería responsable, al menos en parte, del aumento de las resistencias intrahepáticas observadas en la cirrosis. Por otra parte, también se ha descrito un aumento de la actividad de la iNOS, como un intento de suplir la carencia de la eNOS. Sin embargo, los niveles de NO no se normalizan quizá por el aumento del estrés oxidativo que lo desvía hacia la producción de peroxinitrito, que causará el daño hepático y la necrosis en los últimos estadios de la cirrosis.⁹⁰

La regulación de la actividad de la eNOS se observa a múltiples niveles. A nivel transcripcional, factores como las hormonas sexuales, factores de crecimiento β_1 , endotelial y fibroblástico, o la presencia de estrés oxidativo,⁹¹ pueden incrementar los niveles de ARNm de la eNOS.⁹²⁻⁹⁵ A nivel postranscripcional, la eNOS también puede sufrir transformaciones como acetilación y fosforilación,⁹⁶⁻⁹⁸ o modular su actividad debido a interacciones

proteína-proteína, que aumentarían la actividad de la eNOS por su unión con proteínas como calmodulina, “Heat shock protein” 90, dinamin-2 o que inhibirían la actividad de la eNOS por su unión con caveolina-1, caveolina-3 y dominios intracelulares de los receptores acoplados a proteína G.

Se ha demostrado en la HTP la existencia de moduladores positivos de la eNOS implicados en el exceso de NO en la circulación esplácnica, como “Heat shock protein” 90⁹⁹ y la proteína quinasa B (Akt)¹⁰⁰ que aumentarían la actividad de la NOS.

A nivel hepático se ha demostrado la existencia de interacciones de la eNOS con caveolina-1,^{58, 101-103} proteína estimulada por receptores de colesterol. Esta interacción provoca una disminución de la actividad de la eNOS y de la producción de NO. Existen autores que observan que el ARNm de la eNOS se encuentra sobreexpresado para intentar suplir la carencia de NO,⁹⁰ mientras que otros atribuyen esta sobreexpresión al “shear stress” o fuerza de rozamiento que ejerce el flujo sanguíneo cuando pasa a través del vaso durante la hipertensión portal.¹⁰⁴

También la isoforma nNOS puede tener una función de regulación en la circulación sanguínea hepática y en actividades hepatobiliares ya que se expresa constitutivamente en el hígado.^{90, 105} A pesar de ser constitutiva se ha observado que en animales cirróticos la nNOS puede inducirse en los hepatocitos y su actividad incrementarse pero a un nivel mucho menor que la eNOS.⁹⁰

2.3 Implicación de los inhibidores de la NOS en la HTP y cirrosis hepática

La síntesis enzimática de NO puede ser inhibida de forma selectiva por análogos estructurales de la L-arginina, tales como N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N^G-N^G-dimetil-L-arginina asimétrica (ADMA), N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG), N^G-iminoetil-L-ornitina (L-NIO).

La administración de estos inhibidores produce vasoconstricción y aumenta la presión arterial en animales y en el hombre, y este efecto desaparece con la administración de L-arginina.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹

ADMA es un compuesto guanidino estable (Figura 3),^{106, 107} el cual es sintetizado endógenamente y actúa como un inhibidor competitivo de la NOS.¹¹⁰ Mientras que su esteroisómero simétrico de la dimetilarginina (SDMA) no inhibe la NOS sino que interfiere con la síntesis del NO por competir con la L-arginina en el transporte a través de las membranas celulares vía transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT sistema y⁺). El transporte CAT juega también un papel importante en el tráfico de ADMA entre células y órganos.^{111, 112} Se han observado alteraciones en la expresión de este transporte en condiciones fisiopatológicas como enfermedad cardíaca congestiva, insuficiencia renal aguda y crónica y en shock séptico.¹¹³⁻¹¹⁵ Estos cambios de expresión pueden dar lugar a fallos en el transporte intercelular y entre órganos de arginina, ADMA y SDMA.

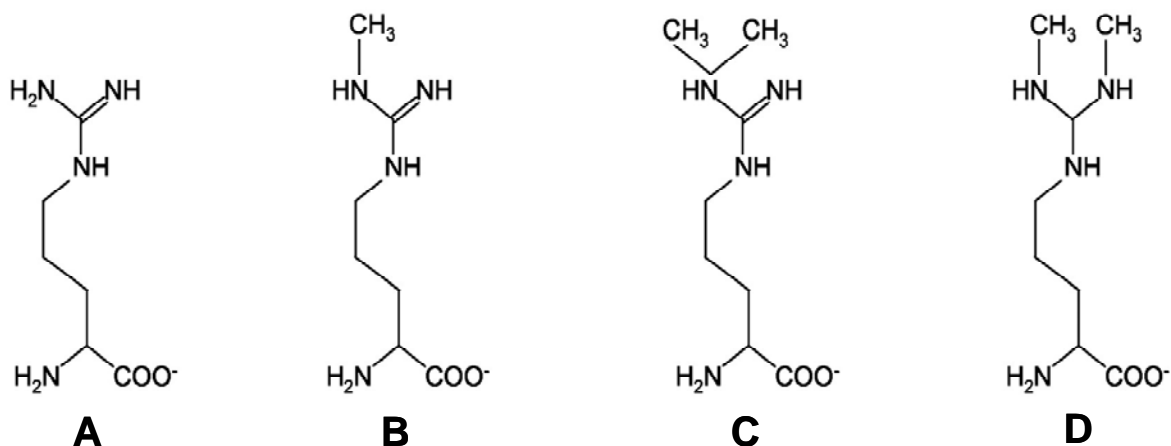


Figura 3. Estructuras químicas de la L-arginina (A) y sus derivados endógenos metilados. N^G-monometil-L-arginina; L-NMMA (B), N^G,N^G-dimetil-L-arginina asimétrica; ADMA (C), y N^G,N^G-dimetil-L-arginina simétrica; SDMA (D).

ADMA es sintetizado durante la metilación de los residuos de L-arginina de las proteínas por las proteína-arginina N-metiltransferasas (PRMTs), y es liberado al citoplasma durante la proteólisis. Existen dos tipos de PRMTs, las PRMTs tipo 1 catalizan la formación de L-NMMA y ADMA mientras que las PRMTs tipo 2 forman L-NMMA y SDMA.

ADMA se elimina por excreción renal o es metabolizado en el hígado¹¹⁶ y en otros tejidos, por la enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) a citrulina y dimetilamina, o puede tener varios destinos secundarios como participar en reacciones de transaminación en el riñón o de acetilación en el hígado (Figura 4). Mientras que SDMA se elimina por el riñón mayoritariamente y no es degradado por la DDAH. Recientemente, también se ha demostrado una mínima metabolización hepática del SDMA.¹¹⁷

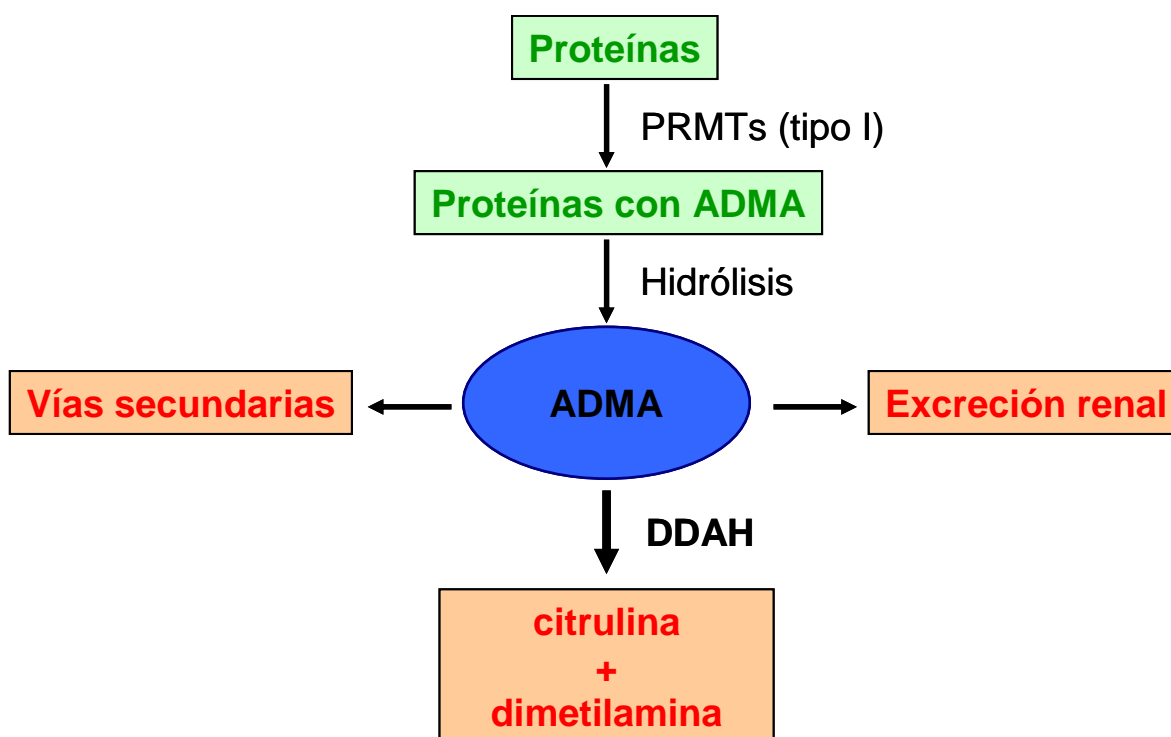


Figura 4. Esquema de formación del ADMA y su catabolismo.

En 1992 Vallance y colaboradores¹¹⁰ describieron por primera vez al ADMA como una toxina urémica en pacientes con insuficiencia renal, y a partir de entonces se ha demostrado que los niveles plasmáticos de ADMA y SDMA están elevados en enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis,^{118, 119} hipertensión,^{120, 121} hiperlipemia,^{122, 123} diabetes mellitus,¹²⁴⁻¹²⁶ hemorragia cerebral (o embolia)¹²⁷ o preeclampsia¹²⁸ (Tabla 2).

Los niveles plasmáticos de ADMA detectados se encuentran en un rango de 0,5-1 $\mu\text{mol/l}$ (10 veces mayores que las encontradas para L-NMMA). El método más utilizado para su medición es el de la cromatografía de alta resolución (HPLC) que permite la separación y cuantificación de ADMA, SDMA y L-arginina de una misma muestra.

Estudios experimentales muestran que el ADMA inhibe la producción de NO *in vitro* a concentraciones comparables a las concentraciones

plasmáticas detectadas en pacientes con enfermedades cardiovasculares o metabólicas.^{109, 129, 130} Además, los niveles elevados de ADMA se correlacionan positivamente con marcadores de aterosclerosis, tales como el engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida,¹¹⁸ y tiene un valor predictivo para problemas cardiovasculares.

Se ha demostrado que antagonistas de los receptores de la angiotensina AT₁, vitamina E, y estrógenos usados como terapia sustitutiva hormonal reducen las concentraciones plasmáticas de ADMA, produciendo un efecto beneficioso para la síntesis de NO y la función endotelial. Sin embargo, en algunos casos donde hay un exceso de NO, tales como shock séptico o enfermedad neuronal por excitotóxicos, el ADMA puede ayudar a proteger el efecto tóxico que se origina debido a la presencia de altas concentraciones de NO.¹³¹ En resumen, el sistema ADMA-NOS-NO está bajo un complejo equilibrio en el cual un exceso de ADMA, por un lado, o de NO, por el otro, sería perjudicial para el organismo, ya que el sistema se desajusta.

Tabla 2. Enfermedades asociadas con niveles elevados de ADMA. Número de veces que se encuentran los niveles plasmáticos de ADMA aumentados cuando se comparan a los enfermos de diversas patologías con sujetos sanos.

Enfermedad	x-veces incrementados	Referencia
Insuficiencia renal crónica	2-7 veces	110, 132, 133
Hipertensión	2 veces	134
Preeclamsia	2-3 veces	135-137
Hipertensión pulmonar	2,5 veces	138
Insuficiencia coronaria	2 veces	139, 140
Accidente cerebro vascular	2 veces	127
Hipercolesterolemia	2 veces	123
Hiperhomocistinemia	2 veces	141
Insuficiencia cardiaca congestiva	2-3 veces	142
Hipertiroidismo	2 veces	143
Cirrosis	2 veces	144, 145
Diabetes mellitus tipo 2	1,3 veces	124

2.4 Implicación de las isoformas DDAHs

La enzima DDAH degrada el ADMA hasta la formación de citrulina y dimetilamina (Figura 5).¹⁴⁶ El ácido S-2-amino-4(3-metilguanidino) butanoico (4124W) es un inhibidor selectivo de la DDAH que provoca el acúmulo de ADMA dando lugar a una vasoconstricción.¹⁴⁷ En modelos animales se ha podido inducir la sobreexpresión de DDAH produciendo una reducción de los niveles de ADMA e incrementando la síntesis de NO.¹⁴⁸ Estos experimentos ponen de manifiesto que las DDAHs juegan un papel en el control de la síntesis de NO y del tono vascular.

La DDAH puede ser inhibida por especies reactivas del oxígeno, cationes divalentes como el zinc, que forma parte de su estructura,^{146, 149} homocisteína¹⁵⁰ o LDL oxidada¹⁵¹ (Figura 5). La LDL oxidada además posee otros efectos sobre el sistema endotelio-NO, inhibe el transporte de arginina desde el plasma sanguíneo al endotelio vascular, inhibe directamente la eNOS, aumenta los niveles de ADMA, disminuye la concentración del coenzima reducido BH₄, y aumenta la concentración de colesterol intraendotelial que favorece la síntesis de caveolina-1, que se une a la eNOS formando un complejo inactivo.¹⁰¹⁻¹⁰³

La actividad de la DDAH es elevada en riñón, hígado, páncreas y cerebro de rata, y se correlaciona con una alta expresión de esta proteína en dichos tejidos usando un anticuerpo monoclonal.¹⁵² Sin embargo, Leiper y colaboradores¹⁵³ en 1999 observaron que no coincidían en todos los casos la actividad de la DDAH con la expresión proteica de la DDAH y surgieron la existencia de otra isoforma, la DDAH-2. La DDAH-2 se expresa con niveles altos en todos los tejidos fetales¹⁵⁴ desarrollando un papel importante en la diferenciación celular, en el control del ciclo celular y en procesos en los cuales el NO está implicado.¹⁵⁵ La isoforma DDAH-1 parece tener también un papel importante en el desarrollo.¹⁵⁶ Un hecho a resaltar es que ambas

isoformas se conservan a través de la evolución y por ello deben tener un papel biológico esencial.^{79, 154}

Las dos isoformas se distribuyen de manera distinta en los distintos órganos y tejidos. DDAH-1 predomina en tejidos que expresan nNOS, mientras que DDAH-2 se encuentra en tejidos que expresan eNOS. La actividad de DDAH-1 y DDAH-2 es similar¹⁵³ y la localización celular de estas dos isoformas parece estar predominantemente a nivel citosólico, sin asociación específica con orgánulos ni a la membrana plasmática.^{157, 158}

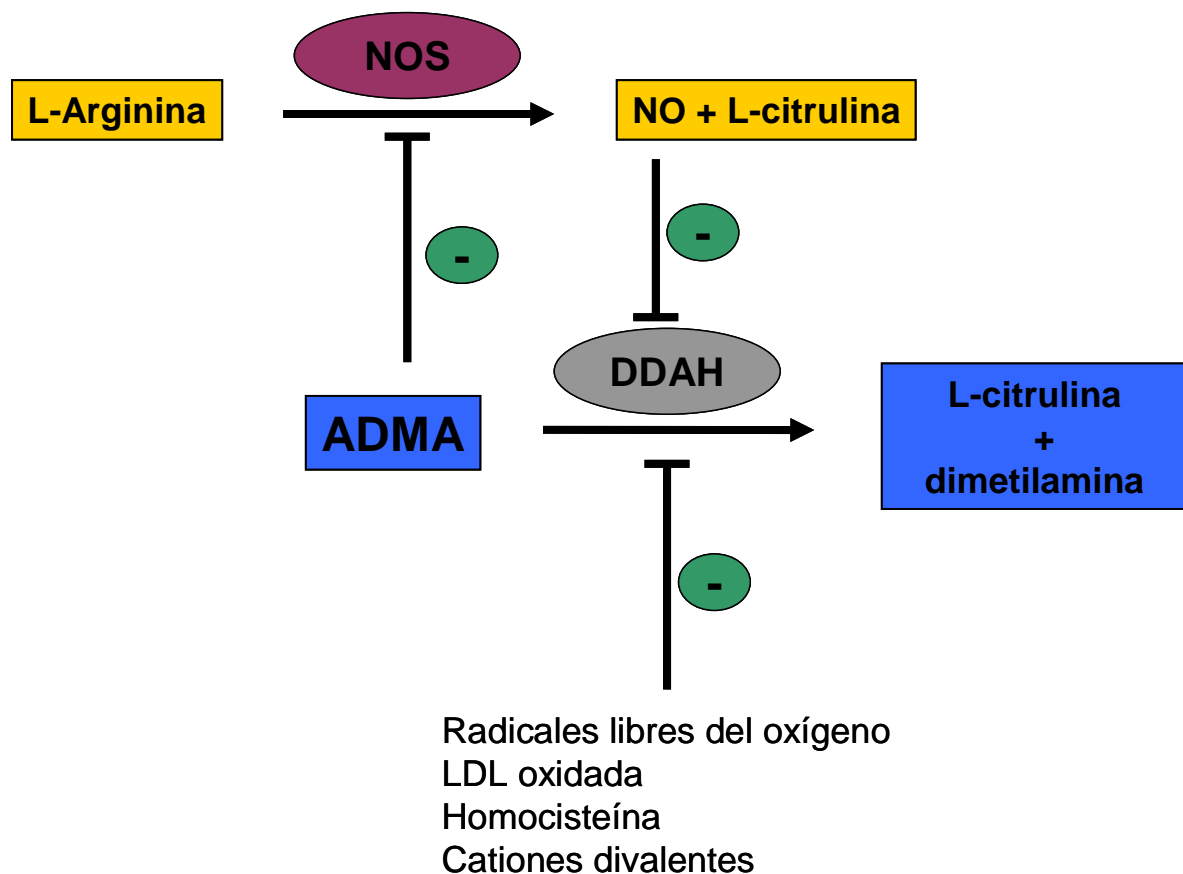


Figura 5. Esquema del sistema NOS-ADMA-DDAH.

HIPÓTESIS

El sistema DDAH-ADMA-NOS podría tener un papel fundamental en la patogénesis de las alteraciones vasculares que aparecen en la hipertensión portal asociada o no a una cirrosis. Los pacientes con insuficiencia hepática muestran un incremento de los niveles plasmáticos de ADMA, inhibidor endógeno de la NOS.^{144, 145} En diferentes situaciones fisiopatológicas el ADMA es un factor de riesgo de aparición de complicaciones cardiovasculares debido a su interacción con el sistema endotelio-NO, de igual modo podría contribuir en la hipertensión portal y cirrosis.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

1. La disfunción del endotelio y del músculo liso vascular pueden constituir los elementos básicos responsables de la respuesta vascular anormal en la hipertensión portal y cirrosis.
2. Los niveles plasmáticos de ADMA elevados en la cirrosis, parecen indicar una alteración en la expresión y/o la actividad de las DDAHs, enzimas responsables de la degradación de ADMA. Puesto que no todos los órganos y lechos vasculares contribuyen de igual medida en la degradación del ADMA, podrían encontrarse diferencias en la expresión de las DDAHs en hígado y arterias mesentéricas e ilíacas utilizadas en nuestro estudio.
3. El déficit de NO intrahepático e incremento de las resistencias que se observa en la cirrosis podría ser debido, al menos en parte, a concentraciones altas de ADMA en el hígado.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto es estudiar el papel de la dimetilarginina asimétrica (ADMA) en las alteraciones vasculares que aparecen en los modelos de hipertensión portal y cirrosis.

Objetivos concretos:

1. Estudiar en segmentos de arteria ilíaca y mesentérica la reactividad vascular al cloruro potásico y los efectos vasculares del ADMA sobre la:
 - Liberación basal de óxido nítrico
 - Liberación inducida de óxido nítrico
 - Comparar los efectos del ADMA con los del L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa no degradado por las DDAHs
2. Estudiar la expresión de la eNOS y las DDAHs, enzimas encargadas del metabolismo del ADMA en hígado, arteria ilíaca y mesentérica, y las posibles alteraciones producidas por la hipertensión portal y cirrosis.
3. Determinar los niveles hepáticos de ADMA, L-arginina y el cociente L-arginina/ADMA como un índice de la capacidad de síntesis de NO en hígados de los tres grupos experimentales.

El desarrollo de estos objetivos brinda la oportunidad de conocer algunos de los mecanismos básicos en el metabolismo del ADMA, un inhibidor endógeno de la enzima óxido nítrico sintasa, que podrían intervenir en las alteraciones vasculares observadas en la hipertensión portal y compararlas con las de la cirrosis hepática.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de la parte experimental de la presente tesis doctoral se utilizaron ratas adultas macho Sprague Dawley de peso comprendido entre 250-350 g.

El protocolo de anestesia utilizado es el mismo para cualquier grupo de estudio. La inducción a la anestesia de los animales se realizó por vía inhalatoria utilizando la cámara de inducción para roedores. El mantenimiento de la misma se realizó con un circuito anestésico conectado al animal por medio de una mascarilla, utilizando un anestésico volátil tipo halogenado isoflurano (Isoflo^R). La monitorización de la anestesia se basa en la comprobación de ausencia o presencia de la respuesta refleja. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las normas éticas establecidas por la Comunidad Europea (REAL DECRETO 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, BOE núm 252 de 21 de octubre 2005).

Las ratas se dividieron en distintos grupos: ratas Sham-operadas o controles, ratas con hipertensión portal prehepática (HTP) y ratas con cirrosis hepática por ligadura del conducto biliar (BDL).

1.1 Ratas SHAM-operadas o controles

El acceso quirúrgico se consigue mediante laparotomía media. La rata anestesiada se colocó en decúbito supino; se rasuró el abdomen y se aplicó una solución antiséptica. Utilizamos analgesia preventiva con buprenorfina a dosis de 0,01-0,1 mg/kg. A continuación, se realizó el corte medio desde un punto situado a 1-2 cm del apéndice xifoides del esternón hasta otro situado a unos 2 cm de la región inguinal. Se realizó un corte en la piel mediante bisturí y por disección roma visualizamos bajo la piel la línea alba que cortamos con tijeras. El peritoneo se cortó al mismo tiempo. Tras la laparotomía, se expuso

el hilio hepático desplazando el duodeno y el paquete gastrointestinal que se protegió con una gasa húmeda con suero salino fisiológico. Se identificó y disecó la vena porta y el conducto biliar.

Transcurridos 5 minutos la herida se cerró mediante sutura interrumpida del peritoneo y pared muscular con sutura reabsorbible de 4/0. Después se suturó la piel, con puntos sueltos con sutura no reabsorbible, como la seda 3/0, siendo retirados éstos a los 7-10 días. Finalmente se aplicó una solución antiséptica.

Una vez finalizada la intervención, se administró aporte extra de oxígeno hasta que la frecuencia respiratoria volvió a la normalidad. Durante la intervención y hasta su completa recuperación el animal se mantuvo sobre una manta térmica para contrarrestar la hipotermia producida por la anestesia.

1.2 Ratas con hipertensión portal prehepática (HTP)

El modelo experimental más extendido para el estudio de la hipertensión portal es la ligadura-estenosis de la vena porta que produce una hipertensión portal prehepática según el procedimiento descrito por Chojkier y Groszmann.¹⁵⁹ Tras la laparotomía, se expuso el hilio hepático desplazando el duodeno y el paquete gastrointestinal que se protegió con una gasa húmeda con suero salino fisiológico. Se identificó y disecó la vena porta y se pasaron dos hilos de sutura no reabsorbible (3/0) por debajo de la vena porta. Se colocó un fiador (20G) de un calibre de 1,2 mm junto a la vena porta y los hilos se anudaron sobre el fiador (Figura 6). Tras retirar el fiador la ligadura mantuvo una estenosis de calibre conocido y una vez realizada la estenosis se reintegraron las asas intestinales y se procedió a cerrar la herida y recuperar al animal de la anestesia de igual forma a la descrita para las ratas del grupo SHAM.

Con este método se desarrolla la HTP pre-hepática muy rápidamente. Los estudios fueron realizados 14 días después de la intervención.

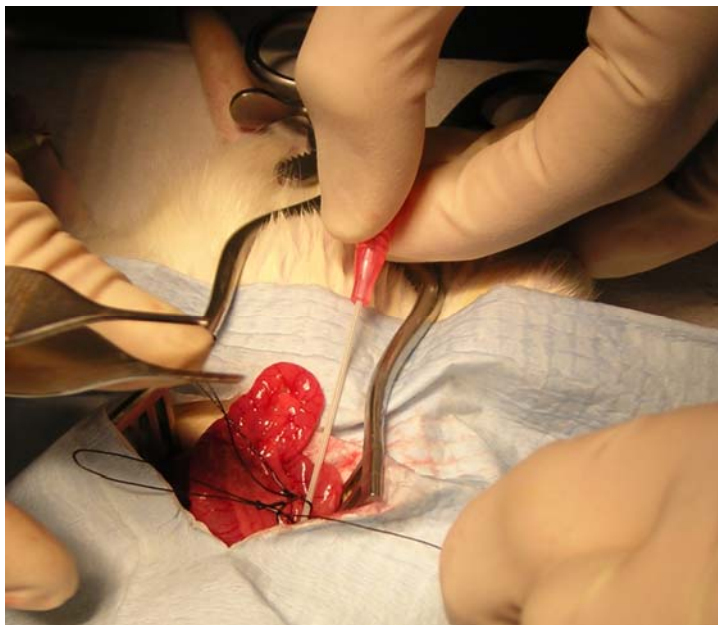


Figura 6. La fotografía muestra la realización de la estenosis de la vena porta. Una aguja 20G se coloca junto a la vena porta, se colocan dos trozos de hilo de seda que envuelven la vena y la aguja, posteriormente se anudan los hilos y se retira la aguja. Los hilos provocan una estenosis del diámetro de la aguja.

1.3 Ratas con cirrosis hepática por ligadura del conducto biliar (BDL)

Este es un modelo de cirrosis biliar secundaria desarrollado en ratas,¹⁶⁰ que provoca cirrosis de forma eficaz debido a la falta de vesícula biliar en la rata. Tras la laparotomía se identificó y se disecó el conducto biliar y se pasaron dos hilos de sutura no reabsorbible (3/0) por debajo y se anudaron. Posteriormente, se seccionó el conducto biliar entre las ligaduras. La ligadura y sección del conducto biliar produce cirrosis entre las 2-4 semanas, que se asocia con el desarrollo de hipertensión portal intrahepática. Transcurridas 4 semanas desde que se efectuó la intervención los animales fueron sacrificados para realizar el estudio. Este modelo tiene un alto índice de mortalidad a la quinta semana (20%), y suelen desarrollar ascitis (60%), pseudovesícula biliar (Figura 7), fibrosis, hipertensión portal y circulación hiperdinámica.

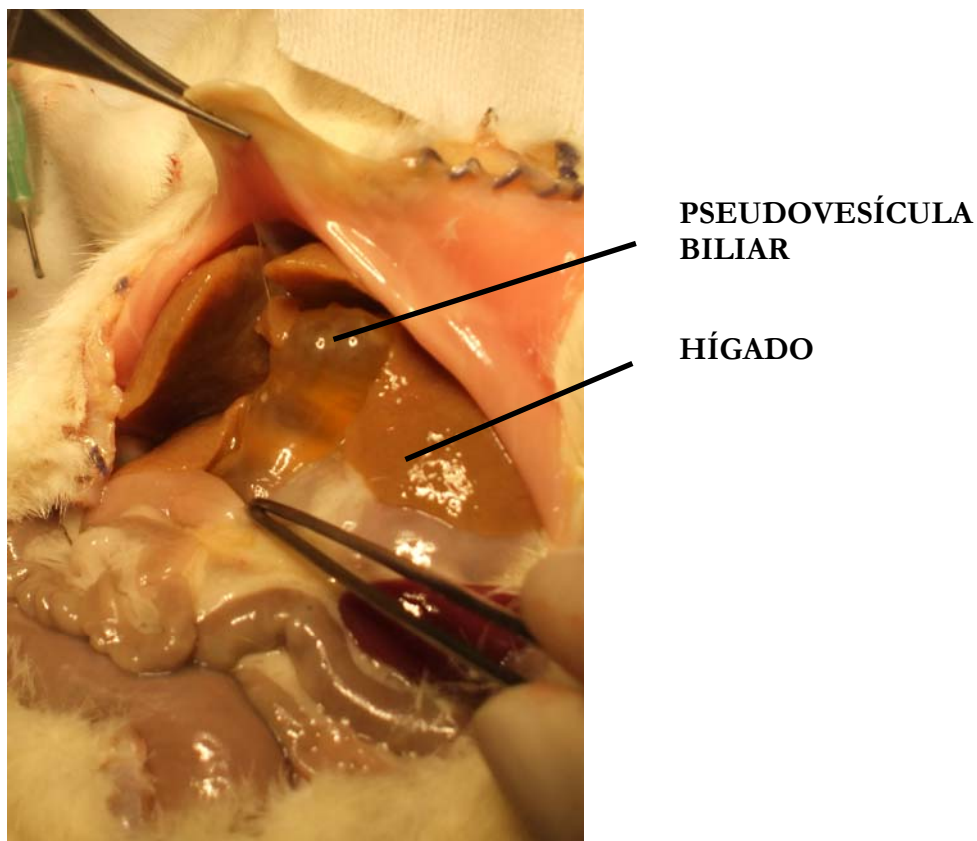


Figura 7. La fotografía muestra la aparición de la pseudovesícula biliar formada por la obstrucción del conducto biliar en ratas del grupo BDL. También se puede observar el hígado de color amarillento a causa del acúmulo de bilirrubina.

2. Estudios preliminares para la validación de los modelos experimentales

2.1 Parámetros hemodinámicos: *Presión arterial media* y *presión portal*

La presión arterial media (PAM) se midió canulando la arteria carótida, mientras que la presión portal (PP) se obtuvo canulando la vena mesentérica superior (Figura 8) con un catéter de polipropileno acoplado a un transductor de presión (*Statham, P23 ID*). Los valores de presión se recogieron en un polígrafo (*Beckman R 611*).

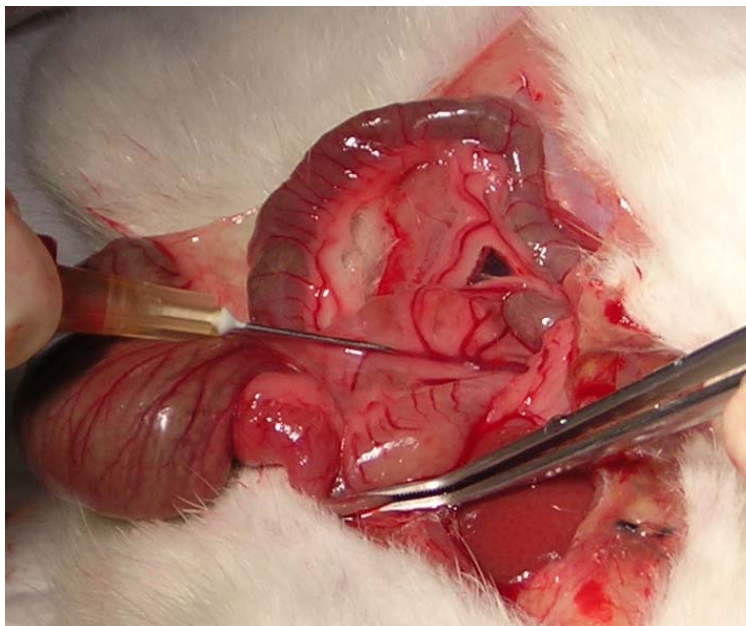


Figura 8. La fotografía muestra la introducción de un catéter en la vena mesentérica superior para el registro de la presión portal.

2.2 Parámetros bioquímicos

La toma de sangre de los animales de experimentación se realizó en tubos que contenían EDTA como anticoagulante y posteriormente la sangre se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min a 4°C. El plasma obtenido se usó para la determinación de algunos parámetros bioquímicos como bilirrubina, colesterol total, creatinina, triglicéridos, fosfolípidos y sodio. El método usado se basa en reacciones enzimáticas-colorimétricas mediante la utilización de kits comerciales (Spinreact, Barcelona, España) en todos los casos.

2.3 Estudio histológico

Se tomaron muestras de hígado de los tres grupos de estudio e inmediatamente se fijaron en una solución de formalina 10%. Posteriormente se deshidrataron e impregnaron en parafina sólida y con la ayuda de un micrótopo se cortaron en secciones de 5-6 μm de grosor. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y con la ayuda de un microscopio óptico se determinaron las alteraciones hepáticas producidas por la hipertensión portal y la cirrosis.

3. Estudios Funcionales

3.1 Material biológico.

Arteria ilíaca y arteria mesentérica de resistencia

En los experimentos funcionales se utilizaron segmentos de arteria ilíaca y de arteria mesentérica de 3^{er} orden (Figura 9).

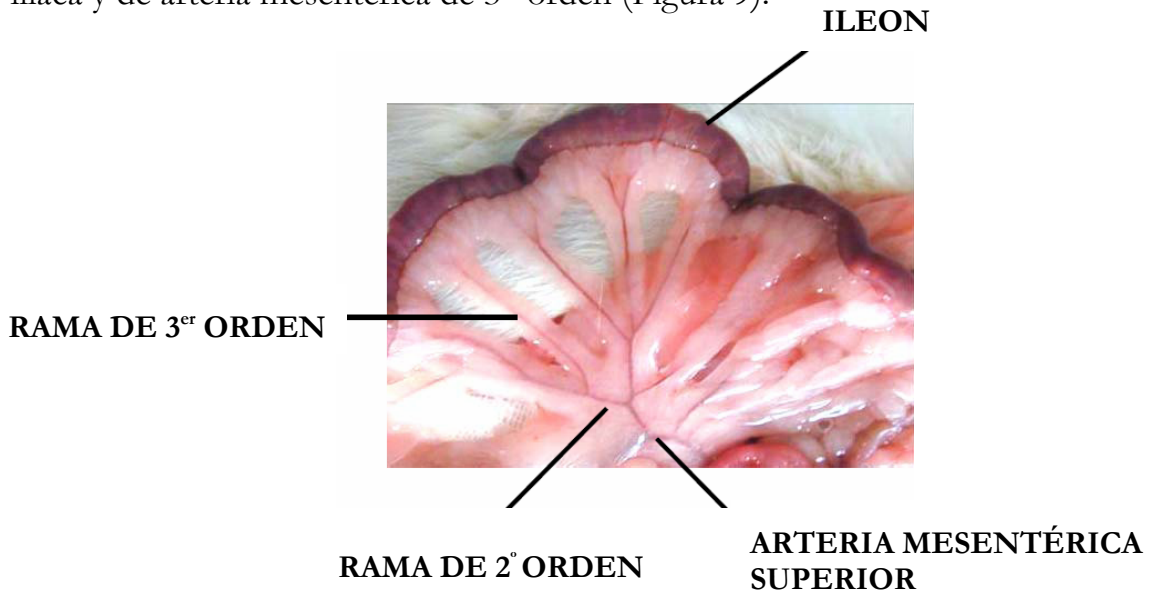


Figura 9. Fotografía de la anatomía del lecho mesentérico.

Aislamiento de los diferentes lechos vasculares

Todos los vasos objeto de estudio fueron aislados y extraídos rápidamente una vez el animal es sacrificado, tal como se expone a continuación:

Arteria ilíaca: separando el tejido epitelial se accedió a la vasculatura ileocecal. Con sumo cuidado se separó la arteria ilíaca de la vena a la cual va íntimamente ligada.

Arteria mesentérica: se localizaron los intestinos y se colocaron de forma que pueda visualizarse el tejido adiposo y conectivo que se encuentra adherido a la vasculatura esplácnica. La separación de dichas adherencias permitió visualizar la arteria mesentérica superior. Ramas de 2º y 3^{er} orden de

la arteria mesentérica se aislaron del resto de arterias del lecho mesentérico (Figura 9), y se separaron de las venas que las acompañan.

La limpieza de los segmentos de arteria íliaca y mesentérica se realizó cuidadosamente en una placa de Petri con suero salino (NaCl 0,9%) preparado con agua estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), bajo una lupa de disección (Wild M3C, Leica) iluminada con luz fría.

3.2 Procedimiento experimental

Los segmentos de la arteria íliaca se cortaron en anillos de 3-4 mm de longitud y se montaron en un sistema para el registro de la tensión isométrica (Figura 10). La preparación experimental consistió en introducir dos alambres rígidos (150 μm de diámetro) de acero inoxidable a través de la luz del anillo vascular. Uno de los alambres está unido a un soporte que a su vez se fijó a la pared del baño de órganos; el otro alambre, que es móvil y se desplaza paralelamente al anterior, se conectó a un transductor de fuerza (FT03 Grass Instruments). Cada segmento vascular, con los alambres introducidos en su luz, se colocó en un baño de órganos que contiene 5 ml de solución fisiológica Krebs-Henseleit modificada compuesta por (en mM): NaCl 115; KCl 4,6; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,2; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25; glucosa 11,1 y EDTA disódico 0,01.

Esta solución se equilibró con una mezcla gaseosa (95% O_2 y 5% CO_2) que proporciona un pH de 7,3-7,4. La temperatura de la solución se mantuvo a 37 °C durante todo el experimento. Un tornillo micrométrico unido al transductor de fuerza permitió aplicar al anillo vascular la fuerza de distensión pasiva adecuada separando los alambres. Los cambios de tensión isométrica se registraron en un ordenador Macintosh utilizando el programa informático Chart v3.4/s y un sistema de adquisición de datos MacLab/8e (AD Instruments).

Para los experimentos realizados en ramas de 3^{er} orden arteria mesentérica (125-175 μm de diámetro) se utilizó un miógrafo isométrico

(Multi Myograph System - 610M, Danish Myo Technology) acoplado a un sistema de adquisición de datos MacLab/8e (ADInstruments) que con la ayuda del Chart v3.4/s registraba los cambios de tensión en ordenador MacIntosh. El desarrollo de este miógrafo marcó el inicio del estudio *in vitro* de los vasos de resistencia.¹⁶¹ Una vez aislada la rama de arteria mesentérica se cortó en segmentos de 2 mm de longitud. Con la ayuda de las dos plataformas metálicas incluídas en en miografo se introdujo dos alambres de tungsteno (40 μm de diámetro) por la luz del segmento, uno de los alambres se fijó a un soporte acoplado móvil acoplado a un tornillo micrométrico que permite modificar el grado de estiramiento del vaso y el otro alambre se fijó a otro soporte acoplado a un transductor de tensión isométrica que registra los cambios de tensión producidos.

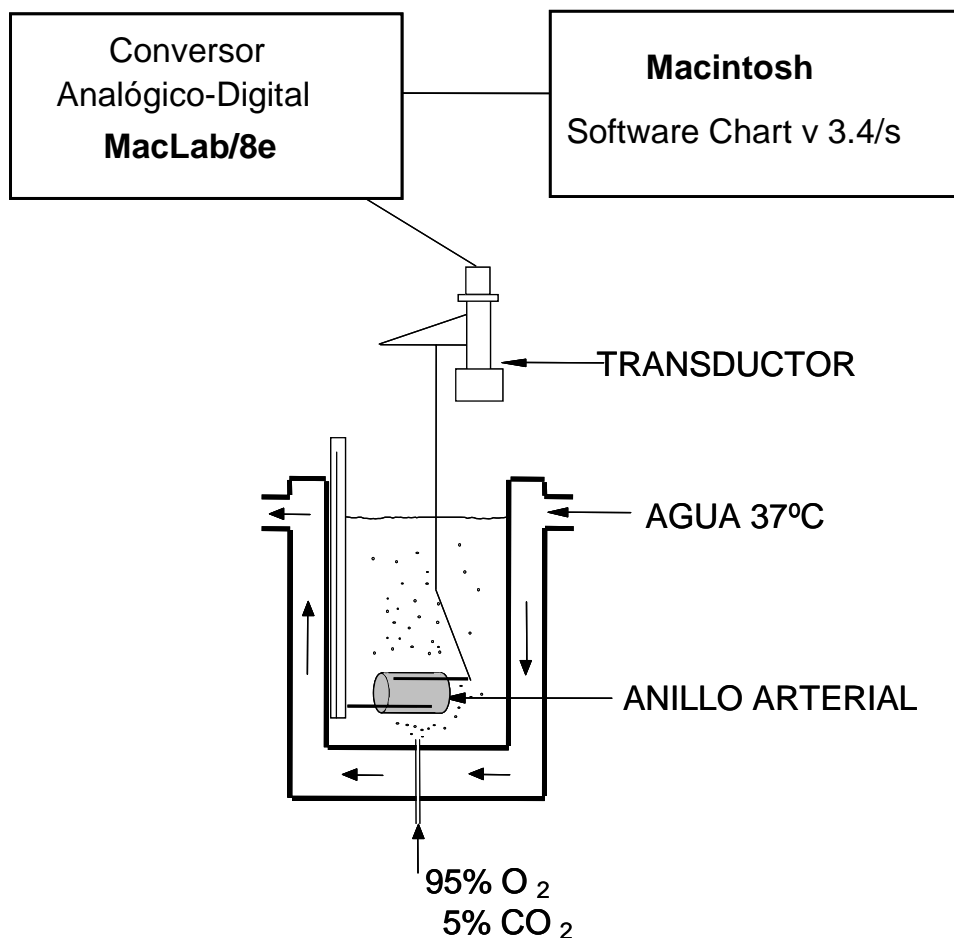


Figura 10. Esquema del baño de órganos y preparación experimental utilizada para el registro de la tensión isométrica en segmentos de arteria ilíaca.

3.3 Tensión pasiva óptima

Antes de analizar la respuesta de los anillos arteriales a los diversos estímulos, se procedió a determinar la tensión basal óptima, que debe aplicarse a las arterias, en un grupo de experimentos preliminares con anillos de longitud y diámetro semejantes a los experimentales. Para ello se registró la contracción inducida por el cloruro potásico (KCl, 100 mM) después de exponer los anillos arteriales a diversas tensiones pasivas (0,5, 0,75, 1 y 2 g). La tensión pasiva a la que se obtuvo la mayor respuesta contráctil al KCl se consideró como la tensión óptima de reposo. La tensión pasiva óptima para los segmentos de arteria ilíaca fue de 1 g y para la arteria mesentérica fue 750 mg.

3.4 Protocolos experimentales

3.4.1 Viabilidad del endotelio

Para comprobar la viabilidad del endotelio, se contrajeron las arterias con serotonina (5-HT, 3×10^{-7} M) o noradrenalina (NA, 3×10^{-7} M), y se realizó una curva concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} M- 10^{-6} M). Una relajación máxima mayor del 70% indicaría una buena función endotelial y confirmaría la integridad del endotelio.¹⁶²

Para de poner de manifiesto las respuestas dependientes del endotelio, en un grupo de experimentos se estudió la respuesta en ausencia de endotelio. La destrucción del endotelio se realizó de forma mecánica. En el caso de la arteria ilíaca, se introdujo un alambre rugoso de acero inoxidable por la luz del vaso y con la ayuda de unas pinzas se desplazó el segmento vascular longitudinal y transversalmente. La destrucción del endotelio de las ramas de tercer orden la arteria mesentérica se realizó introduciendo un pelo humano por la luz vascular y con la ayuda de unas pinzas desplazando el segmento longitudinal y transversalmente. La ausencia de respuesta relajante a la acetilcolina confirmaría la destrucción del endotelio.

3.4.2 Curvas concentración-respuesta

Respuesta al KCl

Se realizaron experimentos para comprobar la capacidad contráctil del músculo liso vascular. Para ello se añadieron concentraciones acumulativas crecientes de KCl (5-100 mM) en segmentos de arteria ilíaca y mesentérica. Cada vez que una concentración alcanza su efecto máximo se añade la siguiente hasta llegar a la concentración que produce la respuesta contráctil máxima (Emax) (Figura 11).

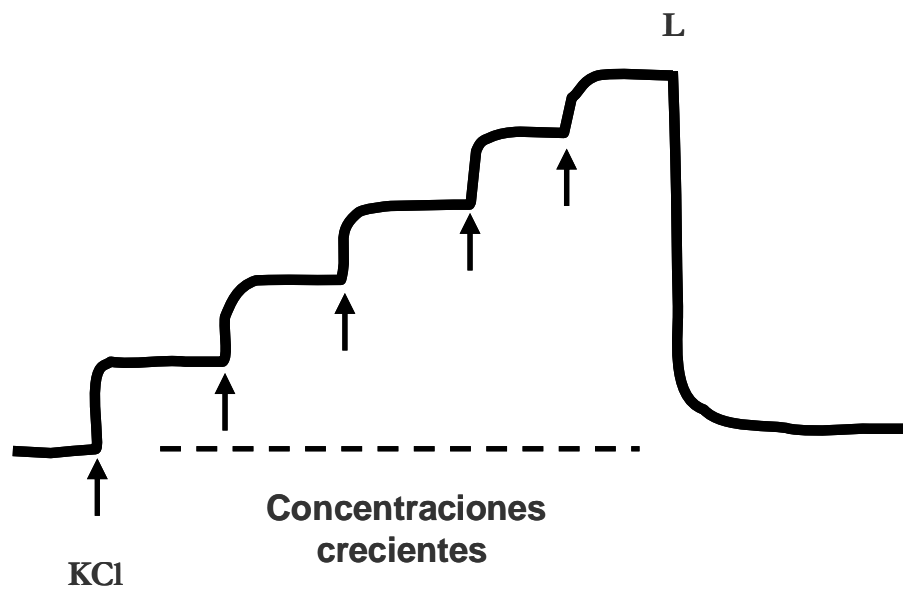


Figura 11. Protocolo utilizado para la obtención de curvas concentración-respuesta al KCl. L: lavado

Respuesta a la acetilcolina

Se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-6} M) con o sin endotelio para revelar la relajación endotelio-dependiente en segmentos arteriales de los tres grupos experimentales. En segmentos con endotelio previamente contraídos con 5-HT (3×10^{-7} M) o NA (3×10^{-6} M), se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en ausencia (control) o presencia de indometacina (10^{-5} M), un inhibidor de la ciclooxigenasa (COX), impidiendo la posible liberación de sustancias

prostanoides de la pared vascular. El inhibidor es añadido 15 min antes del agonista contráctil (Figura 12).

En otro grupo de experimentos las curvas de relajación a la acetilcolina se realizaron en presencia de indometacina y de L-NAME (10^{-4} M), un inhibidor de la NOS, para poner de manifiesto el papel del NO en la relación dependiente del endotelio. Los inhibidores se añadieron 15 minutos antes de la adición del agonista.

Para estudiar la participación del EDHF, se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos arteriales en presencia de indometacina y de L-NAME, para descartar la participación de prostanoides y de NO, y de charibdotoxina (10^{-7} M), un bloqueante específico de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de intermedia y alta conductancia, y apamina (10^{-6} M), un bloqueante de los los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de baja conductancia. Los inhibidores y bloqueantes se añadieron al baño de órganos 15 min antes de la contracción inducida por 5-HT o NA.

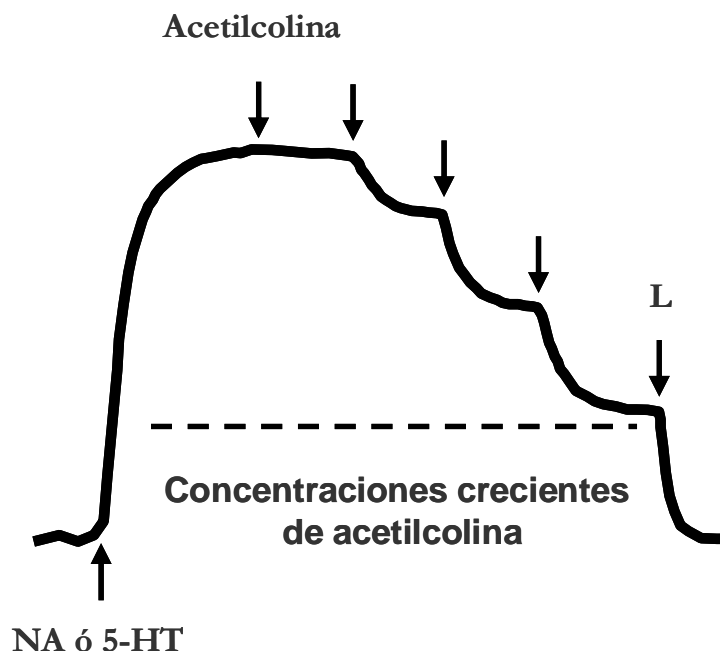


Figura 12. Protocolo seguido para la obtención de curvas concentración-respuesta a la acetilcolina. L: lavado

Estudio de la liberación de NO inducida por acetilcolina

Después de la contracción inducida por 5-HT (3×10^{-7} M) o NA (3×10^{-6} M) se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-6} M) en presencia o ausencia de ADMA (3×10^{-4} M), un inhibidor endógeno de la NOS, o L-NAME (3×10^{-4} M), un inhibidor sintético de la NOS. Los inhibidores se añadieron al baño de órganos junto con indometacina (10^{-5} M) 15 minutos antes de la adición del agonista.

Estudio de la liberación basal de NO

ADMA y L-NAME inhiben la síntesis del NO. Por tanto, si existe una liberación basal de NO, la adición de estos compuestos deberá producir un aumento de tensión.

Para estudiar los efectos contráctiles de ADMA y L-NAME, se realizaron curvas concentración-respuesta adicionando concentraciones acumulativas crecientes de L-NAME (10^{-6} - 10^{-3} M) o ADMA (10^{-6} - 10^{-3} M). Estas curvas se llevaron a cabo en segmentos con endotelio previamente contraídos con 5-HT ó NA (aproximadamente 15-25% del efecto máximo), y en presencia de indometacina (10^{-5} M), para eliminar cualquier efecto prostanoide sobre la pared vascular. En otro grupo de experimentos los segmentos se incubaron con L-arginina (10^{-3} M), el precursor de la síntesis de NO, para confirmar si la contracción inducida por L-NAME y ADMA era debida a la inhibición de la liberación basal de NO.

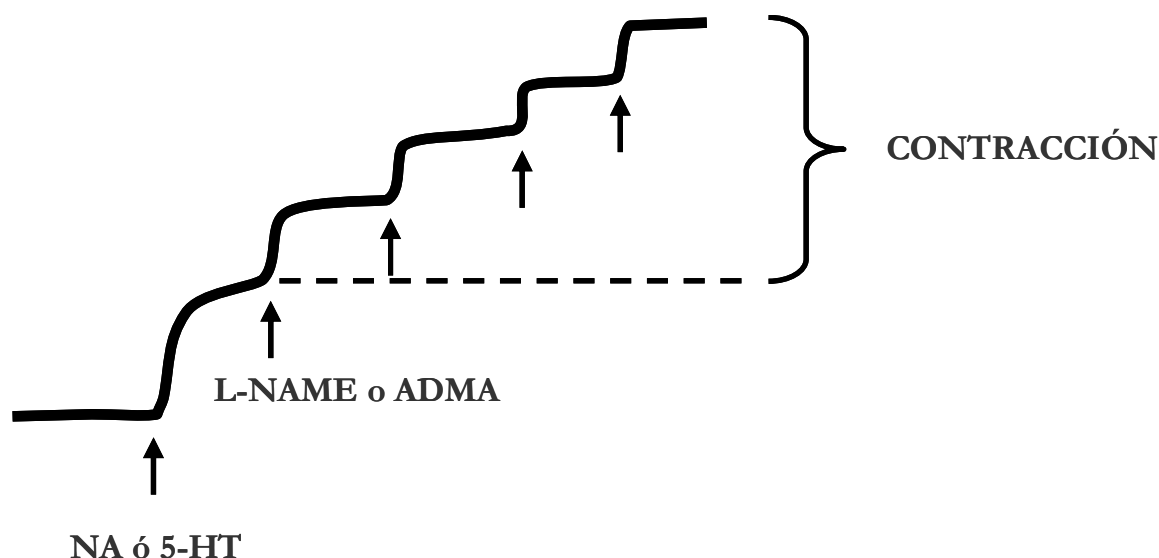


Figura 13. Protocolo seguido para la obtención de curvas concentración-respuesta de contracción de L-NAME ó ADMA.

3.5 Fármacos y soluciones

Los fármacos utilizados en los estudios funcionales se indican a continuación:

Cloruro de acetilcolina, clorhidrato de noradrenalina, clorhidrato de serotonina (5-HT), clorhidrato de N^G, N^G -dimetil-L-arginina asimétrica (ADMA), N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), clorhidrato de L-arginina, apamina, charibdotoxina, indometacina. Todos ellos distribuidos por Sigma (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Las soluciones concentradas de los fármacos se realizaron de modo extemporáneo utilizando como disolvente agua bidestilada a excepción de la indometacina que se disolvió en etanol y bicarbonato sódico (150 mM) ajustado a un pH 7,4 con HCl. La concentración de etanol final en el baño fue inferior al 0,01 %. Las diluciones correspondientes se hicieron con solución fisiológica (NaCl 0,9%).

3.6 Análisis de los resultados de las curvas concentración-respuesta

Todos los resultados se expresan como la media \pm error estándar (e.e). La respuesta contráctil se expresó en valores absolutos (mg) o como porcentaje de la respuesta inducida por KCl 100 mM. La relajación se expresa en porcentaje de la contracción máxima inducida por el agonista vasoconstrictor. En cada grupo de experimentos, *n* indica el número de animales utilizados.

La concentración de agonista que produce el 50% de la respuesta máxima (CE_{50}) se calculó para cada curva concentración-respuesta por un método de análisis de regresión no lineal. A partir de estos valores se calculó la media aritmética de la CE_{50} y su intervalo de confianza del 95% para cada grupo de experimentos.

Para la comparación de medias múltiples se realizó el análisis de la varianza (ANOVA), correspondiente a un diseño experimental complementario aleatorio de un solo factor. Cuando el ANOVA dio diferencias significativas se utilizó el test de Newman-Keuls. Para la aplicación de este test estadístico se empleó el programa GRAPHPAD INSTAT (Graphpad Software, USA). Las diferencias entre grupos fueron estimadas por el test de la “*t* de Student”. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor de $p < 0,05$.

4. Estudio de la expresión génica

4.1 Recogida de muestras

Para los experimentos de expresión génica a nivel de ARNm se utilizaron segmentos de arteria ilíaca, ramas de 2^o y 3^{er} orden de arteria mesentérica y tejido hepático. Después de su aislamiento y eliminación de tejido conectivo y grasa, se sumergieron inmediatamente en RNAlater® (Ambión), una solución que contiene inhibidores de las ARNasas y preserva el

ARNm presente en los tejidos. El almacenamiento y conservación de las muestras se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, los tejidos se sumergen inmediatamente en 5 volúmenes (p/v) de RNAlater durante 24 h a 4°C y después se congelaron a -20°C hasta su utilización.

4.2 Extracción del ARN total

El protocolo que se usó para la extracción de ARN está basado en el método descrito por Chomczynski y Sacchi.¹⁶³ El tejido hepático se cortó en trozos de 50-100 mg usando tijeras y pinzas esteriles y tratadas con RNaseZap® (Ambion) y lavadas con agua estéril tratada con DEPC, agente desnaturizante de las ARNasas. Se añadió al trozo de tejido 1 ml de “Tripure Isolation Reagent” (Roche Group S.A.), solución que contiene una mezcla estable de fenol y guanidino isotiocianato. Para la extracción del ARN total en arteria ilíaca se añadieron 500 µl de Tripure y en la arteria mesentérica 300 µl.

Para la homogeneización de la arteria ilíaca y mesentérica se utilizaron Eppendorf® micropestle (Sigma) para tubos de 1,2 - 2 ml y para la homogenización del tejido hepático se utilizó un T 10 basic Ultra-Turrax® (IKA Processing Equipment). El homogenizado se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para asegurar la completa disociación de los complejos núcleo-proteicos.

Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 µl de cloroformo al homogenado y se mezcló por inversión. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 3 min y se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm y 4°C. La centrifugación separó las dos fases: la fase acuosa con el ARN (parte superior) y la fase orgánica. Se recogió la fase superior incolora y se depositó en un nuevo tubo autoclavado.

En la fase de precipitación, se añadieron al sobrenadante 500 µl de isopropanol y 2 µl de glucógeno para facilitar el proceso de precipitación. Después de mezclar por pipeteo se incubó 1 hora a - 20°C, volviendo a

centrifugar durante 15 min a 13000 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se agitó con la ayuda de un vortex para separar el precipitado de las paredes del tubo. Seguidamente se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm y 4°C. Finalmente, se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado con agua estéril tratada con DEPC. Las muestras se almacenaron a - 80°C hasta su uso.

4.3 Calidad y cuantificación del ARN

La calidad y concentración del ARN total extraído se determinó con el RNA 6000 LabChip® junto con el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Los LabChip® se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. Los reactivos se dejaron 30 min a temperatura ambiente antes de su utilización. El gel se preparó utilizando una columna de 550 µl que se centrifugó a 1500 x g durante 10 min, y se recogió el gel filtrado.

1 µl del marcador de peso molecular (RNA 6000 ladder® Ambion) y 1 µl ARNm de cada una de las muestras a analizar se desnaturalizaron durante 2 min a 70°C y se introdujeron en los pocillos correspondientes. Finalmente con un vortex, con un acoplador para el LabChip®, se agitó durante 1 min a máxima potencia y se introdujo el LabChip® en el Agilent 2100 Bioanalyzer.

El Agilent 2100 Bioanalyzer con la ayuda del 2100 expert software *v.* B.01.02.SI136 permitió visualizar los resultados en un ordenador. El bioanalizador usa fluorescencia entre 670 nm y 700 nm para determinar la calidad e integridad del ARN total. Para cada muestra, el software calcula el cociente del área de los picos de ARN ribosomales (28S/18S), y el resultado se visualiza gracias a un electroferograma (Figura 14). El cociente debe encontrarse alrededor de 2 ya que el peso molecular del 28S es el doble al del 18S.

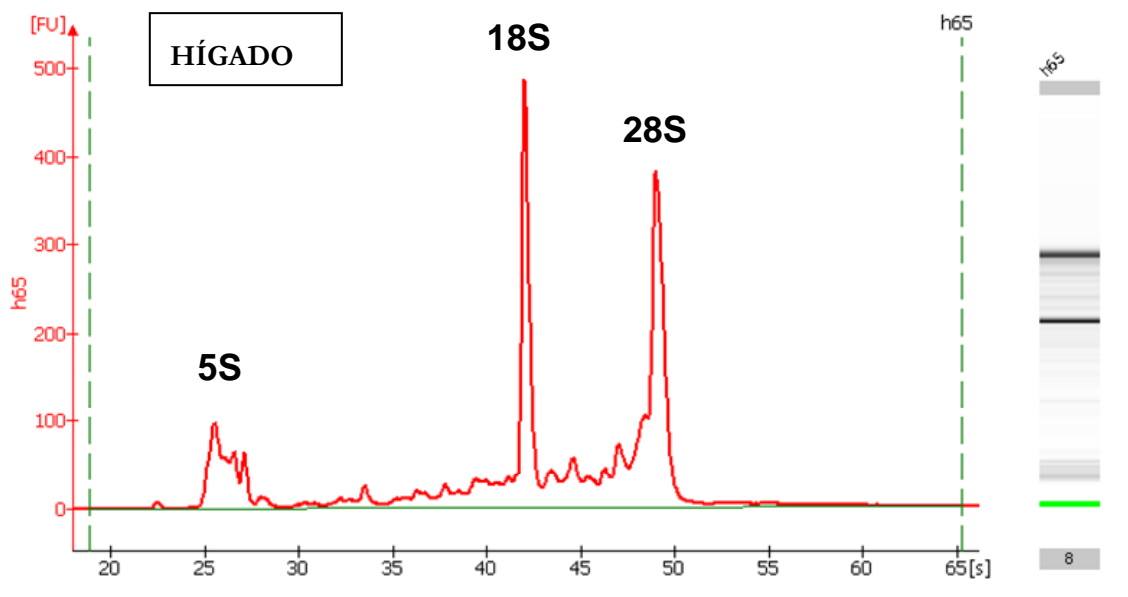


Figura 14. Ejemplo de un electroferograma (izquierda) y un gel (derecha) del ARN total extraído de un hígado del grupo BDL, donde se aprecia los picos 5S, 18S y 28S. El cociente 28S/18S es aproximadamente 2.

4.4 Síntesis del ADN complementario (ADNc)

El ADNc se obtuvo a a partir del un ARN mensajero (ARNm), proceso inverso a la transcripción. Para ello son necesarias unas ADN polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. La transcriptasa inversa utilizada para la obtención del ADNc fue la “MultiScribe™ Reverse Transcriptase” (Applied Biosystems). La transcripción reversa (RT) del ARN total se llevó a cabo mediante el kit “Taqman Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystems) cuyos componentes se especifican a continuación:

Componentes	Volumen (15 μ l)	Concentración Final
Buffer RT 10x	1,5 μ l	1x
MgCl ₂ 25mM	3,3 μ l	5,5 mM
Random Hexamers	0,75 μ l	2,5 μ M
Mezcla dNTP	3 μ l	500 μ M cada dNTP
Inhibidor ARNasa	0,3 μ l	0,4 U/ μ l
MultiScribe RT (50U/ μ l)	0,375 μ l	1,25 U/ μ l
ARN		20 ng/ μ l
Agua DEPC	c.s.p. 15 μ l	

Todos los componentes se adicionaron a un tubo de 0,2 ml y se incubaron a 25°C durante 10 min, seguido de un ciclo a 42°C durante 30 min, y finalmente se inactivó la transcriptasa inversa mediante una incubación a 95°C durante 5 min. Todo el proceso se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). El ADNc se guardó a -20°C hasta su uso.

4.5 Amplificación del ADNc (PCR-RT en tiempo real)

Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) es actualmente el método más sensible y preciso para la detección de los niveles de ARNm. Este método, permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, a través del empleo de compuestos con propiedades fluorescentes, de modo que determinando el incremento de fluorescencia se puede determinar la cantidad de producto formado.

Una vez sintetizado el ADNc, se amplificaron de forma selectiva secuencias específicas de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR utiliza dos fragmentos cortos de ADN (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o “primers” se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas de ADN. El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivamente:

- Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del ADN
- Unión o “annealing” de los “primers” específicos a sus secuencias complementarias
- Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del “primer” respectivo

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana de ADN, que viene dado por la expresión 2^n (siendo n el número de ciclos) hasta que se llega a un punto en que la reacción deja de ser exponencial.

El principio básico de la PCR-RT es la detección de los productos de la PCR mediante la generación de señales fluorescentes. La señal de fluorescencia en nuestro trabajo es generada por unos fluoróforos que se encuentran unidos a sondas específicas de hibridación, denominadas sistema Taqman® (Applied Biosystems).

El sistema Taqman desarrollado por Perkin-Elmer, permite monitorizar la reacción ciclo a ciclo, de modo que podemos escoger la región de la curva donde el incremento es lineal. Este sistema incorpora a la reacción de PCR un oligonucleótido denominado sonda Taqman que hibrida en una región interna del producto de la PCR (secuencia diana). Esta sonda se localiza en una región intermedia entre el “primer forward” y el “primer reverse”, e incorpora en el extremo 5' un fluoróforo donante (F) que emite fluorescencia al ser excitado y en el extremo 3' un apagador o “quencher” (Q) que absorbe la fluorescencia liberada por el donante. Para que se absorba la fluorescencia emitida por el donante, la molécula donante y aceptora deben estar muy próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. A este fenómeno se le llama FRET (“Fluorescence Resonance Energy Transfer”) y se basa en que la proximidad espacial de ambas moléculas dando como resultado una baja señal de fluorescencia. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donante es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, el desplazamiento a lo largo de la cadena de la ADN polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda que ha hibridado con su cadena complementaria, produciéndose la liberación del fluoróforo donante. Como donante y aceptor están ahora alejados, la fluorescencia emitida por el primero ya no es absorbida por el aceptor y es captada por el lector (Figura 15). Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto de amplificación.

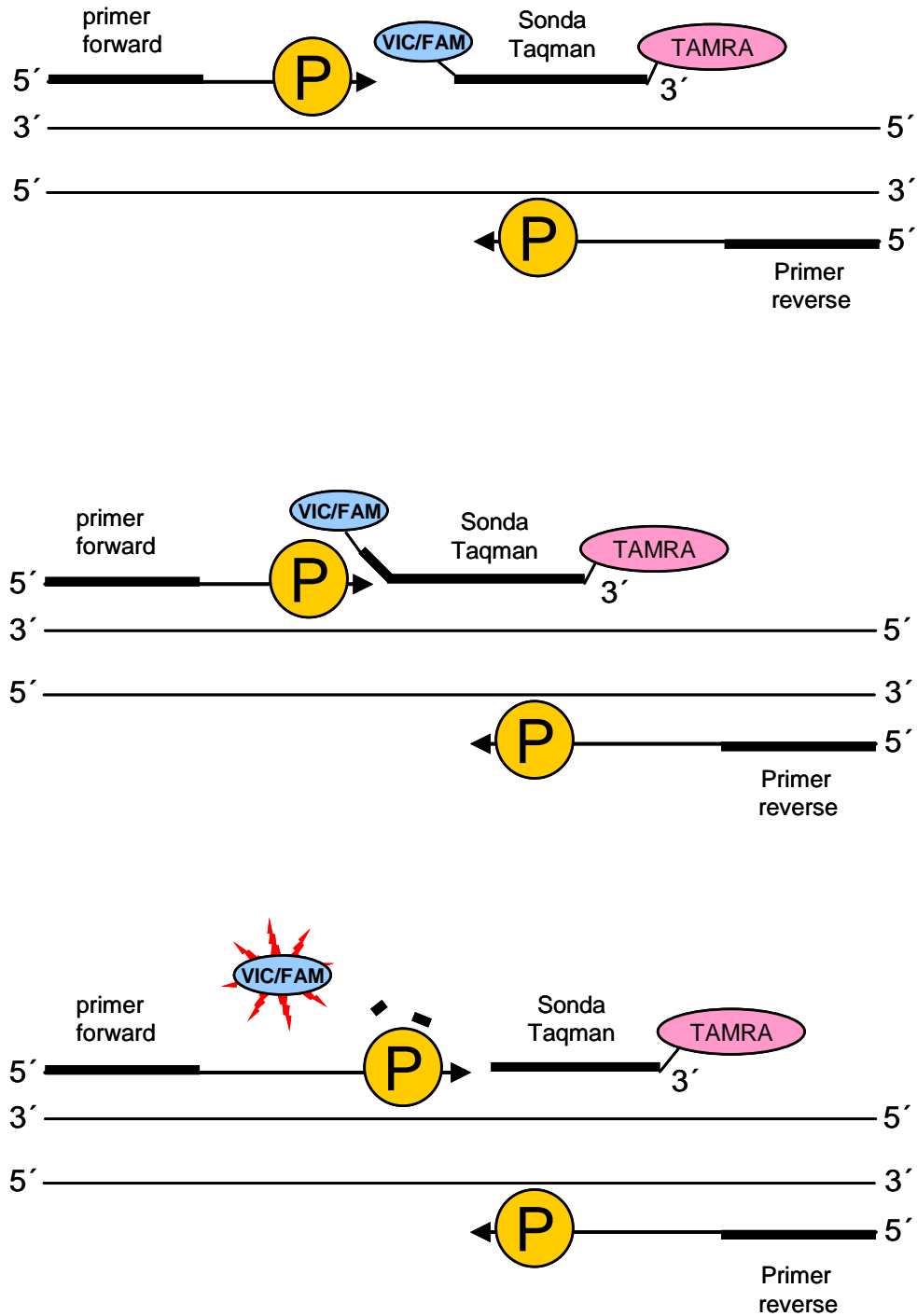


Figura 15. El esquema muestra el funcionamiento del sistema Taqman: la sonda Taqman hibrida en una región intermedia del ADNc entre el “primer forward” y el “primer reverse”. Incorpora en el extremo 5’un fluoróforo (VIC/FAM) y en el 3’un aceptor (TAMRA). Al principio están juntos y la fluorescencia que emite uno la capta el otro, pero cuando se separan por acción de la ADN polimerasa (P), el aceptor deja de absorber la fluorescencia y empieza a detectarse la fluorescencia.

En la cuantificación de la expresión del gen de estudio, es necesario un control interno para corregir la posible degradación de ARN en el proceso o el posible problema de sensibilidad de la síntesis de ADNc. Frecuentemente a este control interno se le llama gen de mantenimiento “housekeeping gen”, llamado de esta forma porque su síntesis ocurre en todos los tipos celulares nucleados, y son necesarios para la supervivencia celular. Estos genes son expresados constitutivamente por todo tipo de células, y no deberían estar alterados en condiciones fisiopatológicas. Habitualmente se utilizan: β -actina, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), hipoxantina, 18S, 28S, etc.

Condiciones experimentales

El ensayo de la 5' nucleasa Taqman fue llevado a cabo mediante el ABI PRISM 7900 Sequence Detection System® (Applied Biosystems), para cuantificar la expresión de los genes, DDAH-1, DDAH-2 y eNOS (Tabla 3).

Este termociclador incorpora un lector de fluorescencia para llevar a cabo la PCR-RT y está diseñado para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realiza la amplificación. En la presente tesis, el sistema de detección por fluorescencia empleado en la PCR en tiempo real utiliza cebadores y sondas específicas de longitud entre 50-150 pb marcadas con fluoróforos previamente diseñados, validados y vendidos comercialmente como Assays-on-Demand Gene Expression probes® (Applied Biosystems). El fluoróforo FAM se utilizó para los genes de estudio y el control interno utilizado fue GAPDH (4352338E, Applied Biosystems) marcado con el fluoróforo VIC.

Tabla 3. Características de los genes de estudio.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Referencia	Longitud amplicón (pb)
dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1	<i>Ddab-1</i>	Rn00574200_m1	69
dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2	<i>Ddab-2</i>	Rn01525775_g1	105
óxido nítrico sintasa 3	<i>Nos-3 (eNos)</i>	Rn02132634_s1	117

Los reactivos empleados para la realización de la PCR-RT se especifican en la siguiente tabla:

Componentes	Volumen (25 µl)	Concentración Final
2x Master Mix	12,5 µl	1x
Sonda Tagman + oligonucleótidos	1,25 µl	200 nM
ADNc	2,5 µl	2,5 µM
Agua DEPC	8,75 µl	

2,5 µl de ADNc procedente de la reacción de RT se usó para la amplificación por PCR-RT. Cada reacción de PCR contenía 12,5 µl del Taqman Universal Maxter Mix (Applied Biosystems), que contenía la polimerasa activada por calor, AmpErase uracil-N-glycosylase (UNG). Además se añadió 1,25 µl del tubo que contiene cada sonda con los oligonucleótidos correspondientes, y por último el agua DEPC suficiente para alcanzar el volumen total de 25 µl.

Las condiciones del termociclador usadas fueron: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, y 40 ciclos de 95°C durante 15 s seguidos de 60°C durante 1 min. La incubación a 50°C fue necesaria para activar la AmpErase UNG.

4.6 Análisis de los resultados de expresión génica

Típicamente una reacción de PCR se ajusta a la siguiente ecuación:

$$X_n = X_0 (1 + E_x)^n$$

X_n = Número de copias del gen de estudio en el ciclo n

X_0 = Número de copias iniciales del gen de estudio

E_x = Eficacia de amplificación del gen de estudio (X)

n = Número de ciclos

La información generada por el termociclador en cada uno de los ciclos es captada y enviada a un ordenador con el programa informático Sequence Detection Software (SDS) v 2.2.2 (Applied Biosystems) que construye las curvas de amplificación a partir de los datos de emisión de fluorescencia recogidos durante la reacción en tiempo real. Finalmente se obtiene una representación en la que el eje de ordenadas es el logaritmo de la intensidad de la fluorescencia y el eje de abscisas es el número de ciclos transcurridos (Figura 16).

El parámetro de medida de la expresión de un determinado gen es el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral (*“threshold cycle”*, C_t), a partir del cual la intensidad de fluorescencia empieza a ser apreciable. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de ADNc de partida. Cuantas más copias de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la transcripción inversa, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

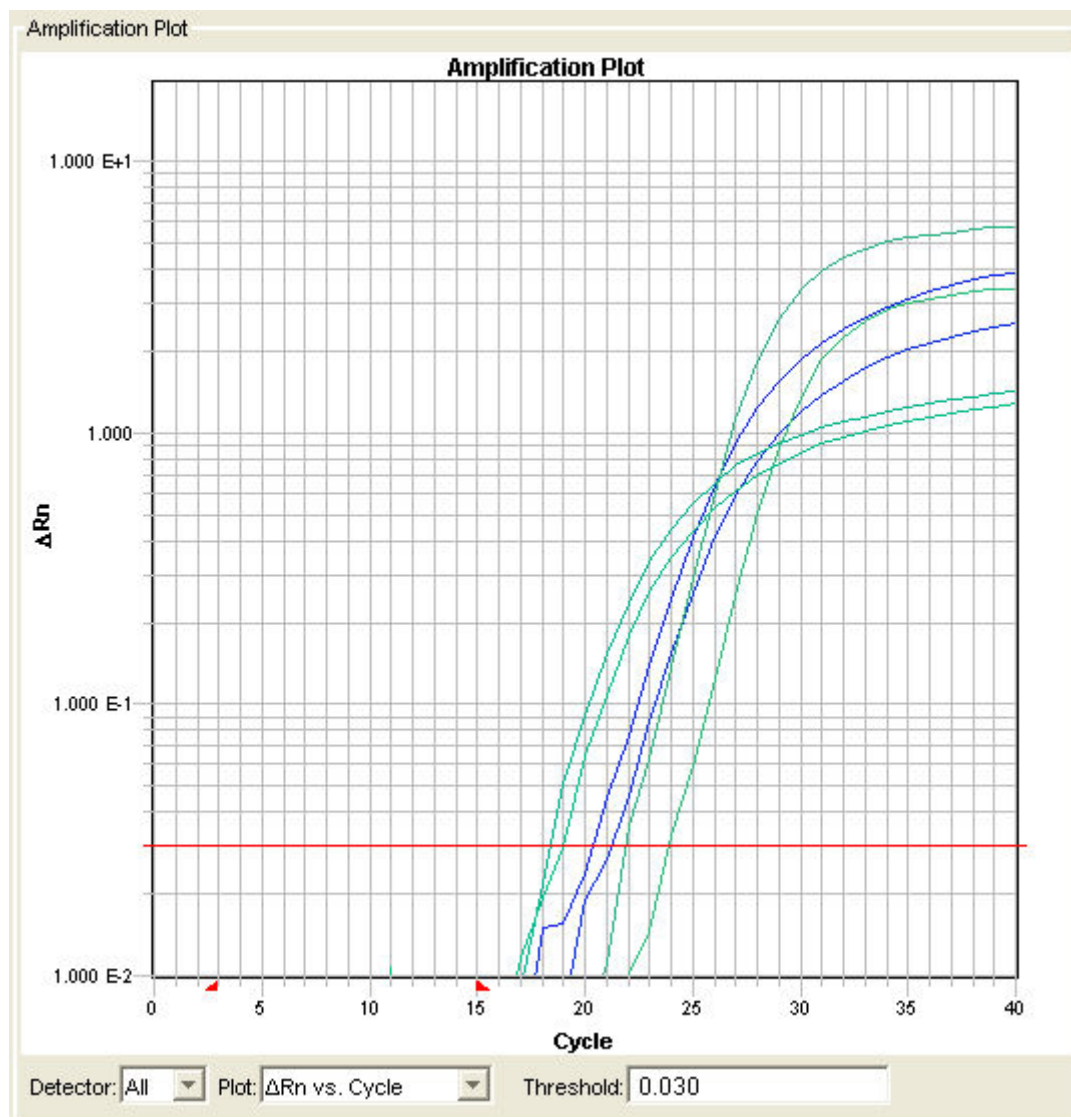


Figura 16. Curvas de amplificación del gen de estudio por PCR-RT. La línea horizontal de color rojo indica el umbral (threshold) a partir del cual empieza la linealidad, se establece como umbral el valor de 0,03 para todos los grupos de estudio. ΔRn = Incremento de fluorescencia. Cycle: número de ciclo en que se encuentra la reacción.

Para el análisis de los resultados usamos el método semi-cuantitativo denominado $\Delta\Delta Ct$.¹⁶⁴ Este método permite referir la cantidad de ARNm que existe en una muestra frente a otra de referencia. En líneas generales consiste en calcular ΔCt , que es la diferencia entre el Ct del gen que se quiere cuantificar y el Ct del estándar interno, en nuestro caso el GAPDH. Comparando el ΔCt frente al ΔCt de una muestra control podemos calcular cuanto más o menos se expresa este gen problema en dicha muestra frente al control. Una vez conocidos los valores de Ct para el gen problema y para gen

estándar interno tanto en nuestra muestra control como en la muestra problema, tan sólo basta aplicar la siguiente fórmula para conocer la expresión relativa:

Expresión relativa: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Donde $\Delta\Delta Ct$:

$[Ct \text{ de X gen problema} - Ct \text{ GAPDH}] - [Ct \text{ X control} - Ct \text{ GAPDH}]$, en nuestro caso X es DDAH-1, DDAH-2, y eNOS.

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual a 1.

4.7 Reactivos y soluciones

RNAlater® y RNaseZap® (Ambión), Tripure Isolation Reagent® (Roche), isopropanol, cloroformo, glucógeno, agua estéril purificada con DEPC (Sigma) y etanol absoluto (Panreac).

4.8 Tratamiento estadístico de los datos

Cada muestra se estudió por triplicado y aplicamos la ecuación de comparación de Ct mencionada anteriormente para el cálculo de la diferencia de expresión génica entre ratas SHAM, HTP y BDL. El grupo control (ratas SHAM) toma el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como 1. En cada grupo de experimentos, *n* indica el número de animales de experimentación.

Para la comparación de medias múltiples se realizó el análisis de la varianza (ANOVA), correspondiente a un diseño experimental complementario aleatorio de un solo factor. Cuando el ANOVA dió diferencias significativas se utilizó el test de Newman-Keuls. Para la aplicación de este test estadístico se empleó el programa GRAPHPAD INSTAT (Graphpad Software, USA). Las diferencias entre grupos fueron estimadas por

el test de la “*t* de Student”. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor de $p < 0,05$.

5. Determinación de L-arginina y ADMA por HPLC

5.1 Preparación de la muestra

Se pesaron 100 mg de hígado y se sumergieron en 200 μ l de solución salina fisiológica tamponada (pH=7,4). El tejido se homogenizó en un T 10 basic Ultra-Turrax® (IKA Processing Equipment) y posteriormente se centrifugó durante 1 h a máxima velocidad (13000 rpm). Se recogió el sobrenadante y se pasó por una columna de intercambio iónico (Varian Bond Elut C50) para la separación y extracción de L-arginina y ADMA.

Las columnas se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se pasaron 2 ml de metanol para activación de las columnas y posteriormente 4 ml de ácido tricloroacético (2 %). Posteriormente se pasó la muestra por la columna, y se lavó con 2 ml de ácido tricloroacético (2 %), 5 ml de tampón fosfato y 2 ml de metanol.

Finalmente se añaden 4 ml de mezcla recuperadora (68% de metanol, 30% de agua y 2% de trietilamina) que tras pasar por la columna se recogieron en un tubo que se desecó. El residuo seco se resuspendió en 120 μ l de fase móvil y se pasó por el HPLC para la determinación de la cantidad de L-arginina y ADMA.

5.2 Condiciones del HPLC

Se utilizaron columnas ODS C18 (Scharlab) y el detector de absorbancia a 200 nm. El flujo se ajustó a 1 ml/min y la fase móvil contenía ácido ortofosfórico (0,025 M), ácido hexanosulfónico (0,01 M) y acetonitrilo (1%), el pH =5 se ajustó adicionando KOH.

En estas condiciones y a una temperatura de 23°C los tiempos de retención fueron: de 11 min para la L-arginina y 26 minutos para el ADMA.

5.3 Reactivos y soluciones

Metanol, trietilamina, ácido tricloroacético (Sigma), KOH (Panreac), ácido ortofosfórico, ácido hexanosulfónico y acetonitrilo (Scharlab).

5.4 Expresión de resultados

Los resultados se expresan en μmol de L-arginina o ADMA/g de proteína. La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit, Pierce).

RESULTADOS

1. Caracterización de los modelos experimentales

Antes de desarrollar los protocolos experimentales descritos en el apartado 3.4 de material y métodos, se determinaron diversos parámetros para monitorizar la salud de las ratas y el desarrollo de las patologías. Al inicio del estudio las ratas se distribuyeron en tres grupos y se determinó el peso corporal del animal justo antes de la operación (Peso_1), que fue similar en los tres grupos de estudio (Tabla 4). Transcurrido el tiempo necesario para el desarrollo de la patología, los animales se pesaron (Peso_2), fueron sacrificados y se realizaron los diferentes experimentos. Los animales del grupo BDL presentaron una disminución del peso corporal (Peso_2) que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto del grupo SHAM (Tabla 4).

Los valores de la presión arterial media y la presión portal se muestran en la Tabla 4. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la presión arterial media entre los tres grupos de estudio. Como cabía esperar se observó un incremento significativo de la presión portal en el grupo de ratas a las que se les había realizado una estenosis parcial de la vena porta, grupo HTP, cuando se compararon con el grupo SHAM. Las ratas del grupo BDL también desarrollaron un aumento significativo de la presión portal (Tabla 4)

La Tabla 5 muestra los valores de algunos parámetros bioquímicos que se determinaron en el plasma de ratas de los tres grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los valores del grupo HTP con los del grupo SHAM. En el grupo BDL se observó un incremento significativo en la concentración plasmática de creatinina cuando se comparó con la del grupo SHAM, indicando una disfunción renal en las ratas con cirrosis inducida por la ligadura y escisión del conducto biliar. La bilirrubina plasmática elevada en el grupo de ratas BDL indica la presencia de un daño hepático. El daño se confirmó por el análisis histopatológico de

secciones hepáticas, que revelaron una proliferación significativa y expansión de colangioloos, hepatocitos difusos y reorganización estructural en hígados del grupo BDL (Figura 17). En secciones de hígado del grupo SHAM se observaron hepatocitos regulares distribuidos de forma radial hacia la vena centrolobulillar hepática. En secciones hepáticas del grupo HTP no se observó ninguna lesión hepática, los hepatocitos siguen siendo regulares. Solamente en la zona del espacio porta o tríada portal se distingue un estasis, indicando una lesión vascular.

Tabla 4. Valores medios del peso corporal antes de la operación (Peso₁) y del estudio (Peso₂), presión arterial media (PAM) y presión portal (PP) con su error estándar (e.e) en los tres grupos de estudio. (*) p<0,05 comparado con el grupo SHAM.

	Peso ₁ ± e.e (g)	Peso ₂ ± e.e (g)	PAM ± e.e (mmHg)	PP ± e.e (mmHg)
SHAM	323±19	360±19	93±9	8±1
HTP	321±17	345±20	94±11	17±3*
BDL	325±18	308±16*	111±10	22±2*

Tabla 5. Valores medios de algunos parámetros bioquímicos con su error estándar (e.e) en los tres grupos de estudio. Bb: bilirrubina total, Col: colesterol total, Cr: creatinina, TG: triglicéridos, Fosf: fosfolípidos, Na⁺: sodio. (*) p<0,01 comparado con el grupo SHAM.

	Bb ± e.e (mg/dl)	Col ± e.e (mg/dl)	Cr ± e.e (mg/dl)	TG ± e.e (mg/dl)	Fosf ± e.e (mg/dl)	Na ⁺ ± e.e (mmol/l)
SHAM	0,2±0,1	79±7	0,8±0,3	97±13	95±6	135±10
HTP	0,9±0,4	76±8	0,7±0,2	84±10	93±3	149±7
BDL	20,6±2,8*	86±17	4,5±0,6*	108±19	99±10	150±10

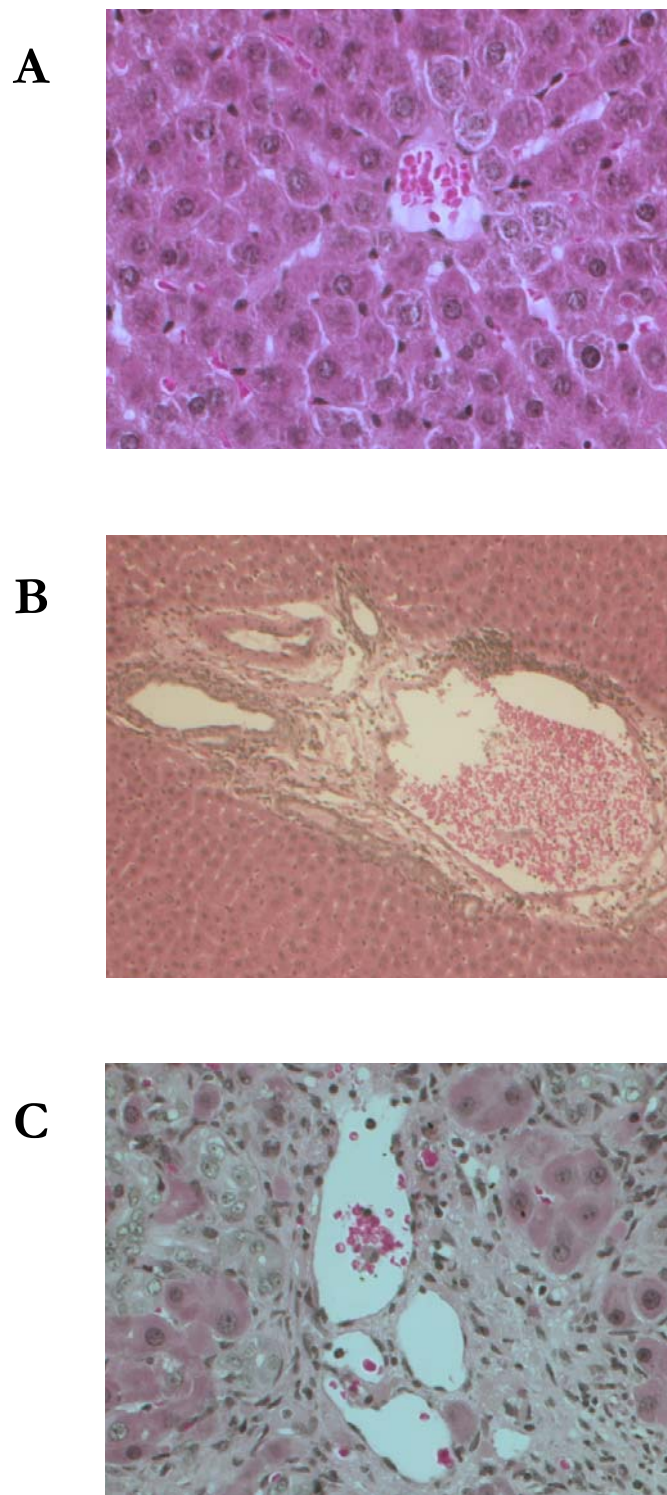


Figura 17. Cortes histológicos de **hígado** de los tres grupos de estudio. **A:** grupo SHAM (hematoxilina-eosina, 63x), **B:** grupo HTP (hematoxilina-eosina, 10x) y **C:** grupo BDL (hematoxilina-eosina, 63 x).

2. Estudios Funcionales

2.1 Respuesta al cloruro potásico (KCl)

La capacidad de contracción del músculo liso vascular se comprobó por su respuesta a la solución despolarizante de KCl. La adición de KCl (5-100 mM) produjo contracción concentración-dependiente en la arteria ilíaca y en la arteria mesentérica. En todos los casos tras una primera fase de contracción, se alcanza una meseta sostenida y estable para cada concentración. A partir de la concentración de KCl 60 mM el tramo asintótico corresponde a la respuesta máxima (E_{max}).

La respuesta máxima a la despolarización con KCl fue similar ($p > 0,05$) en segmentos de arteria ilíaca de los grupos BDL y SHAM. Sin embargo, la contracción de los segmentos del grupo HTP fue significativamente mayor (Tabla 6 y Figura 18). Por otra parte, la sensibilidad, en términos de CE_{50} , de los segmentos de arteria ilíaca al KCl fue mayor en segmentos del grupo HTP comparada con la de los grupos BDL o SHAM.

En segmentos de arteria mesentérica los resultados muestran un desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración-respuesta al KCl en anillos procedentes del grupo BDL cuando se compararon con los del grupo SHAM. Por el contrario, los del grupo HTP mostraron una disminución significativa de la CE_{50} comparados con el grupo SHAM (Tabla 6, Figura 19). En cuanto al efecto máximo alcanzado, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo BDL y SHAM. Sin embargo, el grupo HTP mostró un mayor efecto máximo al KCl que los grupos SHAM o BDL.

Estos resultados muestran que en la hipertensión portal prehepática, grupo HTP, existe una hipercontractilidad y mayor sensibilidad al KCl en segmentos de arteria ilíaca y mesentérica. Sin embargo, en ratas cirróticas la arteria ilíaca no desarrolla esta hipercontractilidad y la arteria mesentérica muestra una menor sensibilidad a la despolarización con KCl.

Tabla 6. Valores medios de concentración eficaz 50 (CE₅₀), su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) ± error estándar (e.e) de las curvas concentración-respuesta al KCl en segmentos de **arteria ilíaca y mesentérica**.

KCl	n	CE ₅₀ (mM)	E _{max} ± e.e.
		Intervalo de confianza 95 %	(mg)
Arteria Ilíaca			
SHAM	8	37,2 (36,9-37,4)	1093 ± 78
HTP	7	33,2 (32,9-33,4)*	1471 ± 187*
BDL	7	39,1 (38,8-39,4) [#]	968 ± 130 [#]
Arteria Mesentérica			
SHAM	8	29,2 (28,7-29,8)	1036 ± 86
HTP	7	26,6 (26,2-27,1)*	1267 ± 75*
BDL	7	46,5 (46,0-47,0)** [#]	919 ± 49 [#]

(* p<0,05 y (**) p<0,001 con respecto a los valores del grupo control (SHAM) y ([#]) p<0,05 y con respecto a los valores del grupo HTP. n= número de ratas

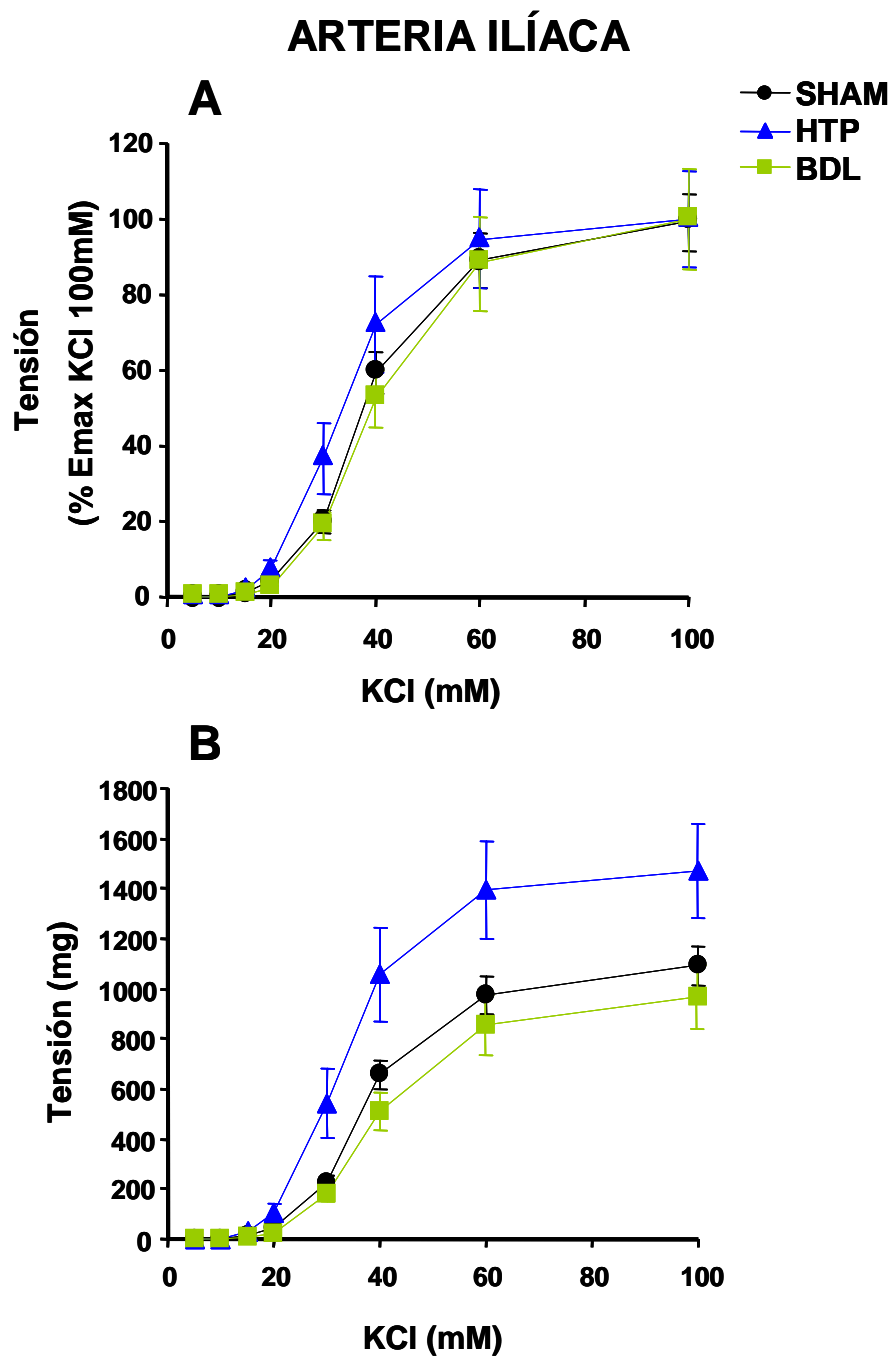


Figura 18. Curvas concentración-respuesta al KCl en segmentos de **arteria ilíaca** de los tres grupos de estudio. **A:** representación gráfica respecto al Emax y **B:** representación gráfica de los valores absolutos en mg.

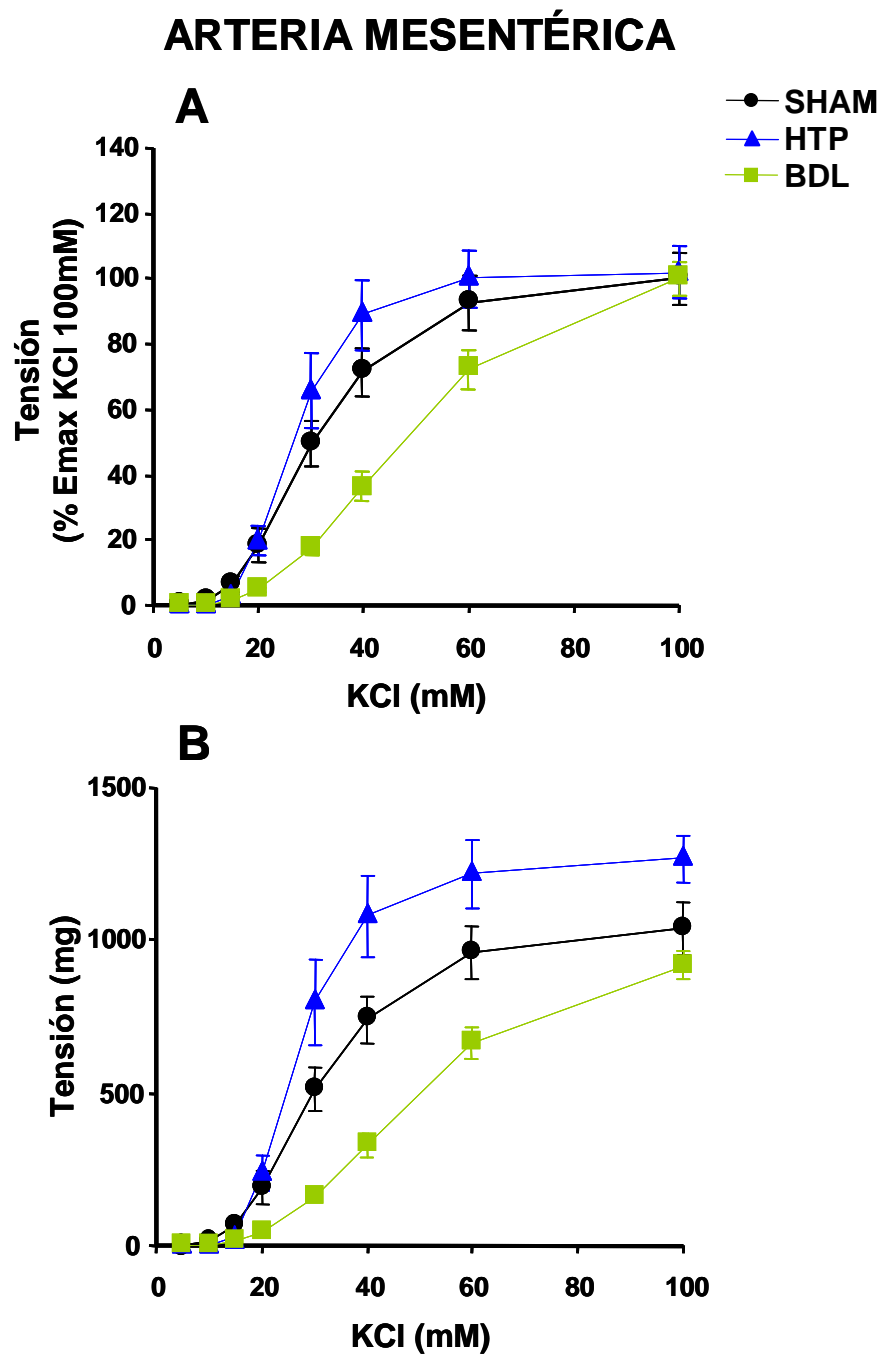


Figura 19. Curvas concentración-respuesta al KCl en segmentos de **arteria mesentérica** de los tres grupos de estudio. **A:** representación gráfica respecto al Emax y **B:** representación gráfica de los valores absolutos en mg.

2.2 Respuesta a la acetilcolina

La acetilcolina produce vasodilatación por activar receptores muscarínicos localizados en el endotelio. Los mecanismos implicados en esta respuesta relajante incluyen la activación de la COX y síntesis de prostaglandinas relajantes, la activación de la NOS y formación de NO y la participación del EDHF mediante la apertura de canales de K⁺.

En arterias previamente contraídas la acetilcolina (10⁻⁹-10⁻⁶ M) produjo relajación concentración-dependiente y endotelio-dependiente en los tres grupos de estudio. En segmentos de arteria ilíaca o arteria mesentérica procedentes de ratas del grupo SHAM, HTP y BDL esta relajación fue similar. No se observaron cambios significativos en la sensibilidad a la acetilcolina, en términos de CE₅₀, ni en la relajación máxima alcanzada (Tablas 7 y 8, Figuras 20 y 21).

Estos resultados sugieren que la hipertensión portal asociada o no a una cirrosis, no afecta la capacidad relajante dependiente del endotelio a la acetilcolina en segmentos de arteria ilíaca o mesentérica. La participación de los factores relajantes de origen endotelial que participan en la respuesta relajante a la acetilcolina se estudió en anillos previamente contraídos e inhibiendo progresivamente la COX, la NOS y los canales de K⁺ activados por Ca²⁺.

En arteria ilíaca la inhibición de la síntesis de prostaglandinas con indometacina (10⁻⁵ M) no modificó (p>0,05) la respuesta relajante control a la acetilcolina en ninguno de los tres grupos de estudio (Figura 22). La adición al baño de indometacina (10⁻⁵ M) más L-NAME (10⁻⁴ M) produjo una reducción significativa de la relajación a la acetilcolina en segmentos de los tres grupos de estudio (Figura 22). Esta inhibición fue similar en segmentos del grupo SHAM, HTP y BDL (86%, 85% y 81%, respectivamente). Esta gran reducción de la respuesta relajante a la acetilcolina al inhibir la NOS, indicaría que el NO juega un papel substancial en la respuesta dependiente del

endotelio en la arteria ilíaca. La relajación residual observada, independiente de prostaglandinas y de NO, fue abolida tras la adición de charibdotoxina (10^{-7} M) y apamina (10^{-6} M) (Figura 22). Indicando la participación del EDHF en la respuesta relajante a la acetilcolina en segmentos de arteria ilíaca, aunque en menor medida que el NO.

En segmentos de tercer orden de arteria mesentérica la inhibición de la síntesis de prostaglandinas con indometacina (10^{-5} M) o la incubación de indometacina más L-NAME (10^{-4} M) para inhibir además la síntesis de NO no modificó ($p > 0,05$) la respuesta control a la acetilcolina en los grupos HTP y BDL (Figura 23). En segmentos de arteria mesentérica del grupo SHAM el L-NAME (10^{-4} M) inhibió un 8 ± 3 % ($p > 0,05$) la relajación máxima a la acetilcolina (Figura 23). La relajación residual que se observa después de inhibir la COX y NOS, fue totalmente abolida con la adición al baño de charibdotoxina (10^{-7} M) y apamina (10^{-6} M). Estos resultados ponen de manifiesto la gran contribución del EDHF en la relajación a la acetilcolina en segmentos de arteria mesentérica (Figura 23).

En conjunto estos resultados indicarían que la relajación inducida por acetilcolina en la arteria ilíaca es debida en gran medida al NO y en menor grado a la participación del EDHF. Por el contrario, en arteria mesentérica la participación del EDHF mediante la apertura de canales de K^+ activados por Ca^{2+} sería el factor que cobraría más importancia en dicha relajación.

Tabla 7. Valores medios de concentración eficaz 50 (CE_{50}), su intervalo de confianza del 95% y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e) de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos de **arteria ilíaca** procedentes de ratas SHAM, HTP y BDL.

Acetilcolina	<i>n</i>	CE_{50} (M)	$E_{max} \pm e.e.$
		Intervalo de confianza 95 %	(% relajación)
SHAM	8	$1,2 \times 10^{-8}$ ($7,4 \times 10^{-9}$ - $2,0 \times 10^{-8}$)	83 ± 2
HTP	7	$1,5 \times 10^{-8}$ ($9,0 \times 10^{-9}$ - $2,6 \times 10^{-8}$)	87 ± 3
BDL	9	$1,9 \times 10^{-8}$ ($1,3 \times 10^{-8}$ - $2,7 \times 10^{-8}$)	85 ± 2

n= número de ratas

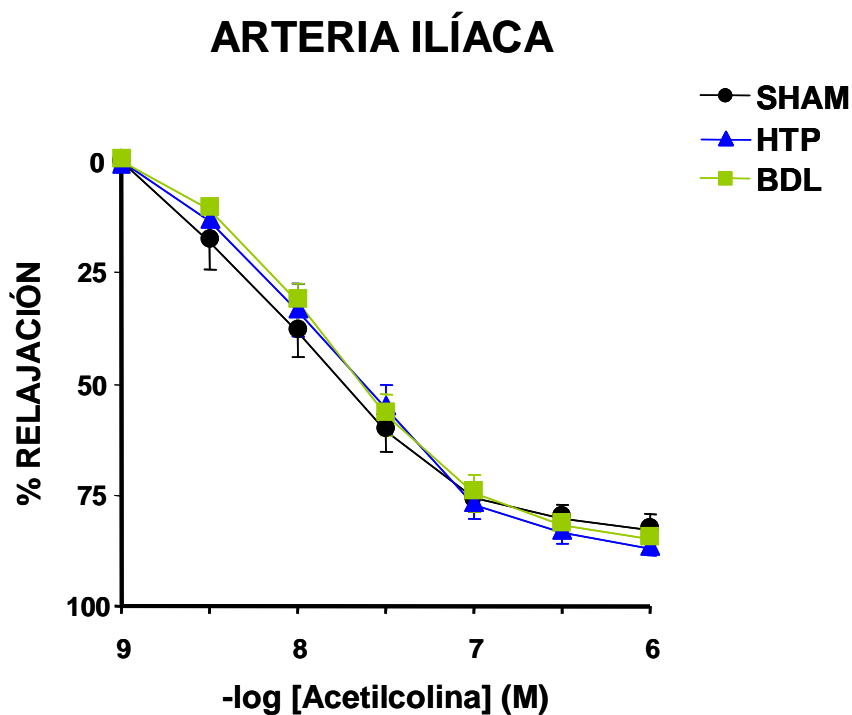


Figura 20. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos de **arteria ilíaca** de los tres grupos de estudio.

Tabla 8. Valores medios de concentración eficaz 50 (CE₅₀), su intervalo de confianza del 95% y del efecto máximo (E_{max}) ± error estándar (e.e) de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos de **arteria mesentérica** procedentes de ratas SHAM, HTP y BDL.

Acetilcolina	n	CE ₅₀ (M)	E _{max} ± e.e.
		Intervalo de Confianza 95 %	(% relajación)
SHAM	9	8,0 x 10 ⁻⁹ (6,2 x 10 ⁻⁹ -1,0 x 10 ⁻⁸)	100
HTP	8	9,2 x 10 ⁻⁹ (5,8 x 10 ⁻⁹ -1,5 x 10 ⁻⁸)	100
BDL	11	8,8 x 10 ⁻⁹ (5,7 x 10 ⁻⁹ -1,3 x 10 ⁻⁸)	98 ± 1

n= número de ratas

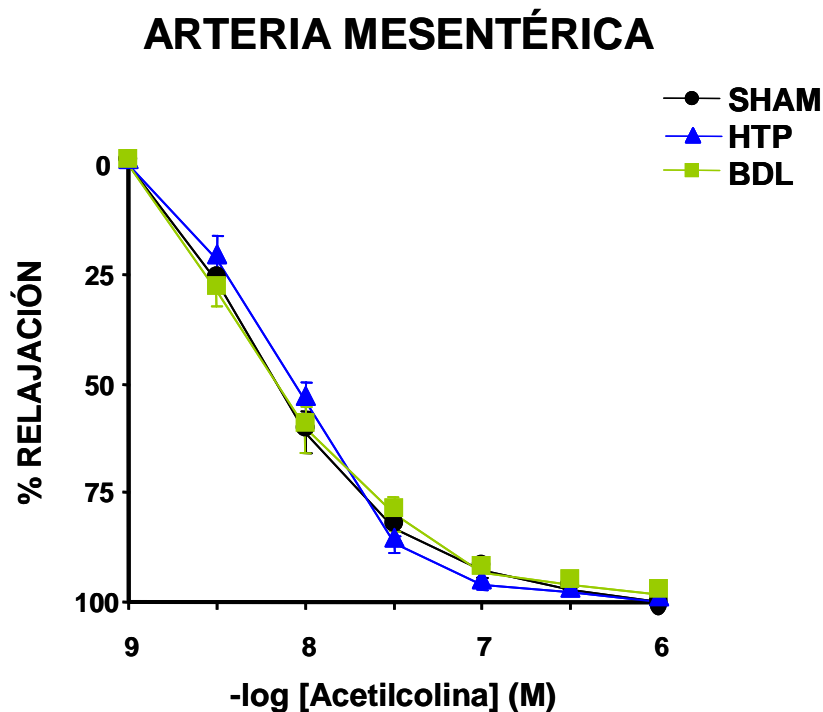


Figura 21. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos de **arteria mesentérica** de los tres grupos de estudio.

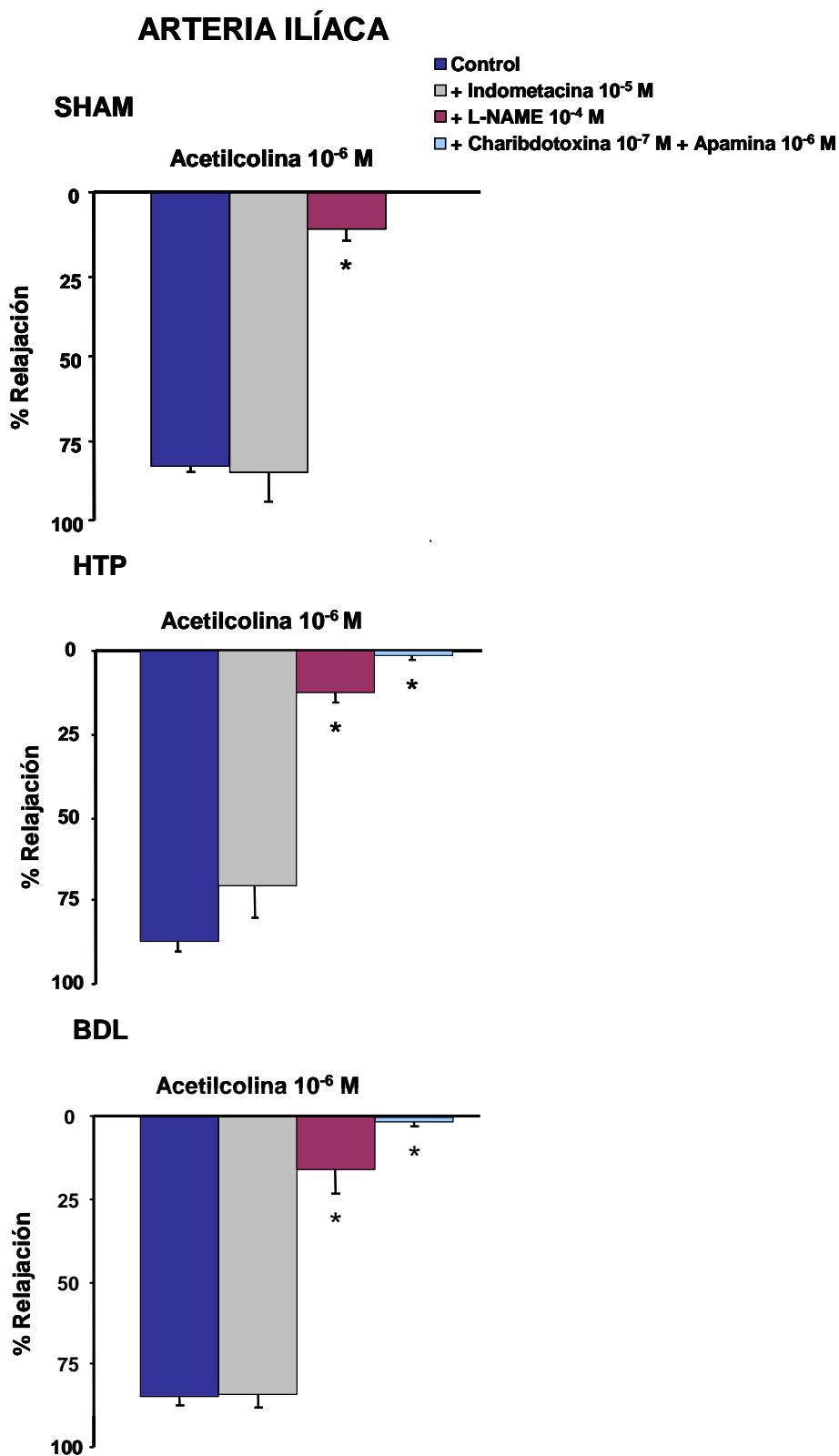


Figura 22. Respuesta a la acetilcolina (10⁻⁶ M) en ausencia (control) y en presencia de indometacina (10⁻⁵ M), de indometacina más L-NAME (10⁻⁴ M) y de indometacina más L-NAME más charibdotoxina (10⁻⁷ M) y apamina (10⁻⁶ M) en segmentos de arteria ilíaca de los tres grupos de estudio previamente contraídos con serotonina. (*) p<0,05 comparado con el control.

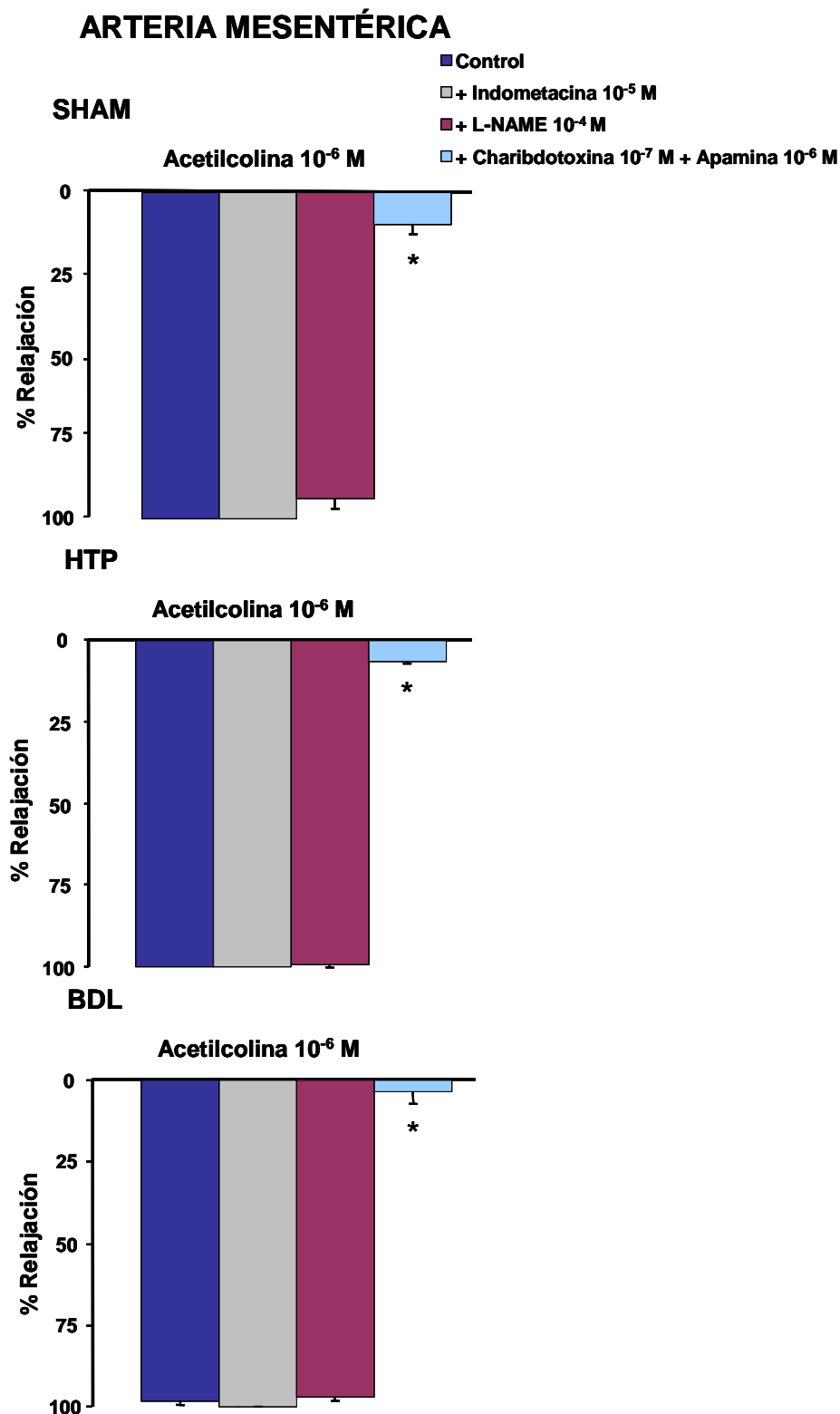


Figura 23. Respuesta a la acetilcolina (10^{-6} M) en ausencia (control) y en presencia de indometacina (10^{-5} M), de indometacina más L-NAME (10^{-4} M) y de indometacina más L-NAME más charibdotoxina (10^{-7} M) y apamina (10^{-6} M) en segmentos de arteria mesentérica de los tres grupos de estudio previamente contraídos con noradrenalina. (*) $p < 0,05$ comparado con el control.

2.3 Estudio de la liberación inducida de NO

Efecto de los inhibidores de la NOS sobre la relajación inducida por acetilcolina

Uno de los objetivos del presente estudio es determinar el grado de participación del NO en el control del tono basal y en la relajación dependiente del endotelio en los dos territorios vasculares estudiados y en establecer posibles diferencias entre los grupos de estudio, SHAM, HTP y BDL. Puesto que el ADMA es un inhibidor endógeno de la NOS y puede ser metabolizado por la pared vascular, se compararon los efectos inhibidores del ADMA con los del L-NAME, un inhibidor de la NOS que no puede ser degradado por la pared vascular.

Arteria Iliaca

En segmentos arteriales incubados con indometacina (10^{-5} M) para inhibir la síntesis de prostaglandinas y contraídos con serotonina (50-75% de la contracción al KCl 60 mM), el L-NAME (3×10^{-4} M) produjo una inhibición significativa de la relajación inducida por la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-6} M) (Tabla 9, Figura 24). La inhibición de la respuesta máxima a la acetilcolina inducida por el L-NAME fue similar en segmentos de los grupos SHAM, HTP y BDL, $71 \pm 5\%$, $74 \pm 3\%$ y $69 \pm 7\%$, respectivamente.

Al realizar curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-6} M) en presencia de ADMA (3×10^{-4} M) se observaron diferentes efectos inhibidores dependiendo del grupo de estudio. En segmentos de arteria iliaca procedentes del grupo SHAM, ADMA (3×10^{-4} M) produjo un desplazamiento significativo de la curva concentración-respuesta a la acetilcolina hacia la derecha de unas 15 veces y una inhibición del $25 \pm 6\%$ del efecto máximo (Tabla 9, Figura 24). En segmentos procedentes de los grupos HTP y BDL, ADMA produjo un desplazamiento similar, aproximadamente de 3 veces, hacia la derecha de la curva concentración-respuesta a la acetilcolina. En

segmentos arteriales procedentes del grupo BDL, ADMA no modificó la respuesta relajante máxima a la acetilcolina pero inhibió significativamente un $26\pm 9\%$, la respuesta máxima a la acetilcolina en segmentos procedentes del grupo HTP.

El distinto efecto inhibitor del ADMA en los diferentes grupos de estudio, probablemente esté relacionado con una alteración en el metabolismo del ADMA por las DDAHs en la pared vascular de la arteria ilíaca.

Tabla 9. Valores medios de la concentración eficaz 50 (CE_{50}), su intervalo de confianza del 95% y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.) de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos de **arteria ilíaca** en ausencia (control) o en presencia de ADMA (3×10^{-4} M) o L-NAME (3×10^{-4} M).

Acetilcolina	n	CE ₅₀ (M)	E _{max} \pm e.e. (% relajación)
		Intervalo de Confianza 95 %	
SHAM			
CONTROL	8	1,2x 10 ⁻⁸ (7,4 x 10 ⁻⁹ -2,0 x 10 ⁻⁸)	83 \pm 2
ADMA 3x10 ⁻⁴ M	8	1,8x 10 ⁻⁷ (5,2 x 10 ⁻⁸ -5,9 x 10 ⁻⁷)**	63 \pm 6**
L-NAME 3x10 ⁻⁴ M	8	---	12 \pm 5** [#]
HTP			
CONTROL	7	1,5x 10 ⁻⁸ (9,0 x 10 ⁻⁹ -2,6 x 10 ⁻⁸)	87 \pm 3
ADMA 3x10 ⁻⁴ M	8	4,3x 10 ⁻⁸ (2,8 x 10 ⁻⁸ -6,6 x 10 ⁻⁸)*	66 \pm 9*
L-NAME 3x10 ⁻⁴ M	8	---	13 \pm 3** [#]
BDL			
CONTROL	9	1,9x 10 ⁻⁸ (1,3 x 10 ⁻⁸ -2,7 x 10 ⁻⁸)	85 \pm 2
ADMA 3x10 ⁻⁴ M	9	4,8x 10 ⁻⁸ (4,2 x 10 ⁻⁸ -5,6 x 10 ⁻⁸)*	86 \pm 5
L-NAME 3x10 ⁻⁴ M	8	---	16 \pm 7** [#]

(*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,001$ con respecto a los valores del grupo control y ([#]) $p < 0,001$ con respecto al grupo tratado con ADMA (3×10^{-4} M). n= número de ratas.

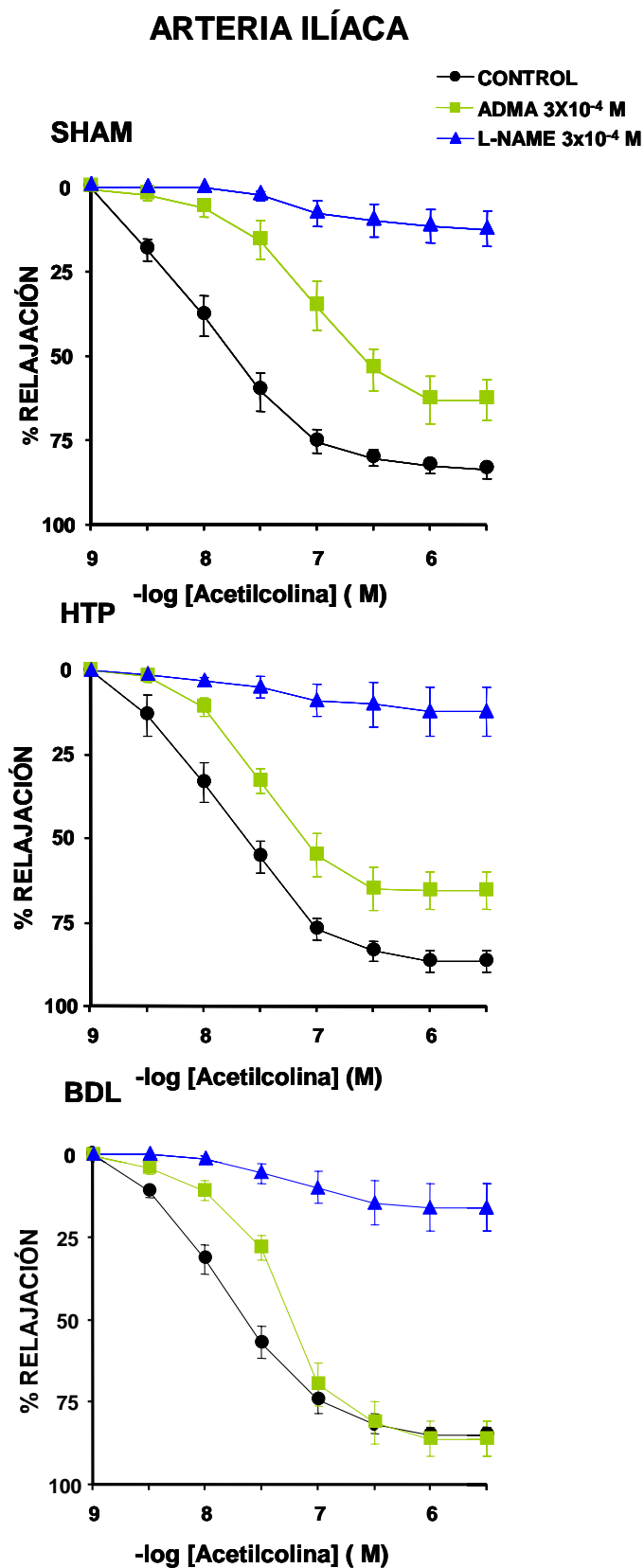


Figura 24. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos de **arteria ilíaca** de los tres grupos de estudio en ausencia (control) o presencia de ADMA (3×10^{-4} M) o L-NAME (3×10^{-4} M).

Arteria Mesentérica

Al realizar las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-6} M) en segmentos de arteria mesentérica incubados con L-NAME (3×10^{-4} M) no se modificó la CE_{50} en ningún grupo de estudio (Tabla 10, Figura 25). La respuesta relajante máxima a la acetilcolina en presencia de L-NAME en segmentos arteriales de los grupos HTP y BDL no se observó ningún cambio. Sin embargo, el grupo SHAM experimentó una inhibición significativa del $8 \pm 4\%$ de la respuesta máxima.

La presencia de ADMA (3×10^{-4} M) no modificó de forma significativa las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-6} M) en segmentos de arteria mesentérica de los grupos SHAM, HTP y BDL (Tabla 10, Figura 25).

Los resultados indicarían una escasa o nula participación del NO en la relajación inducida por la acetilcolina en ramas de segundo y tercer orden de arteria mesentérica. En segmentos procedentes del grupo SHAM la relajación mediada por NO que no se observa en los grupos HTP o BDL sería compensada por una mayor participación del EDHF, factor endotelial que contribuiría en mayor medida en la relajación a la acetilcolina.

Tabla 10. Valores medios de la concentración eficaz 50 (CE_{50}), su intervalo de confianza del 95 % y del efecto máximo (E_{max}) \pm error estándar (e.e.) de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos de **arteria mesentérica** en ausencia (control) o en presencia de ADMA (3×10^{-4} M) o L-NAME (3×10^{-4} M).

Acetilcolina	n	CE ₅₀ (M)	E _{max} \pm e.e.
		Intervalo de Confianza 95 %	(% relajación)
SHAM			
CONTROL	9	8,0x 10 ⁻⁹ (6,2 x 10 ⁻⁹ -1,0 x 10 ⁻⁸)	100
ADMA 3x10 ⁻⁴ M	7	6,2x 10 ⁻⁹ (3,0 x 10 ⁻⁹ -1,3 x 10 ⁻⁸)	99 \pm 1
L-NAME 3x10 ⁻⁴ M	7	1,1 x 10 ⁻⁸ (7,9 x 10 ⁻⁹ -1,5 x 10 ⁻⁸)	92 \pm 4**
HTP			
CONTROL	8	9,2x 10 ⁻⁹ (5,8 x 10 ⁻⁹ -1,5 x 10 ⁻⁸)	100
ADMA 3x10 ⁻⁴ M	7	6,0x 10 ⁻⁹ (3,0 x 10 ⁻⁹ -1,2 x 10 ⁻⁸)	100
L-NAME 3x10 ⁻⁴ M	7	1,0x 10 ⁻⁸ (6,5 x 10 ⁻⁹ -1,6 x 10 ⁻⁸)	99 \pm 1
BDL			
CONTROL	11	8,8x 10 ⁻⁹ (5,7 x 10 ⁻⁹ -1,3 x 10 ⁻⁸)	98 \pm 1
ADMA 3x10 ⁻⁴ M	7	9,1x 10 ⁻⁹ (6,3 x 10 ⁻⁹ -1,3 x 10 ⁻⁸)	99 \pm 1
L-NAME 3x10 ⁻⁴ M	8	1,4x 10 ⁻⁸ (3,7 x 10 ⁻¹⁰ -5,1 x 10 ⁻⁷)	97 \pm 1

(**)p<0,01 con respecto a los valores del grupo control. n= número de ratas.

ARTERIA MESENTÉRICA

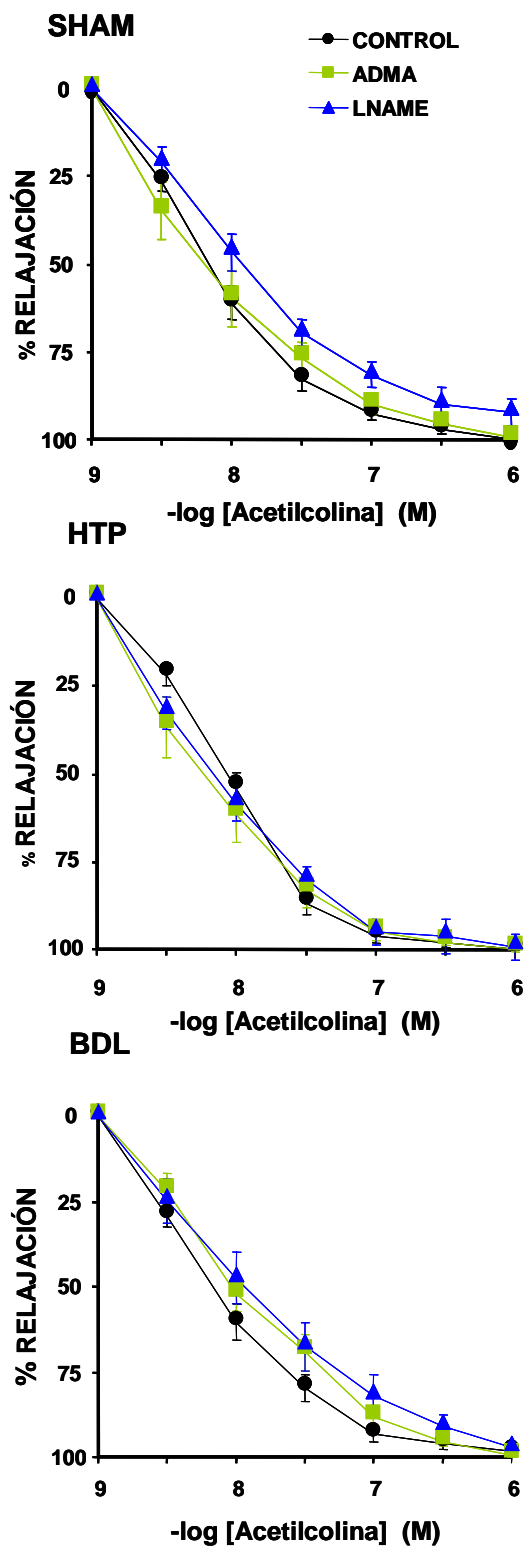


Figura 25. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos de **arteria mesentérica** de los tres grupos de estudio en ausencia (control) o presencia de ADMA (3×10^{-4} M) o L-NAME (3×10^{-4} M).

2.4 Estudio de la liberación basal de NO

Efecto contráctil de los inhibidores de la NOS

En segmentos vasculares con endotelio y en presencia de indometacina (10^{-5} M) y de un tono activo (aproximadamente 15-25% de la contracción máxima al KCl) inducido con serotonina en el caso de la arteria ilíaca o con noradrenalina en el caso de la arteria mesentérica, se realizaron curvas concentración-respuesta al L-NAME (10^{-6} - 10^{-3} M) o al ADMA (10^{-6} - 10^{-3} M).

Arteria ilíaca

En estas condiciones, L-NAME (10^{-6} - 10^{-3} M) y ADMA (10^{-6} - 10^{-3} M) produjeron contracción dependiente de la concentración en segmentos de arteria ilíaca. La CE_{50} y el efecto máximo de las curvas concentración-respuesta al L-NAME fueron similares ($p>0,05$) en segmentos de los tres grupos de estudio (Tabla 11, Figura 26).

Cuando se comparó la respuesta al ADMA (10^{-6} - 10^{-3} M) de segmentos de arteria ilíaca de los tres grupos estudiados no se observaron cambios significativos ni en la sensibilidad, expresada en términos de CE_{50} , ni en el efecto máximo alcanzado (Tabla 11, Figura 26).

En segmentos de arteria ilíaca de los tres grupos de estudio, el efecto máximo alcanzado por ADMA y L-NAME fue similar ($p>0,05$) (Tabla 11, Figura 27). Sin embargo, la CE_{50} del L-NAME fue significativamente menor que la del ADMA tanto en segmentos del grupo SHAM, HTP como BDL, indicando una mayor sensibilidad de la NOS al L-NAME.

En presencia de L-arginina (10^{-3} M) la adición de L-NAME (10^{-6} – 10^{-3} M) o ADMA (10^{-6} – 10^{-3} M) no produjo contracción en segmentos de arteria ilíaca de los tres grupos estudiados (Figura 27).

Tabla 11. Valores de concentración eficaz 50 (CE₅₀), su intervalo de confianza del 95% y del efecto máximo (E_{max}) ± error estándar (e.e.) de las curvas concentración-respuesta al L-NAME o ADMA en segmentos de **arteria iliaca** previamente incubados con indometacina (10⁻⁵ M) y precontraídos con serotonina (15-25% de la contracción máxima al KCl).

	<i>n</i>	CE ₅₀ (M) Intervalo de confianza 95 %	E _{max} ± e.e. (mg)
SHAM			
L-NAME	8	7,3x 10 ⁻⁶ (4,1 x 10 ⁻⁶ -1,3 x 10 ⁻⁵)	430 ± 44
ADMA	8	1,2 x 10 ⁻⁴ (7,1 x 10 ⁻⁵ -2,1 x 10 ⁻⁴) ^{##}	389 ± 77
HTP			
L-NAME	10	5,3x 10 ⁻⁶ (2,9 x 10 ⁻⁶ -9,6 x 10 ⁻⁶)	396 ± 72
ADMA	10	1,3 x 10 ⁻⁴ (1,1 x 10 ⁻⁴ -1,6 x 10 ⁻⁴) ^{##}	425 ± 50
BDL			
L-NAME	6	5,2x 10 ⁻⁶ (3,8 x 10 ⁻⁶ -7,3 x 10 ⁻⁶)	439 ± 61
ADMA	10	1,5 x 10 ⁻⁴ (1,0 x 10 ⁻⁴ -2,3 x 10 ⁻⁴) ^{##}	460 ± 66

(^{##})p<0,01 con respecto a los valores de cada grupo de L-NAME.

ARTERIA ILÍACA

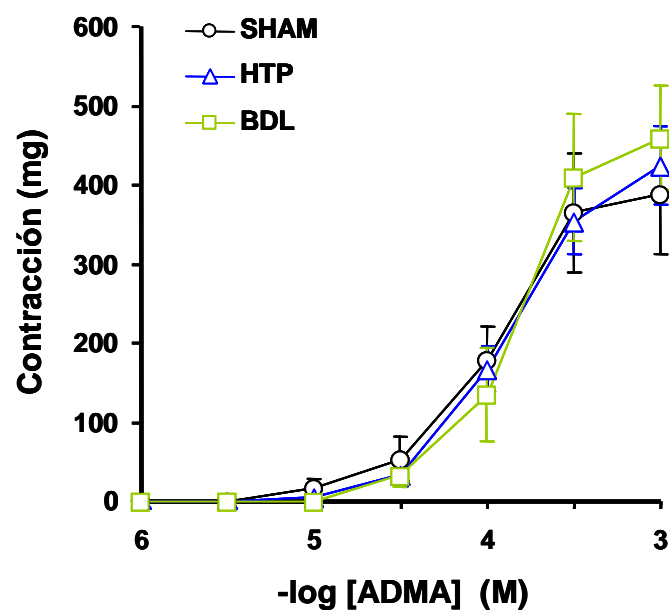
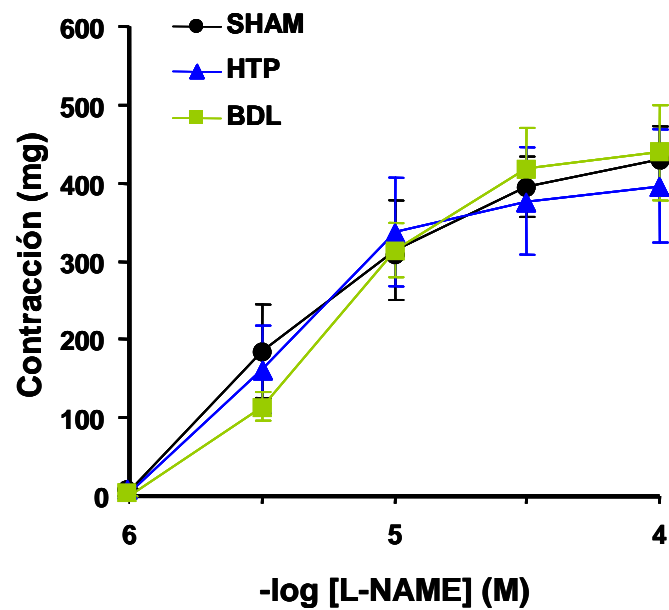


Figura 26. (A) Curvas concentración-respuesta al L-NAME y (B) ADMA en segmentos de **arteria ilíaca** de los grupos SHAM, HTP y BDL previamente incubados con indometacina (10^{-5} M) y contraídos con serotonina (15-25% de la contracción máxima al KCl).

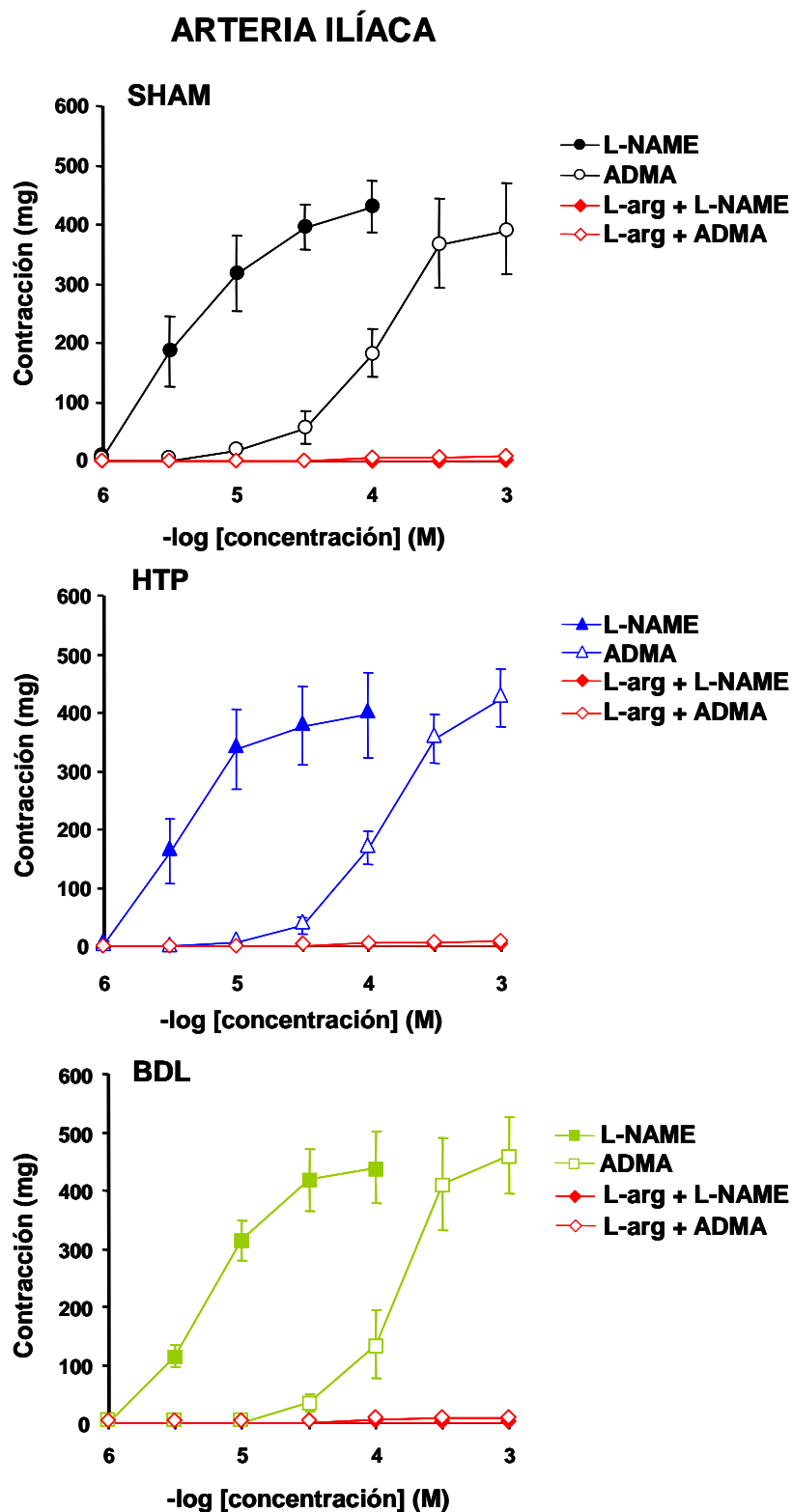


Figura 27. Comparación del efecto contráctil producido por L-NAME y ADMA en segmentos de **arteria ilíaca** de cada uno de los grupos de estudio. Los segmentos fueron previamente incubados con indometacina (10^{-5} M) y contraídos con serotonina (15-25% de la contracción máxima al KCl).

Arteria Mesentérica

El L-NAME (10^{-6} - 10^{-3} M) produjo contracción dependiente de la concentración en segmentos de arteria mesenterica de los tres grupos estudiados. La CE_{50} de las curvas concentración-respuesta fue similar en los grupos SHAM, HTP y BDL (Tabla 12, Figura 28). Sin embargo, el efecto máximo alcanzado fue significativamente mayor en segmentos procedentes de los grupos HTP y BDL cuando se compara con el alcanzado por segmentos del grupo SHAM. Estos resultados sugieren una mayor participación del NO en el control del tono basal de las arterias mesentéricas en estas patologías.

El efecto máximo alcanzado por las curvas concentración-respuesta al ADMA (10^{-6} - 10^{-3} M) fue significativamente mayor en segmentos de arteria mesenterica de los grupos HTP y BDL que el alcanzado en el grupo SHAM (Tabla 12, Figura 28). Las CE_{50} de las curvas concentración-respuesta fueron similares en segmentos de los grupos HTP y BDL, y estas significativamente mayores cuando se compararon con la CE_{50} de las curvas del grupo SHAM.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el efecto máximo alcanzado por las curvas concentración-respuesta al ADMA y L-NAME en segmentos del grupo SHAM. De igual manera, no se observaron diferencias cuando se compararon los efectos máximos de los dos inhibidores de la NOS en segmentos de los grupos HTP o BDL (Tabla 12, Figura 29).

Los segmentos de arteria mesentérica fueron más sensibles a la inhibición del L-NAME que a la del ADMA. Los segmentos del grupo SHAM fueron aproximadamente 10 veces más sensibles al L-NAME que al ADMA, mientras que los del grupo HTP y BDL fueron 36 y 22 veces, respectivamente (Tabla 12, Figura 29). Esta disminución de la sensibilidad del ADMA en segmentos de arteria mesentérica de los grupos HTP y BDL podría ser debida a que en estas situaciones experimentales exista una mayor degradación del ADMA por las DDAHs presentes en la pared vascular.

Comprobamos que los efectos contráctiles de L-NAME y ADMA estaban mediados por la inhibición de NO mediante la incubación previa con L-arginina 10^{-3} M, precursor de la síntesis de NO. En estas condiciones, L-NAME y ADMA fueron incapaces de incrementar el tono basal inducido con noradrenalina en segmentos de arteria mesentérica de los tres grupos de estudio (Figura 29).

Tabla 12. Valores de concentración eficaz 50 (CE₅₀M), su intervalo de confianza del 95% y del efecto máximo \pm error estándar (e.e.) de las curvas concentración-respuesta al L-NAME y ADMA en ramas de tercer orden de **arteria mesentérica**, previamente incubados con indometacina (10^{-5} M) y contraídos con noradrenalina (15-25% de la contracción máxima al KCl).

	<i>n</i>	CE ₅₀ (M) Intervalo de Confianza 95 %	E _{max} \pm e.e. (mg)
SHAM			
L-NAME	6	4,0x 10 ⁻⁶ (2,6 x 10 ⁻⁶ -6,1 x 10 ⁻⁶)	385 \pm 74
ADMA	7	3,8x 10 ⁻⁵ (3,1 x 10 ⁻⁵ -4,8 x 10 ⁻⁵) [#]	389 \pm 47
HTP			
L-NAME	7	3,9 x 10 ⁻⁶ (2,8 x 10 ⁻⁶ -5,4 x 10 ⁻⁶)	660 \pm 95*
ADMA	9	1,4 x 10 ⁻⁴ (1,1 x 10 ⁻⁴ -2,1 x 10 ⁻⁴) ^{**#}	688 \pm 44**
BDL			
L-NAME	7	6,3 x 10 ⁻⁶ (3,0 x 10 ⁻⁶ -1,3 x 10 ⁻⁵)	664 \pm 93*
ADMA	10	1,4 x 10 ⁻⁴ (1,0 x 10 ⁻⁴ -2,0 x 10 ⁻⁴) ^{**#}	626 \pm 6**

(*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$ con respecto a los valores del grupo SHAM y ([#]) $p < 0,05$ con respecto a los valores de cada grupo de L-NAME. *n*= número de ratas

ARTERIA MESENTÉRICA

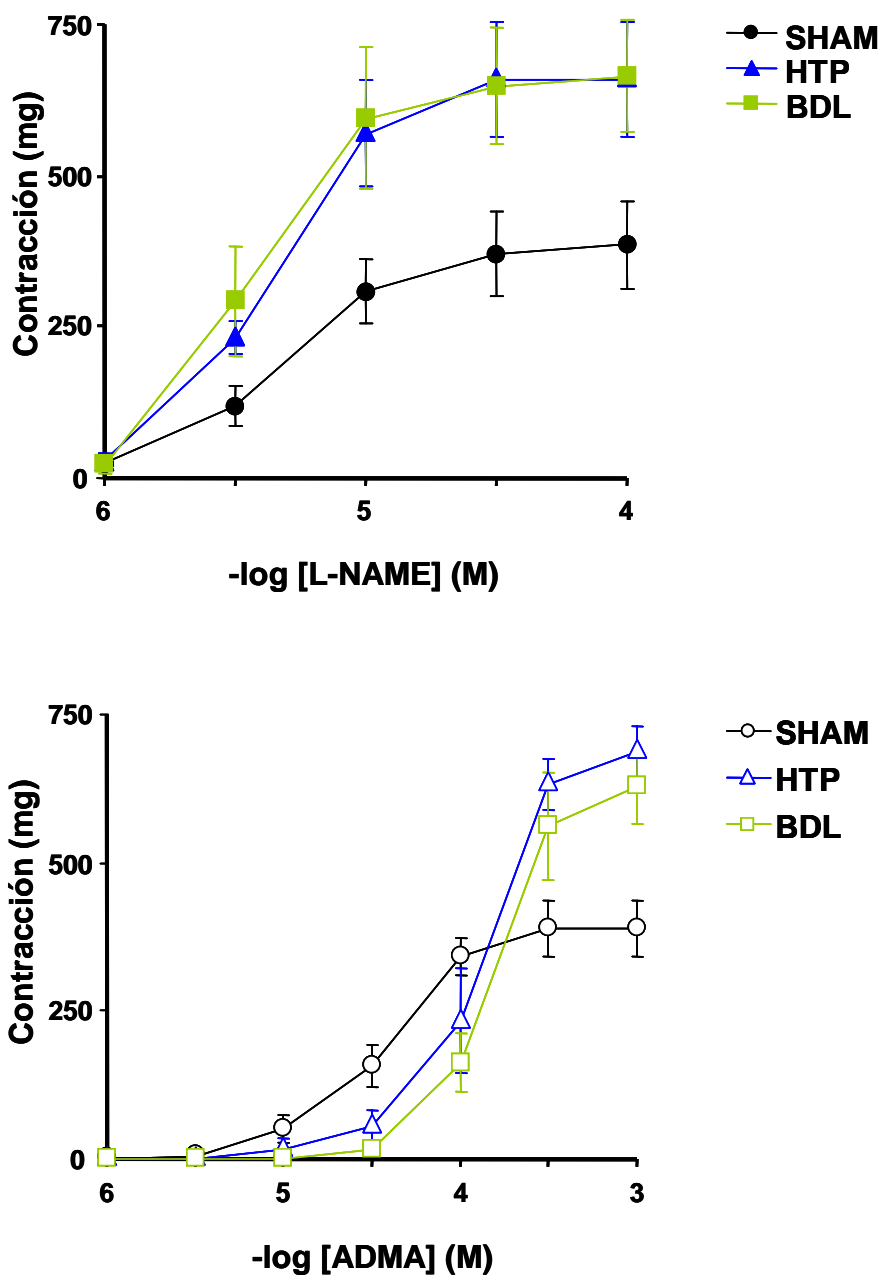


Figura 28. (A) Curvas concentración-respuesta al L-NAME y (B) ADMA en segmentos de arteria mesentérica de los grupos SHAM, HTP y BDL, previamente incubados con indometacina (10^{-5} M) y contraídos con noradrenalina (15-25% de la contracción máxima al KCl).

ARTERIA MESENTÉRICA

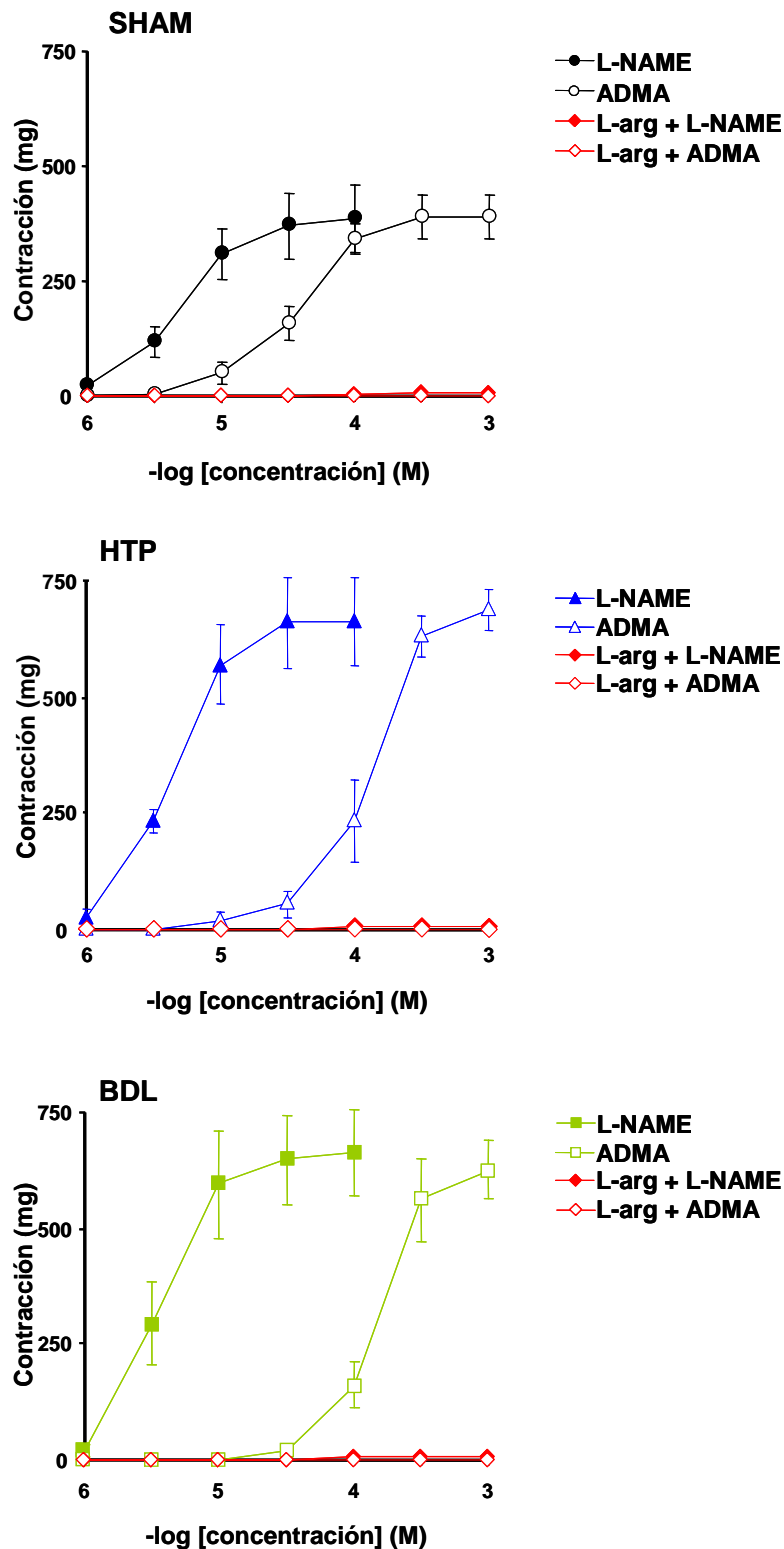


Figura 29. Comparación del efecto contráctil producido por L-NAME y ADMA en segmentos de **arteria mesentérica** de cada uno de los grupos de estudio. Los segmentos fueron previamente incubados con indometacina (10^{-5} M) y contraídos con noradrenalina (15-25% de la contracción máxima al KCl).

3. Determinación de la expresión génica mediante PCR-RT

El estudio de expresión se centró en los genes *eNos* (eNOS), *Ddab-1* (DDAH-1) y *Ddab-2* (DDAH-2) en los tres grupos de estudio. Se utilizaron segmentos de arteria ilíaca y mesentérica, al igual que en el estudio funcional y además se determinó la expresión de dichos genes en hígado.

Arteria Ilíaca

La expresión a nivel de ARNm de la eNOS en segmentos de arteria ilíaca del grupo BDL fue aproximadamente el doble ($p < 0,05$) comparada con los segmentos procedentes del grupo SHAM. Por otra parte, cuando se compararon segmentos de los grupos SHAM e HTP, la expresión de la eNOS disminuyó ($p < 0,05$) un 37% en segmentos del grupo HTP (Figura 30). La DDAH-1 en arteria ilíaca del grupo BDL se sobreexpresó 2,60 veces ($p < 0,05$), mientras que en ratas HTP se infraexpresó ($p < 0,05$) un 30% comparados ambos grupos con el grupo SHAM (Figura 30). En cambio, la expresión de DDAH-2 no sufrió ningún cambio significativo en los tres grupos de estudio (Figura 30).

Arteria Mesentérica

A nivel esplácnico realizamos el estudio en segmentos de arteria mesentérica y observamos que la expresión del gen de la eNOS aumenta casi el doble en los grupos HTP y BDL al compararse con el grupo SHAM (Figura 31).

Al analizar los niveles de expresión génica de las dos isoformas de DDAHs observamos que ambas aumentaron su expresión en la arteria mesentérica de los grupos BDL y HTP cuando se compararon con segmentos procedentes del grupo SHAM (Tabla 13, Figura 31). La expresión de la

DDAH-1 para el grupo HTP fue aproximadamente el triple y para el grupo BDL este aumentó fue hasta 7 veces más que la del grupo SHAM (Tabla 13, Figura 31). Resultados similares se obtuvieron cuando se estudió la expresión de la DDAH-2, el grupo HTP y BDL sobreexpresaron aproximadamente 2 y 3,5 veces dicho gen cuando se compararon con segmentos procedentes del grupo SHAM (Tabla 13, Figura 31).

Tabla 13. Valores de expresión relativa \pm con su error estándar (e.e) en **arteria mesentérica** para los genes DDAH-1 y DDAH-2.

Grupo de estudio (versus SHAM)	<i>n</i>	DDAH-1	DDAH-2
		X veces sobreexpresados	X veces sobreexpresados
HTP	6	3,11 \pm 0,50**	1,94 \pm 0,35*
BDL	8	6,84 \pm 0,96**##	3,95 \pm 0,93*#

(*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$ comparado con el grupo SHAM y (#) $p < 0,05$ y (##) $p < 0,01$ comparado con el grupo HTP. n= número de ratas

Hígado

Los resultados obtenidos mostraron que expresión génica de la eNOS en hígados del grupo BDL fue 3 veces superior a la expresión en hígados procedentes del grupo SHAM o HTP (Tabla 14, Figura 32). La expresión génica de la isoforma DDAH-1 no experimentó cambios significativos en hígados de los grupos BDL ni HTP comparados con el grupo SHAM (Tabla 14, Figura 32).

Mientras que la expresión de la otra isoforma DDAH-2, observamos que en el caso de las ratas BDL se sobreexpresó aproximadamente 13 veces más comparado con los otros dos grupos de estudio. Mientras que en el grupo

de hipertensión portal no se obtuvo ningún cambio en comparación con las ratas control (Tabla 14, Figura 32).

Tabla 14. Valores medios de la expresión relativa \pm error estándar (e.e) en el **hígado** de los tres grupos de estudio para los genes eNOS, DDAH-1 y DDAH-2.

Grupo	n	eNOS	DDAH-1	DDAH-2
SHAM	8	0,82 \pm 0,17	1,14 \pm 0,12	1,09 \pm 0,18
HTP	7	0,83 \pm 0,17	1,08 \pm 0,17	0,84 \pm 0,11
BDL	12	3,21 \pm 0,63**###	0,79 \pm 0,09	13,52 \pm 2,23***###

(**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$ comparado con el grupo SHAM y (###) $p < 0,01$ comparado con el grupo HTP. n= número de ratas

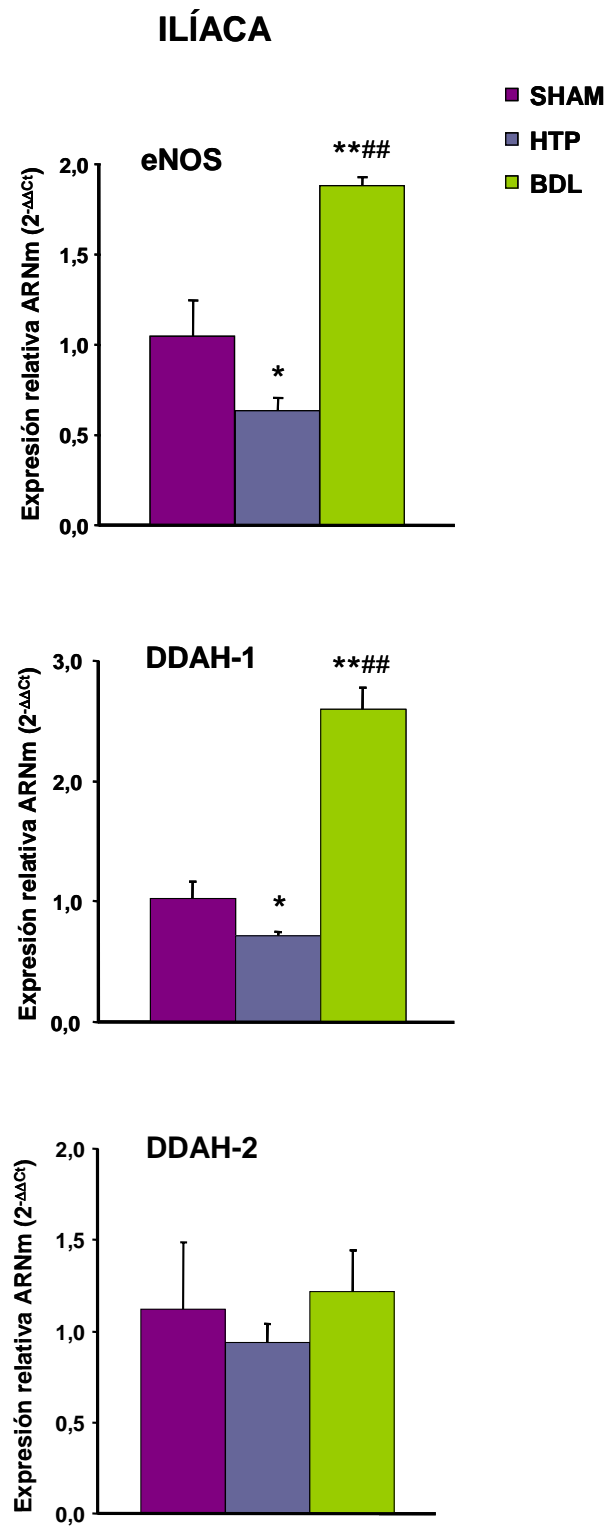


Figura 30. Expresión relativa de ARNm de los genes eNOS, DDAH-1 y DDAH-2 en **arteria iliaca** de los tres grupos de estudio. (*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$ comparado con el control. (***) $p < 0,01$ comparado con el grupo HTP.

MESENTÉRICA

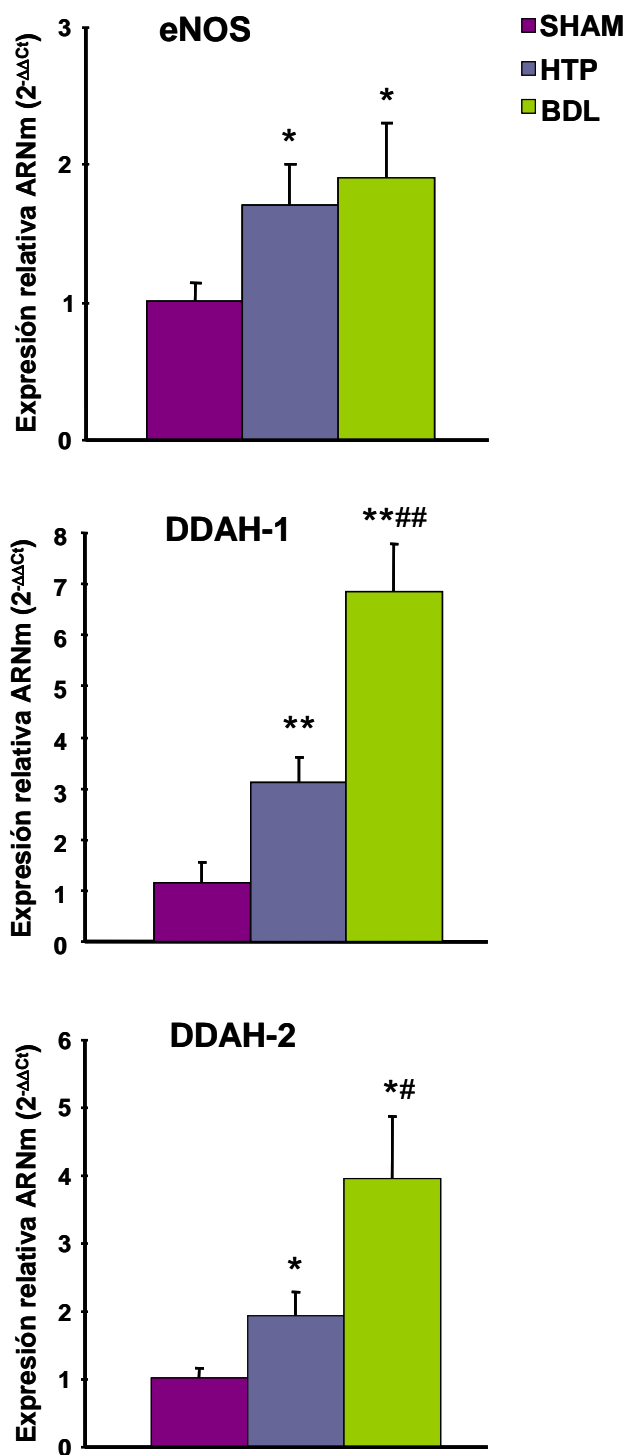


Figura 31. Expresión relativa de ARNm de los genes eNOS, DDAH-1 y DDAH-2 en **arteria mesentérica** de los tres grupos de estudio. (*) $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$ comparado con el control. (#) $p < 0,05$ y (##) $p < 0,01$ comparado con el grupo HTP.

HÍGADO

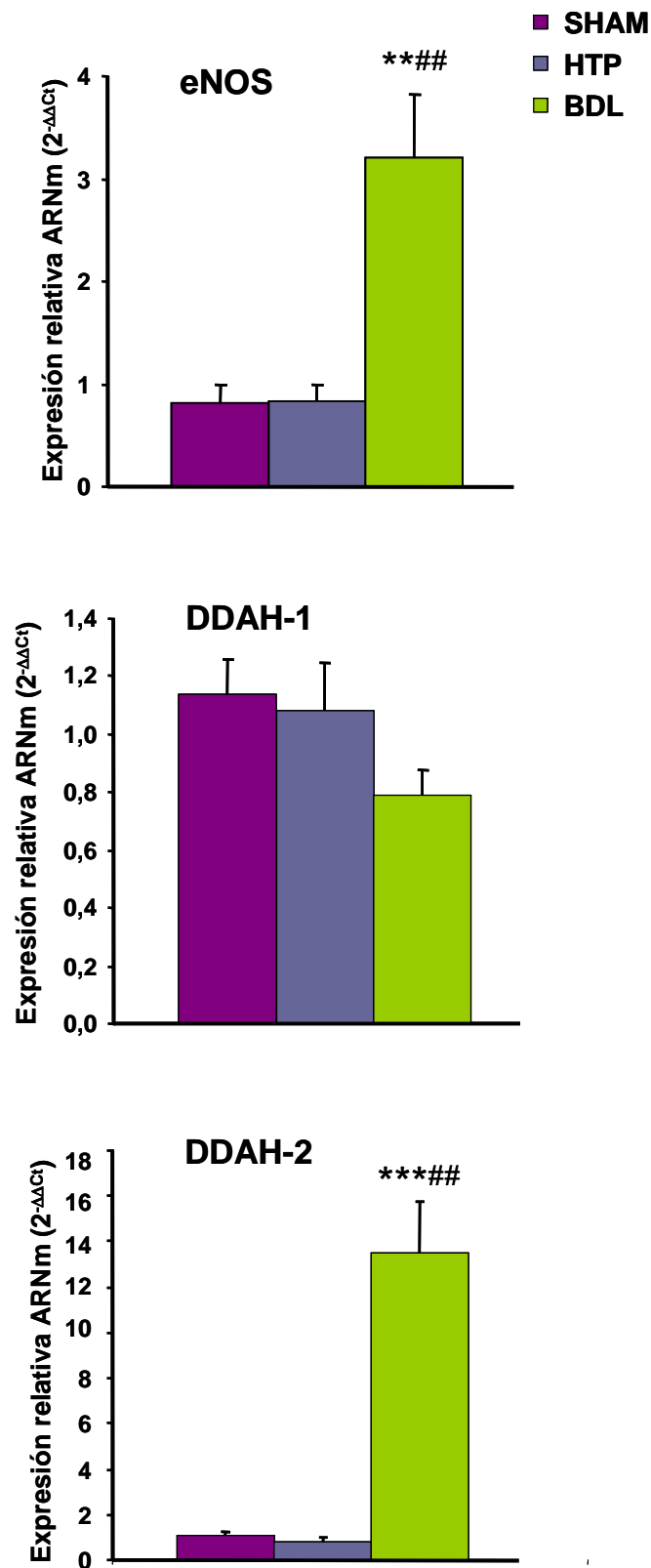


Figura 32. Expresión relativa de ARNm de los genes eNOS, DDAH-1 y DDAH-2 en **hígado** de los tres grupos de estudio. (**) $P < 0,01$ y (***) $P < 0,001$ comparado con el grupo SHAM. (##) $P < 0,01$ comparado con el grupo HTP.

4. Determinación de los niveles de L-arginina y ADMA en el hígado

Al determinar los niveles de L-arginina en homogenados de hígado de ratas de los grupos SHAM y HTP no se observaron cambios significativos. Sin embargo, los niveles de L-arginina disminuyeron en hígados de ratas del grupo BDL cuando se compararon con hígados de los grupos SHAM o HTP (Figura 33).

Los niveles de ADMA fueron similares en hígados de los tres grupos de estudio (Figura 33). Sin embargo, el ratio L-arginina/ADMA fue significativamente menor en hígados del grupo BDL comparado tanto con hígados del grupo SHAM como del grupo HTP (Figura 33).

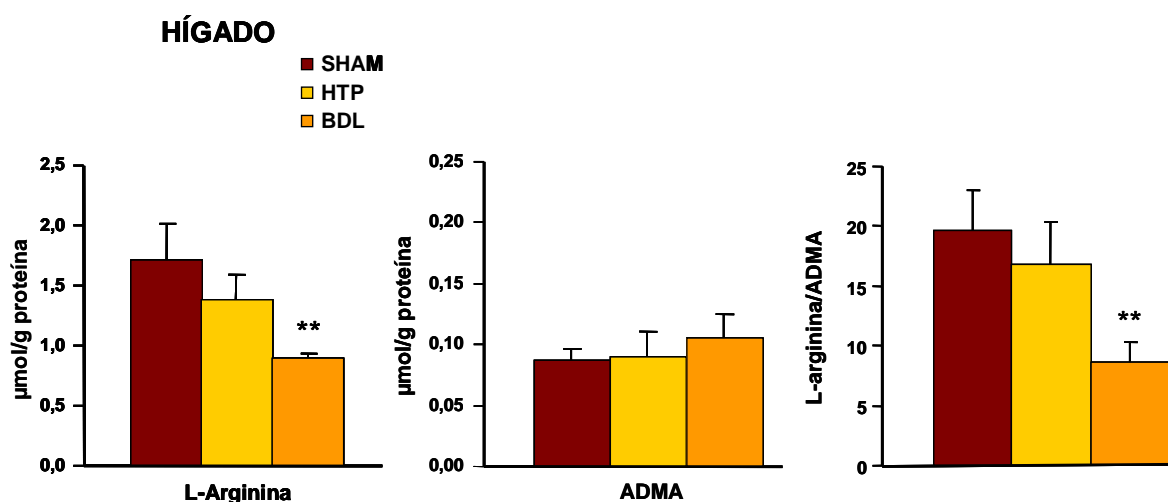


Figura 33. Niveles de L-arginina y ADMA y ratio L-arginina/ADMA en homogenados de hígado de rata de los grupos SHAM, HTP y BDL. (***) $p < 0,01$ comparado con grupo SHAM o HTP. $n = 6$.

Tanto la disminución de la concentración de L-arginina, sustrato de la NOS para la formación de NO, como la disminución del ratio L-arginina/ADMA en hígados del grupo BDL, indicaría una menor producción de NO en el hígado cirrótico.

DISCUSIÓN

Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental

Cualquier experimento *in vitro* relacionado con la respuesta vascular debe ser valorado con cautela cuando se intenta extrapolar a la situación *in vivo*. En el vaso aislado falta la regulación neurohormonal presente en los animales de experimentación. Además, los mecanismos de adaptación que pueden aparecer sólo pueden vislumbrarse en el vaso aislado como manifestaciones circunscritas a la propia pared vascular. Sin embargo, el estudio de la respuesta del vaso aislado constituye uno de los métodos más habituales para conocer los fundamentos de las alteraciones vasculares inducidas por las patologías que se estudian en la presente tesis doctoral.

Dentro de las posibles alteraciones vasculares que podrían encontrarse en la hipertensión portal y en la hipertensión portal asociada a una cirrosis, el presente trabajo se centra en el papel que desempeñan las DDAHs, enzimas encargadas de degradar el ADMA (inhibidor de la producción de NO). Estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación demuestran que en pacientes con cirrosis los niveles plasmáticos de ADMA están elevados.¹⁴⁵ Sin embargo, se desconoce si este incremento está relacionado con una alteración en la actividad de las DDAHs en esta patología. Una disminución de las DDAHs provocaría una menor degradación de ADMA, y por tanto, un acúmulo de este compuesto guanidino. Por otra parte, se ha sugerido que los niveles plasmáticos de ADMA elevados en la cirrosis¹⁴⁴ podrían constituir una posible protección del organismo frente a la producción masiva de NO.¹⁶⁵

También hemos estudiado en la hipertensión portal y cirrosis la expresión génica de eNOS y DDAHs en la arteria ilíaca, en ramas de la arteria mesentérica y en el hígado. Las alteraciones en la expresión génica de estas enzimas podrían contribuir a un mejor conocimiento del sistema DDAH-

ADMA-NOS en la función vascular. No hay que olvidar que los diferentes órganos y los distintos lechos vasculares pueden tener mecanismos reguladores diferentes y la expresión génica podría verse alterada de distinta forma dependiendo del órgano o lecho vascular considerado.

Justificación de los lechos vasculares elegidos

En el presente trabajo hemos estudiado la reactividad y la expresión génica en la arteria ilíaca y la arteria mesentérica de rata. El lecho vascular mesentérico contribuye de forma considerable en la vasodilatación arterial sistémica y es uno de los factores más notables que acompañan a la circulación hiperdinámica en la cirrosis. Es por ello, que la utilización de las ramas de 3^{er} orden de la arteria mesentérica, vaso de resistencia, permite investigar la función de los vasos que se han dilatado durante la cirrosis y contribuyen directamente al desarrollo de la hipertensión portal. La arteria ilíaca se eligió como modelo de vaso grande y de conductancia, para comparar las respuestas vasculares frente a vasos de resistencia. Se ha demostrado que la reactividad vascular puede ser diferente según el calibre de los vasos considerados. Por ejemplo, en la vasoconstricción obtenida con un estímulo con noradrenalina participan diferentes subtipos de receptores adrenérgicos dependiendo del lecho vascular considerado.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹

Respuesta contráctil al KCl en la hipertensión portal y en la cirrosis experimental

El exceso de K⁺ extracelular produce despolarización del músculo liso vascular al impedir la salida de K⁺ del interior celular. La despolarización provocaría la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje y la vasocontracción.¹⁷⁰

En diversas situaciones patológicas, como la insuficiencia renal crónica, la capacidad contráctil del músculo liso está comprometida¹⁷¹ indicando alteraciones en los mecanismos contráctiles independientes de receptor. En la arteria ilíaca de ratas cirróticas la respuesta contráctil al KCl fue similar a la de ratas control. En el grupo de hipertensión portal se observó un aumento significativo del efecto máximo y de la sensibilidad al KCl. Estos resultados indican que la hipertensión portal y la cirrosis afectan de forma opuesta la sensibilidad al KCl, afectando de forma diferente a los mecanismos de contracción vascular independiente de receptor. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos realizados en aorta de rata, donde se demostró un incremento en la respuesta contráctil en ratas con hipertensión portal.¹⁷²

En ramas de arteria mesentérica de ratas cirróticas disminuyó la sensibilidad al KCl, mientras que en los segmentos procedentes de ratas con hipertensión portal se observó un aumento del efecto máximo y de la sensibilidad a este vasoconstrictor. Existen estudios que demuestran que uno de los factores responsables de esa hipocontractilidad es la existencia de una producción masiva de NO en el territorio vascular esplácnico, que se opone a la vasoconstricción independiente de receptor, caso del KCl, o inducida por el estímulo de receptores α -adrenérgicos.¹⁷³ Un estudio reciente en aorta de rata cirrótica, ha puesto de manifiesto la existencia de hipocontractilidad incluso cuando se ha inhibido la NOS, efecto que se ha atribuido a una menor sensibilidad al Ca^{2+} .¹⁷⁴ Una de las razones que podrían explicar este cambio de sensibilidad en la cirrosis es la existencia de un fallo a nivel de la Rho-cinasa. Se ha demostrado una alteración de la Rho-cinasa en la cirrosis que provoca una activación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina favoreciendo la relajación muscular.^{174, 175}

Respuesta relajante a la acetilcolina en la hipertensión portal y en la cirrosis experimental

Con la finalidad de determinar si en la hipertensión portal y en la cirrosis existe alguna alteración de la respuesta relajante dependiente del endotelio se utilizó la acetilcolina, sustancia que activa los receptores muscarínicos localizados en el endotelio produciendo vasodilatación.¹⁷⁶ Por lo tanto, la destrucción del endotelio implica la desaparición de esta relajación. La unión de la acetilcolina a los receptores muscarínicos produce relajación¹⁷⁶ que puede ser debida a la activación de la ciclooxigenasa (COX), óxido nítrico sintasa o a la liberación del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). La activación de la COX produce liberación de sustancias prostanoideas,¹⁷⁷ y la activación de la NOS produce NO.^{176, 178} Tanto las prostaglandinas relajantes^{179, 180} como el NO¹⁸¹ pueden ser responsables de la relajación inducida por acetilcolina. Diversos estudios han puesto de manifiesto la persistencia de relajación a la acetilcolina estando inhibida la formación de prostaciclina y de NO, confirmando la existencia de un tercer factor relajante endotelial.²⁸ Este factor produce hiperpolarización de la membrana de las células del músculo liso, por lo que se le ha denominado EDHF.³⁰ La participación del EDHF en la relajación endotelio-dependiente es mayor a medida que disminuye el tamaño del vaso.³²

En la arteria ilíaca y ramas de la arteria mesentérica la respuesta relajante dependiente del endotelio a la acetilcolina no se modificó por la hipertensión portal ni por la cirrosis. Estudios previos también demuestran que estas patologías no modifican la respuesta a la acetilcolina.^{182, 183} Aunque no se modifique la relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina en los dos lechos vasculares estudiados, estas patologías podrían alterar la proporción en que participan los distintos factores relajantes derivados del endotelio.

En arteria ilíaca la inhibición de la COX no modificó la relajación dependiente del endotelio inducida por la acetilcolina, descartando la participación de prostaciclina en dicha respuesta. La inhibición de la NOS produjo una gran inhibición de la relajación indicando que el NO es el principal factor relajante derivado del endotelio. La relajación remanente fue inhibida al bloquear los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , efecto atribuido al EDHF. La hipertensión portal o la cirrosis no modificaron la contribución de cada uno de los factores relajantes derivados del endotelio en respuesta a la acetilcolina.

En ramas de la arteria mesentérica, al igual que en la arteria ilíaca, hay una escasa o nula participación de la prostaciclina en la respuesta a la acetilcolina. La inhibición de la NOS disminuyó el efecto máximo a la acetilcolina en el grupo control indicando una pequeña participación del NO en dicha respuesta. Sin embargo, la inhibición de la NOS en la hipertensión portal y la cirrosis no produjo ningún efecto, probablemente debido a que en estas situaciones patológicas se produce un incremento de los efectos producidos por el EDHF a través de la activación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} .

La acetilcolina hiperpolariza las células endoteliales e incrementa la concentración de K^+ extracelular.¹⁸⁴ La relajación se asociada con hiperpolarización de las células de músculo liso vascular a través de la activación de canales de K^+ .^{185, 186} En ramas de arteria mesentérica de ratas con hipertensión portal, cirrosis y controles, el bloqueo simultaneo de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de pequeña, intermedia y gran conductancia inhibió la relajación a la acetilcolina. Estudios previos indican que el bloqueo de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} inhibe la hiperpolarización de las células de músculo liso y la relajación.^{187, 188}

Algunos estudios previos han demostrado que la respuesta relajante a la acetilcolina no difiere entre vasos cirróticos y normales.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Por el contrario,

otros estudios *in vivo* muestran un incremento en la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina en arteria mesentérica de ratas con hipertensión portal.^{27, 192} Las discrepancias entre nuestro estudio y estudios previos podrían atribuirse a las diferentes condiciones experimentales, diseño experimental y territorios vasculares.

En conjunto, nuestros resultados muestran que la relajación a la acetilcolina está mediada por el NO en la arteria ilíaca, mientras que el ramas de la arteria mesentérica está mediada por el EDHF a través de la activación de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ poniendo de nuevo de manifiesto los diferentes mecanismos que pueden provocar la relajación a la acetilcolina dependiendo del lecho vascular considerado.

Participación del NO y de las DDAHs en la respuesta relajante inducida por acetilcolina

Para valorar la participación de NO y de forma indirecta el papel de las DDAHs utilizamos el L-NAME y el ADMA, en los dos lechos vasculares de estudio. El L-NAME es un inhibidor de la NOS que no se degrada por la acción de las DDAHs. La concentración utilizada de L-NAME inhibió completamente la NOS^{193, 194} y sus efectos indican que proporción de la respuesta a la acetilcolina está mediada por el NO. El ADMA es un inhibidor endógeno de la NOS¹¹⁰ y se degrada por acción de las DDAHs.¹⁹⁵ La diferencia de los efectos del ADMA en los diferentes grupos de estudio podría indicar de forma indirecta cambios en la actividad de las DDAHs.

En la arteria ilíaca la relajación a la acetilcolina dependiente del endotelio está mediada principalmente por el NO. El ADMA inhibió la respuesta relajante máxima a la acetilcolina en el grupo con hipertensión portal y en el control. Sin embargo, no modificó la respuesta relajante máxima de la arteria ilíaca del grupo cirrótico. Los menores efectos inhibidores del ADMA en vasos cirróticos podrían ser debidos a una mayor degradación de éste, por

un incremento en actividad de las DDAHs, efectos que no se observan en la hipertensión portal prehepática.

En el territorio esplácnico el ADMA no produjo ningún efecto sobre la relajación inducida por acetilcolina en ninguno de los tres grupos de estudio. El principal factor relajante derivado del endotelio en respuesta a la acetilcolina en ramas de la arteria mesentérica es el EDHF y el NO posee una escasa o nula participación. El escaso efecto del ADMA sobre los relajantes dependientes del endotelio en el territorio esplácnico podría contribuir a la excesiva vasodilatación de este lecho vascular en la hipertensión portal y cirrosis. Aunque se han demostrado niveles plasmáticos elevados de ADMA en ratas cirróticas¹⁹⁶, su escaso efecto sobre la relajación dependiente del endotelio no podría contrarrestar la excesiva vasodilatación esplácnica.

Participación del NO y de las DDAHs en el tono vascular

Este grupo de experimentos se realizó con el fin de comprobar la liberación basal de NO y de una forma indirecta la participación de las DDAHs mediante la valoración de los efectos del ADMA.

El ADMA inhibe la liberación basal de NO e induce contracción en la arteria cerebral media¹⁰⁹, mamaria, radial¹⁹⁷ y arteria renal.¹⁹⁸ Nuestros resultados demuestran que L-NAME y ADMA producen contracción dependiente de la concentración en arteria ilíaca y mesentérica de los tres grupos de estudio. Estas contracciones son dependientes del endotelio y se revirtieron totalmente en presencia de L-arginina, sustrato de la NOS para la formación de NO. En todos los casos los segmentos vasculares fueron más sensibles al L-NAME que al ADMA. El L-NAME requiere la hidrólisis del metil éster por las esterasas celulares para inhibir la NOS.¹⁹⁹ En aorta de rata el L-NAME inhibe los efectos de la acetilcolina con una CE₅₀ de 0,54 μM.^{200, 201} La CI₅₀ del ADMA sobre la actividad de la NOS es del orden de 2-5 μM.¹¹⁰ El

ADMA es metabolizado por las DDAHs^{147, 202} y un incremento o disminución en la actividad de estas enzimas podría producir alteraciones en los niveles de ADMA y cambios en la CI_{50} .

La síntesis de NO puede ser inhibida por L-NAME y ADMA, inhibidores competitivos de la NOS.^{110, 203} Por tanto, diferencias en la síntesis basal de NO se reflejarán en el nivel de contracción en respuesta al L-NAME y ADMA.²⁰⁴

En la arteria ilíaca el efecto máximo alcanzado por ADMA o L-NAME es el mismo en los tres grupos de estudio, indicando que la liberación basal de NO en nuestras condiciones experimentales no se ve afectada por la hipertensión portal o cirrosis. Estudios previos demuestran un exceso de NO en la circulación esplácnica durante la hipertensión portal y cirrosis.^{13, 205, 206} Nuestros experimentos en ramas de arteria mesentérica de ratas con hipertensión portal y cirrosis, demuestran que el ADMA y L-NAME producen potentes contracciones que son mucho mayores que las obtenidas en el grupo control, indicando una gran participación del NO en el tono basal del lecho esplácnico durante la hipertensión portal y cirrosis. Estos resultados contrastan con los escasos o nulos efectos de estos inhibidores sobre la relajación dependiente de endotelio inducida por la acetilcolina (*discutidos en el apartado anterior*). Por tanto, la inhibición de la NOS en ramas de arteria mesentérica de ratas con hipertensión portal o cirrosis produciría importantes efectos sobre el tono basal, dependiente fundamentalmente de NO, pero no sobre la relajación dependiente del endotelio, dependiente del EDHF.

En ramas de arteria mesentérica de ratas con hipertensión portal y cirrosis se produjo una disminución en la sensibilidad de los efectos del ADMA sobre la liberación basal de NO. Esta menor sensibilidad podría ser debida a una mayor degradación del ADMA por las DDAHs en este lecho vascular y por tanto un menor efecto inhibitor sobre la NOS. Estos resultados demuestran el importante papel que las DDAHs podrían tener en

la síntesis de NO en el lecho esplácnico y en el control de las resistencias periféricas. El incremento de la actividad de las DDAHs durante la hipertensión portal y cirrosis, provocaría una disminución del ADMA y una mayor síntesis de NO que provocaría una excesiva vasodilatación del territorio esplácnico.

Estudio de la expresión génica y medición de niveles de L-arginina y ADMA hepáticos.

El estudio de la expresión génica nos puede ayudar a comprender algunas de las alteraciones producidas por la hipertensión portal y cirrosis que no son tan evidentes cuando se estudian a nivel funcional como cambios en la expresión proteica o modificaciones postranscripcionales.

Nuestros resultados en arteria ilíaca demuestran que la hipertensión portal induce una infraexpresión génica de la eNOS. Sin embargo, en el grupo con cirrosis observamos una sobreexpresión de la eNOS. Estos resultados coinciden con estudios previos en aorta de rata con cirrosis que demuestran un aumento de la expresión de eNOS e incremento de los niveles de GMPc.^{81, 207} El incremento de la eNOS se atribuye al aumento de flujo sanguíneo que estimula la NOS endotelial.^{104, 208, 209} Además del aumento en la expresión de la eNOS a nivel génico se ha podido comprobar un aumento a nivel proteico.²⁰⁹ El aumento del *shear stress* provoca el incremento de la expresión génica de eNOS en ratas cirróticas.^{104, 208, 209} Xiao y colaboradores¹⁰⁴ demostraron que a medida que aumentaba el *shear stress* aumentaba el ratio eNOS/GAPDH.

Nuestros experimentos en ramas de arteria mesentérica demuestran que la eNOS se sobreexpresa en la hipertensión portal y en la cirrosis. Estudios previos realizados en ratas cirróticas demuestran un incremento de la eNOS a nivel génico²¹⁰ y proteico^{211, 212} en la circulación esplácnica. La gravedad de la hipertensión portal parece ser un factor importante que estimula la activación

de la eNOS en la circulación esplácnica.²¹³ Utilizando un modelo de hipertensión portal, ligadura parcial de la vena porta, se ha estudiado la relación entre la presión portal y el desarrollo del estado circulatorio hiperdinámico. El grado de presión portal se asocia de forma significativa con la severidad del estado circulatorio hiperdinámico. Además, diferentes grados de presión portal inician estímulos físicos que inducen la activación de la eNOS en diferentes partes de la circulación esplácnica con mecanismos moleculares diferentes.²¹⁴ Una presión portal aguda y elevada induce inicialmente vasoconstricción en la circulación esplácnica debida a un reflejo miógeno causado por un repentino incremento de la presión portal, que posteriormente produce la activación de la eNOS, incremento en la producción de NO y vasodilatación en las arterias de la circulación esplácnica.^{100, 215} Por el contrario, cuando se incrementó la hipertensión portal de forma moderada se sobreexpresó la eNOS en la microcirculación esplácnica, pero no en arterias de gran y mediano calibre. Estos resultados indican que la presión portal es un factor importante que regula la vasodilatación en la circulación esplácnica a través de la activación de la eNOS.²¹⁶

La expresión génica de las DDAHs varía para cada uno de los lechos vasculares y patologías estudiadas. En la arteria ilíaca la hipertensión portal induce una infraexpresión de la DDAH-1 en la arteria ilíaca. Se ha demostrado que los niveles plasmáticos de ADMA en ratas con hipertensión portal son muy bajos o indetectables.¹⁹⁶ Y por otra parte, hay un exceso de NO en la circulación sistémica. Probablemente, la disminución de la expresión de la DDAH-1 tendería a incrementar los niveles de ADMA y corregir el exceso de NO en la circulación sistémica. En la cirrosis se observa una sobreexpresión de la DDAH-1 en la arteria ilíaca. Al contrario de lo que ocurre en la hipertensión portal prehepática en la cirrosis hay un incremento significativo de los niveles plasmáticos de ADMA.¹⁹⁶

Nuestros resultados en ramas de arteria mesentérica demuestran que tanto la DDAH-1 como la DDAH-2 están sobreexpresadas en la hipertensión portal asociada o no a una cirrosis. Esta sobreexpresión de las DDAHs indicaría una mayor degradación de ADMA en el lecho mesentérico de ratas con hipertensión portal y cirrosis. Se ha demostrado que la actividad de la DDAH juega un papel importante en la síntesis de NO.¹⁴⁸ Además de otros factores, esta sobreexpresión de las DDAHs en el territorio esplácnico provocaría una mayor actividad de la NOS y contribuiría al exceso de NO y al agravamiento de la hipertensión portal durante la cirrosis. El desarrollo de inhibidores específicos de las DDAHs y sus efectos circunscritos a la circulación mesentérica podrían ser de utilidad para reducir el exceso de NO en la circulación esplácnica durante la hipertensión portal y cirrosis.

Para profundizar en los efectos de la cirrosis hepática en el sistema DDAH-ADMA-NO estudiamos la expresión de eNOS, DDAH-1 y DDAH-2 en el hígado. Las células endoteliales sinusoidales juegan un papel importante en la regulación del tono vascular intrahepático.^{13, 217, 218} Sustancias vasoactivas liberadas por las células endoteliales sinusoidales difunden hacia las células estrelladas hepáticas y producen su relajación o contracción. De esta forma las células endoteliales sinusoidales producen una amplia variedad de sustancias vasoactivas y regulan el flujo sanguíneo en la microcirculación sinusoidal. Entre estas sustancias vasoactivas la endotelina²¹⁹ y el NO²²⁰ son importantes reguladores de la microcirculación.

Nuestros resultados demuestran que la hipertensión portal prehepática no afecta al hígado en cuanto a la expresión de ARNm de eNOS, mientras que en la cirrosis existe una sobreexpresión de la eNOS, resultados similares se han obtenido en modelos animales de cirrosis^{90, 221} o en pacientes cirróticos.²²² El lecho vascular de hígados cirróticos muestra disfunción endotelial.⁵⁷ Estudios realizados en pacientes con cirrosis como en modelos experimentales de cirrosis han demostrado que, contrariamente a lo que

ocurre en hígados normales, el hígado cirrótico no puede acomodarse al incremento del flujo sanguíneo portal producido por la hiperemia postprandial, que determina un abrupto incremento de la presión portal.²²³ Además, la disfunción endotelial ha sido estudiada mediante el deterioro de la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio a la acetilcolina en el lecho vascular de hígados cirróticos.^{2, 57} Este daño es principalmente debido a un defecto en la generación de NO por las células endoteliales y por una respuesta vasodilatadora reducida al NO.⁶¹

Numerosos trabajos demuestran que la actividad de la eNOS está disminuída en el hígado cirrótico.^{60, 90, 196, 224} Esta falta de actividad se atribuye en parte a un cambio en la redistribución de la eNOS o a modificaciones postranscripcionales ya que no se observan cambios en los niveles de proteína.^{60, 90, 196} Otra de las modificaciones que se han observado en el hígado cirrótico es la unión que se establece entre la eNOS y la caveolina-1, cuya interacción inhibe la actividad de la eNOS,⁵⁸ concluyendo que en el hígado existe una baja producción de NO.

El ADMA es un inhibidor de la NOS y, por tanto, disminuye la producción de NO. Nuestro grupo demostró el aumento de ADMA en plasma de pacientes cirróticos,¹⁴⁵ este aumento de ADMA podría ser uno de los causantes del déficit en la síntesis de NO. Para demostrar si el acúmulo de ADMA es consecuencia de un fallo a nivel de las enzimas encargadas de degradarlo, estudiamos la expresión de las DDAHs y por otro lado medimos los niveles de ADMA intrahepáticos. La DDAH-1 se encuentra en tejidos que expresan nNOS y se ha demostrado que es la isoforma mayoritaria en el hígado, mientras que la DDAH-2 se encuentra en tejidos que expresan la eNOS.¹⁵³ Nuestros resultados muestran que no hay cambios en la expresión de las DDAHs en hígados de ratas con hipertensión portal prehepática. En hígados cirróticos la expresión génica de la DDAH-1, isoforma principal en el hígado, no sufría ningún cambio, sin embargo la DDAH-2 sufría un elevado

aumento de expresión. Este aumento en la expresión de DDAH-2 en el hígado cirrótico va acompañado de un aumento de los niveles plasmáticos de ADMA¹⁹⁶ e inhibición de la NOS. El incremento de ARNm de la DDAH-2 en el hígado cirrótico podría ser un mecanismo para disminuir los niveles hepáticos de ADMA y aumentar la síntesis de NO. La presencia de residuos de cisteína en el sitio activo de la DDAH hace que sea una enzima especialmente sensible al estrés oxidativo y nitrosativo. Se ha descrito un elevado estrés oxidativo en el hígado de ratas cirróticas²²⁵ que inhibiría la actividad de la DDAH-2. De tal modo, que aunque en el hígado cirrótico hay una gran sobreexpresión de la DDAH-2 el estrés oxidativo inhibiría la actividad enzimática y no podría eliminar el exceso de ADMA.

En cuanto a los niveles de ADMA intrahepáticos nuestros resultados indican que no hay cambios significativos en los distintos grupos de estudio. Sin embargo, los niveles de L-arginina, el precursor de la síntesis de NO, y el ratio L-arginina/ADMA están disminuídos en hígados cirróticos. La disminución del ratio L-arginina/ADMA indicaría un mayor grado de inhibición de la NOS y una menor síntesis de NO en el hígado cirrótico.

CONCLUSIONES

1. Los mecanismos de contracción independientes de receptor iniciados por la despolarización al KCl son afectados de forma distinta por la hipertensión portal y cirrosis. En la arteria ilíaca y mesentérica la hipertensión portal provoca un incremento de la contracción, mientras que la cirrosis provoca una disminución de la sensibilidad al KCl en arteria mesentérica de ratas cirróticas.
2. El ADMA inhibe la relajación dependiente de endotelio, mediada principalmente por NO en la arteria ilíaca. Sin embargo, en la arteria mesentérica el ADMA no altera la relajación dependiente de endotelio. Por tanto, el incremento de los niveles plasmáticos de ADMA en la cirrosis no modificaría la relajación dependiente del endotelio en el lecho esplácnico y contribuiría a la excesiva vasodilatación.
3. Existen variaciones importantes en la expresión de las DDAHs inducidas por la hipertensión portal y cirrosis. La elevada expresión de las DDAHs a nivel esplácnico en la hipertensión portal y en la cirrosis contribuiría a una mayor degradación del ADMA que favorecería la síntesis de NO, que tendría especial repercusión en el tono basal esplácnico.
4. En el hígado cirrótico hay un incremento en la expresión de DDAH-2, que no se acompaña con una mayor síntesis de NO. Probablemente el elevado estrés oxidativo durante la cirrosis podría inhibir la actividad DDAH. Por otra parte, el déficit de NO existente en el hígado cirrótico podría ser debido, al menos en parte, a los bajos niveles hepáticos de L-arginina.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Pinzani M, Milani S, De FR et al. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996 February;110(2):534-48.
- (2) Graupera M, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG et al. Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2003 January;37(1):172-81.
- (3) Groszmann RJ, Kravetz D, Bosch J et al. Nitroglycerin improves the hemodynamic response to vasopressin in portal hypertension. *Hepatology* 1982 November;2(6):757-62.
- (4) Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994 November;20(5):1359-63.
- (5) Navasa M, Chesta J, Bosch J, Rodes J. Reduction of portal pressure by isosorbide-5-mononitrate in patients with cirrhosis. Effects on splanchnic and systemic hemodynamics and liver function. *Gastroenterology* 1989 April;96(4):1110-8.
- (6) Albillos A, Lledo JL, Banares R et al. Hemodynamic effects of alpha-adrenergic blockade with prazosin in cirrhotic patients with portal hypertension. *Hepatology* 1994 September;20(3):611-7.
- (7) Bhathal PS, Grossman HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of the isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol* 1985;1(4):325-37.
- (8) Wiest R, Groszmann RJ. Nitric oxide and portal hypertension: its role in the regulation of intrahepatic and splanchnic vascular resistance. *Semin Liver Dis* 1999;19(4):411-26.
- (9) Conn HO. Vasopressin and nitroglycerin in the treatment of bleeding varices: the bottom line. *Hepatology* 1986 May;6(3):523-5.
- (10) Iwao T, Toyonaga A, Oho K et al. Effect of vasopressin on esophageal varices blood flow in patients with cirrhosis: comparisons with the effects on portal vein and superior mesenteric artery blood flow. *J Hepatol* 1996 October;25(4):491-7.
- (11) Chan CC, Wang SS, Lee FY et al. Effects of vasopressin on portal-systemic collaterals of cirrhotic rats. *Scand J Gastroenterol* 2005 January;40(1):83-9.

-
- (12) Chan CC, Lee FY, Wang SS et al. Effects of vasopressin on portal-systemic collaterals in portal hypertensive rats: role of nitric oxide and prostaglandin. *Hepatology* 1999 September;30(3):630-5.
- (13) Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002 February;35(2):478-91.
- (14) Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983 January;244(1):G52-G57.
- (15) Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985 June;248(6 Pt 1):G618-G625.
- (16) Bernardi M, Trevisani F. Systemic and regional hemodynamics in preascitic cirrhosis. *J Hepatol* 1997 September;27(3):588-91.
- (17) Fernandez-Seara J, Prieto J, Quiroga J et al. Systemic and regional hemodynamics in patients with liver cirrhosis and ascites with and without functional renal failure. *Gastroenterology* 1989 November;97(5):1304-12.
- (18) Kowalski HJ, Belmann WH. The cardiac output at rest in Laennec's cirrhosis. *J Clin Invest* 1953 October;32(10):1025-33.
- (19) Gines P, Martin PY, Niederberger M. Prognostic significance of renal dysfunction in cirrhosis. *Kidney Int Suppl* 1997 October;61:S77-S82.
- (20) Epstein M. [Hepatorenal syndrome]. *Rev Clin Esp* 1988 June;183(1):37-41.
- (21) Schrier RW, De Wardener HE. Tubular reabsorption of sodium ion: influence of factors other than aldosterone and glomerular filtration rate. 2. *N Engl J Med* 1971 December 2;285(23):1292-303.
- (22) Cardenas A, Arroyo V. Mechanisms of water and sodium retention in cirrhosis and the pathogenesis of ascites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003 December;17(4):607-22.
- (23) Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Temporal relationship of peripheral vasodilatation, plasma volume expansion and the hyperdynamic circulatory state in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1992 February;15(2):323-8.

- (24) Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988 September;8(5):1151-7.
- (25) Ryan J, Sudhir K, Jennings G, Esler M, Dudley F. Impaired reactivity of the peripheral vasculature to pressor agents in alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1993 October;105(4):1167-72.
- (26) MacGilchrist AJ, Sumner D, Reid JL. Impaired pressor reactivity in cirrhosis: evidence for a peripheral vascular defect. *Hepatology* 1991 April;13(4):689-94.
- (27) Atucha NM, Shah V, Garcia-Cardena G, Sessa WE, Groszmann RJ. Role of endothelium in the abnormal response of mesenteric vessels in rats with portal hypertension and liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1996 December;111(6):1627-32.
- (28) Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Nature of endothelium-derived relaxing factor: are there two relaxing mediators? *Circ Res* 1987 November;61(5 Pt 2):II61-II67.
- (29) Suzuki H. The electrogenic Na-K pump does not contribute to endothelium-dependent hyperpolarization in the rabbit ear artery. *Eur J Pharmacol* 1988 November 1;156(2):295-7.
- (30) Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 1988 December;95(4):1165-74.
- (31) Chen G, Suzuki H. Some electrical properties of the endothelium-dependent hyperpolarization recorded from rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 1989 March;410:91-106.
- (32) Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 1997 December 1;100(11):2793-9.
- (33) Wallerstedt SM, Bodelsson M. Endothelium-dependent relaxation by substance P in human isolated omental arteries and veins: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Br J Pharmacol* 1997 January;120(1):25-30.

- (34) Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 August;279(2):H459-H465.
- (35) Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ Res* 2002 April 19;90(7):800-6.
- (36) Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996 March;78(3):415-23.
- (37) Fisslthaler B, Popp R, Kiss L et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999 September 30;401(6752):493-7.
- (38) Matoba T, Shimokawa H, Kubota H et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 January 25;290(3):909-13.
- (39) Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O et al. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation* 2003 February 25;107(7):1040-5.
- (40) Randall MD, Alexander SP, Bennett T et al. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 December 4;229(1):114-20.
- (41) Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 February 4;100(3):1426-31.
- (42) Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998 November 19;396(6708):269-72.
- (43) Atucha NM, Ortiz MC, Fortepiani LA, Nadal FJ, Martinez-Prieto C, Garcia-Estan J. Mesenteric hyporesponsiveness in cirrhotic rats with ascites: role of cGMP and K⁺ channels. *Clin Sci (Lond)* 2000 November;99(5):455-60.
- (44) Castro A, Ros J, Jimenez W et al. Intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats with cirrhosis. *J Hepatol* 1994 October;21(4):521-6.

- (45) Atucha NM, Nadal FJ, Alcaraz A, Iyu D, Ortiz MC, Garcia-Estan J. Reduced capacitative calcium entry in the mesenteric vascular bed of bile duct-ligated rats. *Eur J Pharmacol* 2005 November 21;525(1-3):117-22.
- (46) Huang YT, Yu PC, Lee MF, Lin HC, Hong CY, Yang MC. Decreased vascular contractile and inositol phosphate responses in portal hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1995 March;73(3):378-82.
- (47) Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome versus portopulmonary hypertension: distinctions and dilemmas. *Hepatology* 1997 May;25(5):1282-4.
- (48) Herve P, Lebec D, Brenot F et al. Pulmonary vascular disorders in portal hypertension. *Eur Respir J* 1998 May;11(5):1153-66.
- (49) Aggarwal S, Kramer D, Yonas H et al. Cerebral hemodynamic and metabolic changes in fulminant hepatic failure: a retrospective study. *Hepatology* 1994 January;19(1):80-7.
- (50) Lockwood AH, Yap EW, Rhoades HM, Wong WH. Altered cerebral blood flow and glucose metabolism in patients with liver disease and minimal encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991 March;11(2):331-6.
- (51) Srivastava A, Gottstein J, Blei AT. Cerebral blood flow and the hyperdynamic circulation of rats after portacaval anastomosis. *J Hepatol* 1993 January;17(1):15-9.
- (52) Ma Z, Lee SS. Cirrhotic cardiomyopathy: getting to the heart of the matter. *Hepatology* 1996 August;24(2):451-9.
- (53) Myers RP, Lee SS. Cirrhotic cardiomyopathy and liver transplantation. *Liver Transpl* 2000 July;6(4 Suppl 1):S44-S52.
- (54) Moller S, Henriksen JH. Cirrhotic cardiomyopathy: a pathophysiological review of circulatory dysfunction in liver disease. *Heart* 2002 January;87(1):9-15.
- (55) Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991 March 30;337(8744):776-8.
- (56) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 June;43(2):109-42.

- (57) Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998 October;28(4):926-31.
- (58) Shah V, Toruner M, Haddad F et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999 November;117(5):1222-8.
- (59) Sarela AI, Mihaimed FM, Batten JJ, Davidson BR, Mathie RT. Hepatic and splanchnic nitric oxide activity in patients with cirrhosis. *Gut* 1999 May;44(5):749-53.
- (60) Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998 February;114(2):344-51.
- (61) Dudenhofer AA, Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Gupta T, Groszmann RJ. Bioactivation of nitroglycerin and vasomotor response to nitric oxide are impaired in cirrhotic rat livers. *Hepatology* 2002 August;36(2):381-5.
- (62) Kimpel M, Folz IC, Hanisch E. Time course-dependent evolution of nitric oxide-mediated arterial hyporeactivity to phenylephrine in rats with ligated bile duct. *Scand J Gastroenterol* 1998 March;33(3):314-8.
- (63) Zipser RD, Hoefs JC, Speckart PF, Zia PK, Horton R. Prostaglandins: modulators of renal function and pressor resistance in chronic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1979 June;48(6):895-900.
- (64) Pizcueta P, Pique JM, Fernandez M et al. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 1992 December;103(6):1909-15.
- (65) Hou MC, Cahill PA, Zhang S et al. Enhanced cyclooxygenase-1 expression within the superior mesenteric artery of portal hypertensive rats: role in the hyperdynamic circulation. *Hepatology* 1998 January;27(1):20-7.
- (66) Mosca P, Lee FY, Kaumann AJ, Groszmann RJ. Pharmacology of portal-systemic collaterals in portal hypertensive rats: role of endothelium. *Am J Physiol* 1992 October;263(4 Pt 1):G544-G550.
- (67) Lee FY, Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Administration of N omega-nitro-L-arginine ameliorates portal-systemic shunting in

- portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1993 November;105(5):1464-70.
- (68) Villeneuve JP, Dagenais M, Huet PM, Roy A, Lapointe R, Marleau D. The hepatic microcirculation in the isolated perfused human liver. *Hepatology* 1996 January;23(1):24-31.
- (69) Hung DY, Chang P, Cheung K, Winterford C, Roberts MS. Quantitative evaluation of altered hepatic spaces and membrane transport in fibrotic rat liver. *Hepatology* 2002 November;36(5):1180-9.
- (70) Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996 November;271(5 Pt 1):C1424-C1437.
- (71) Van De CM, Van Pelt JF, Nevens F, Fevery J, Reichen J. Low NO bioavailability in CCl4 cirrhotic rat livers might result from low NO synthesis combined with decreased superoxide dismutase activity allowing superoxide-mediated NO breakdown: A comparison of two portal hypertensive rat models with healthy controls. *Comp Hepatol* 2003 January 10;2(1):2.
- (72) Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988;12 Suppl 5:S115-S118.
- (73) Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension* 1989 June;13(6 Pt 2):658-67.
- (74) Loureiro-Silva MR, Iwakiri Y, Abraldes JG, Haq O, Groszmann RJ. Increased phosphodiesterase-5 expression is involved in the decreased vasodilator response to nitric oxide in cirrhotic rat livers. *J Hepatol* 2006 May;44(5):886-93.
- (75) Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995 October;75(4):725-48.
- (76) McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996 January;211(1):1-6.
- (77) Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 1994 May;31(3):131-43.
- (78) Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994 March 1;298 (Pt 2):249-58.

- (79) Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 June;24(6):1023-30.
- (80) Martin PY, Xu DL, Niederberger M et al. Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1996 March;270(3 Pt 2):F494-F499.
- (81) Niederberger M, Gines P, Martin PY et al. Comparison of vascular nitric oxide production and systemic hemodynamics in cirrhosis versus prehepatic portal hypertension in rats. *Hepatology* 1996 October;24(4):947-51.
- (82) Cahill PA, Foster C, Redmond EM, Gingalewski C, Wu Y, Sitzmann JV. Enhanced nitric oxide synthase activity in portal hypertensive rabbits. *Hepatology* 1995 August;22(2):598-606.
- (83) Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M et al. Evidence against a role for inducible nitric oxide synthase in the hyperdynamic circulation of portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995 May;108(5):1487-95.
- (84) Heinemann A, Stauber RE. The role of inducible nitric oxide synthase in vascular hyporeactivity of endotoxin-treated and portal hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1995 May 4;278(1):87-90.
- (85) Gadano AC, Sogni P, Yang S et al. Endothelial calcium-calmodulin dependent nitric oxide synthase in the in vitro vascular hyporeactivity of portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1997 March;26(3):678-86.
- (86) Martin PY, Ohara M, Gines P et al. Nitric oxide synthase (NOS) inhibition for one week improves renal sodium and water excretion in cirrhotic rats with ascites. *J Clin Invest* 1998 January 1;101(1):235-42.
- (87) Cahill PA, Redmond EM, Hodges R, Zhang S, Sitzmann JV. Increased endothelial nitric oxide synthase activity in the hyperemic vessels of portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1996 September;25(3):370-8.
- (88) Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998 December;28(6):1467-73.
- (89) Jurzik L, Froh M, Straub RH, Scholmerich J, Wiest R. Up-regulation of nNOS and associated increase in nitric vasodilation in superior

- mesenteric arteries in pre-hepatic portal hypertension. *J Hepatol* 2005 August;43(2):258-65.
- (90) Wei CL, Khoo HE, Lee KH, Hon WM. Differential expression and localization of nitric oxide synthases in cirrhotic livers of bile duct-ligated rats. *Nitric Oxide* 2002 September;7(2):91-102.
- (91) Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 1991 November;88(5):1663-71.
- (92) Awolesi MA, Sessa WC, Sumpio BE. Cyclic strain upregulates nitric oxide synthase in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1995 September;96(3):1449-54.
- (93) Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 August;15(8):1255-61.
- (94) Uematsu M, Ohara Y, Navas JP et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 1995 December;269(6 Pt 1):C1371-C1378.
- (95) Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 May 24;91(11):5212-6.
- (96) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999 June 10;399(6736):601-5.
- (97) Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999 June 10;399(6736):597-601.
- (98) Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol* 1999 July 29;9(15):845-8.
- (99) Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 1998 April 23;392(6678):821-4.
- (100) Iwakiri Y, Tsai MH, McCabe TJ et al. Phosphorylation of eNOS initiates excessive NO production in early phases of portal hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 June;282(6):H2084-H2090.

- (101) Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 1996 November 1;271(44):27237-40.
- (102) Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 1997 October 10;272(41):25437-40.
- (103) Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 1997 July 25;272(30):18522-5.
- (104) Xiao Z, Zhang Z, Ranjan V, Diamond SL. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *J Cell Physiol* 1997 May;171(2):205-11.
- (105) Esteban FJ, Pedrosa JA, Jimenez A et al. Distribution of neuronal nitric oxide synthase in the rat liver. *Neurosci Lett* 1997 April 25;226(2):99-102.
- (106) Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 May;86(9):3375-8.
- (107) Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989 October 28;2(8670):997-1000.
- (108) Sjoberg T, Steen S, Skarby T, Norgren L, Andersson KE. Postjunctional alpha-adrenoceptors in human superficial epigastric arteries and veins. *Pharmacol Toxicol* 1987 January;60(1):43-50.
- (109) Segarra G, Medina P, Ballester RM et al. Effects of some guanidino compounds on human cerebral arteries. *Stroke* 1999 October;30(10):2206-10.
- (110) Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992 March 7;339(8793):572-5.
- (111) Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med* 2005 July;10 Suppl 1:S73-S81.
- (112) Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Forstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y+ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide* 1997 February;1(1):65-73.

- (113) Reade MC, Clark MF, Young JD, Boyd CA. Increased cationic amino acid flux through a newly expressed transporter in cells overproducing nitric oxide from patients with septic shock. *Clin Sci (Lond)* 2002 June;102(6):645-50.
- (114) Mendes Ribeiro AC, Brunini TM, Ellory JC, Mann GE. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Cardiovasc Res* 2001 March;49(4):697-712.
- (115) Kaye DM, Ahlers BA, Autelitano DJ, Chin-Dusting JP. In vivo and in vitro evidence for impaired arginine transport in human heart failure. *Circulation* 2000 November 28;102(22):2707-12.
- (116) Carnegie PR, Fellows FC, Symington GR. Urinary excretion of methylarginine in human disease. *Metabolism* 1977 May;26(5):531-7.
- (117) Siroen MP, van dS, Jr., Teerlink T, van SC, Nijveldt RJ, van Leeuwen PA. The human liver clears both asymmetric and symmetric dimethylarginine. *Hepatology* 2005 March;41(3):559-65.
- (118) Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999 March 9;99(9):1141-6.
- (119) Tsao PS, Cooke JP. Endothelial alterations in hypercholesterolemia: more than simply vasodilator dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32 Suppl 3:S48-S53.
- (120) Goonasekera CD, Rees DD, Woolard P, Friend A, Shah V, Dillon MJ. Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens* 1997 August;15(8):901-9.
- (121) Goonasekera CD, Shah V, Rees DD, Dillon MJ. Vascular endothelial cell activation associated with increased plasma asymmetric dimethyl arginine in children and young adults with hypertension: a basis for atheroma? *Blood Press* 2000;9(1):16-21.
- (122) Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2001 July;38(1):111-6.
- (123) Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998 November 3;98(18):1842-7.

- (124) Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002 March 20;287(11):1420-6.
- (125) Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001 November 15;88(10):1201-3.
- (126) Yin QF, Fu SH, He P, Xiong Y. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibition and asymmetric dimethylarginine accumulation contribute to endothelial dysfunction in rats exposed to glycosylated protein: effects of aminoguanidine. *Atherosclerosis* 2007 January;190(1):53-61.
- (127) Yoo JH, Lee SC. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 2001 October;158(2):425-30.
- (128) Pettersson A, Hedner T, Milsom I. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998 September;77(8):808-13.
- (129) Faraci FM, Brian JE, Jr., Heistad DD. Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1995 November;269(5 Pt 2):H1522-H1527.
- (130) Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. *Am J Physiol* 1995 June;268(6 Pt 2):H2224-H2231.
- (131) Beltowski J, Kedra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* 2006 March;58(2):159-78.
- (132) Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001 December 22;358(9299):2113-7.
- (133) Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999 March;10(3):594-600.
- (134) Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric

- dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999 April;33(4):652-8.
- (135) Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1998 March;178(3):551-6.
- (136) Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GS. Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Lancet* 1993 July 24;342(8865):242-3.
- (137) Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003 May 3;361(9368):1511-7.
- (138) Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001 April;37(4):489-92.
- (139) Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001 December 22;358(9299):2127-8.
- (140) Boger RH, Frystyk J, Ledet T, Moller N, Flyvbjerg A, Orskov H. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease. *Circulation* 2003 May 27;107(20):e193.
- (141) Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N et al. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 2003 January;57(1):244-52.
- (142) Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* 1998;62(26):2425-30.
- (143) Hermenegildo C, Medina P, Peiro M et al. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 December;87(12):5636-40.

- (144) Tsikas D, Rode I, Becker T, Nashan B, Klempnauer J, Frolich JC. Elevated plasma and urine levels of ADMA and 15(S)-8-iso-PGF2alpha in end-stage liver disease. *Hepatology* 2003 October;38(4):1063-4.
- (145) Lluch P, Torondel B, Medina P et al. Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2004 July;41(1):55-9.
- (146) Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989 June 15;264(17):10205-9.
- (147) MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M et al. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996 December;119(8):1533-40.
- (148) Dayoub H, Achan V, Adimoolam S et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003 December 16;108(24):3042-7.
- (149) Knipp M, Charnock JM, Garner CD, Vasak M. Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1. *J Biol Chem* 2001 November 2;276(44):40449-56.
- (150) Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001 November 20;104(21):2569-75.
- (151) Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999 June 22;99(24):3092-5.
- (152) Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K. Detection of NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. *Arch Biochem Biophys* 1993 February 1;300(2):657-62.
- (153) Leiper JM, Santa MJ, Chubb A et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* 1999 October 1;343 Pt 1:209-14.

- (154) Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 2000 August 15;68(1):101-5.
- (155) Peunova N, Enikolopov G. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 1995 May 4;375(6526):68-73.
- (156) Mishima T, Hamada T, Ui-Tei K et al. Expression of DDAH1 in chick and rat embryos. *Brain Res Dev Brain Res* 2004 February 20;148(2):223-32.
- (157) Birdsey GM, Leiper JM, Vallance P. Intracellular localization of dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpressed in an endothelial cell line. *Acta Physiol Scand* 2000 January;168(1):73-9.
- (158) Chen Y, Li Y, Zhang P et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase and endothelial dysfunction in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 November;289(5):H2212-H2219.
- (159) Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981 May;240(5):G371-G375.
- (160) Lee SS, Girod C, Braillon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am J Physiol* 1986 August;251(2 Pt 1):G176-G180.
- (161) Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 1976 April 15;260(5552):617-9.
- (162) Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1984;24:175-97.
- (163) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 April;162(1):156-9.
- (164) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 December;25(4):402-8.
- (165) Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and

- dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 October 15;99(21):13527-32.
- (166) Gisbert R, Ziani K, Miquel R et al. Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2002 January;135(1):206-16.
- (167) Piascik MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL, Jr., Perez DM. The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1995 December;275(3):1583-9.
- (168) Piascik MT, Smith MS, Soltis EE, Perez DM. Identification of the mRNA for the novel alpha 1D-adrenoceptor and two other alpha 1-adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol* 1994 July;46(1):30-40.
- (169) Saussy DL, Jr., Goetz AS, Queen KL, King HK, Lutz MW, Rimele TJ. Structure activity relationships of a series of buspirone analogs at alpha-1 adrenoceptors: further evidence that rat aorta alpha-1 adrenoceptors are of the alpha-1D-subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1996 July;278(1):136-44.
- (170) Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994 November 17;372(6503):231-6.
- (171) Segarra G, Lluch P, Mauricio MD et al. Contractile hyporesponsiveness to norepinephrine of forearm veins in chronic renal failure. *Am J Hypertens* 2006 August;19(8):818-22.
- (172) Connolly C, Cawley T, McCormick PA, Docherty JR. Portal hypertension increases vasoconstrictor responsiveness of rat aorta. *Clin Sci (Lond)* 1999 January;96(1):41-7.
- (173) Sieber CC, Lopez-Talavera JC, Groszmann RJ. Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1993 June;104(6):1750-4.
- (174) Hennenberg M, Trebicka J, Biecker E, Schepke M, Sauerbruch T, Heller J. Vascular dysfunction in human and rat cirrhosis: role of receptor-desensitizing and calcium-sensitizing proteins. *Hepatology* 2007 February;45(2):495-506.

- (175) Hennenberg M, Biecker E, Trebicka J et al. Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2006 March;130(3):838-54.
- (176) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 November 27;288(5789):373-6.
- (177) Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974 October;71(10):3824-8.
- (178) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 June 11;327(6122):524-6.
- (179) Forstermann U, Neufang B. The endothelium-dependent vasodilator effect of acetylcholine: characterization of the endothelial relaxing factor with inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Eur J Pharmacol* 1984 August 3;103(1-2):65-70.
- (180) Pfister SL, Campbell WB. Arachidonic acid- and acetylcholine-induced relaxations of rabbit aorta. *Hypertension* 1992 November;20(5):682-9.
- (181) Torondel B, Vila JM, Segarra G et al. Endothelium-dependent responses in human isolated thyroid arteries from donors. *J Endocrinol* 2004 June;181(3):379-84.
- (182) Sogni P, Sabry S, Moreau R, Gadano A, Lebrec D, nh-Xuan AT. Hyporeactivity of mesenteric resistance arteries in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1996 April;24(4):487-90.
- (183) Cawley T, Breslin E, Geraghty J, Osborne H, Docherty JR. Investigations of the function of the vascular endothelium in portal hypertensive rats. *Pharmacology* 1995 December;51(6):381-90.
- (184) Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998 November 19;396(6708):269-72.
- (185) Albillos A, Rossi I, Cacho G et al. Enhanced endothelium-dependent vasodilation in patients with cirrhosis. *Am J Physiol* 1995 March;268(3 Pt 1):G459-G464.
- (186) Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002 August;23(8):374-80.

- (187) Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002 August;23(8):374-80.
- (188) Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995 April;268(4 Pt 1):C799-C822.
- (189) Chabot F, Mestiri H, Sabry S, l'Ava-Santucci J, Lockhart A, nh-Xuan AT. Role of NO in the pulmonary artery hyporeactivity to phenylephrine in experimental biliary cirrhosis. *Eur Respir J* 1996 March;9(3):560-4.
- (190) Mathie RT, Ralevic V, Moore KP, Burnstock G. Mesenteric vasodilator responses in cirrhotic rats: a role for nitric oxide? *Hepatology* 1996 January;23(1):130-6.
- (191) Ortiz MC, Fortepiani LA, Martinez C, Atucha NM, Garcia-Estan J. Vascular hyporesponsiveness in aortic rings from cirrhotic rats: role of nitric oxide and endothelium. *Clin Sci (Lond)* 1996 December;91(6):733-8.
- (192) Heinemann A, Stauber RE. Vasodilator responses to nitric oxide are enhanced in mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Eur J Clin Invest* 1996 September;26(9):824-6.
- (193) Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990 November;101(3):746-52.
- (194) Moore PK, al-Swayeh OA, Chong NW, Evans RA, Gibson A. L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br J Pharmacol* 1990 February;99(2):408-12.
- (195) McDermott JR. Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 1976 January 15;154(1):179-84.
- (196) Laleman W, Omasta A, Van De CM et al. A role for asymmetric dimethylarginine in the pathophysiology of portal hypertension in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005 December;42(6):1382-90.

- (197) Segarra G, Medina P, Vila JM et al. Contractile effects of arginine analogues on human internal thoracic and radial arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000 October;120(4):729-36.
- (198) Segarra G, Medina P, Vila JM et al. Inhibition of nitric oxide activity by arginine analogs in human renal arteries. *Am J Hypertens* 2001 November;14(11 Pt 1):1142-8.
- (199) Griffith OW, Kilbourn RG. Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. *Methods Enzymol* 1996;268:375-92.
- (200) Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990 November;101(3):746-52.
- (201) Moore PK, al-Swayeh OA, Chong NW, Evans RA, Gibson A. L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br J Pharmacol* 1990 February;99(2):408-12.
- (202) McDermott JR. Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 1976 January 15;154(1):179-84.
- (203) Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990 November;101(3):746-52.
- (204) Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 December 1;89(23):11259-63.
- (205) Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006 February;43(2 Suppl 1):S121-S131.
- (206) Groszmann RJ, Abraldes JG. Portal hypertension: from bedside to bench. *J Clin Gastroenterol* 2005 April;39(4 Suppl 2):S125-S130.
- (207) Niederberger M, Gines P, Tsai P et al. Increased aortic cyclic guanosine monophosphate concentration in experimental cirrhosis in rats: evidence for a role of nitric oxide in the pathogenesis of arterial vasodilation in cirrhosis. *Hepatology* 1995 June;21(6):1625-31.

- (208) Khalid A, Whitcomb DC. The premalignant lesions for pancreatic cancer; will Pan-IN's pan out? *Gastroenterology* 2002 August;123(2):645-7.
- (209) Pateron D, Tazi KA, Sogni P et al. Role of aortic nitric oxide synthase 3 (eNOS) in the systemic vasodilation of portal hypertension. *Gastroenterology* 2000 July;119(1):196-200.
- (210) Morales-Ruiz M, Jimenez W, Perez-Sala D et al. Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 1996 December;24(6):1481-6.
- (211) Angeli P, Fernandez-Varo G, Dalla L, V et al. The role of nitric oxide in the pathogenesis of systemic and splanchnic vasodilation in cirrhotic rats before and after the onset of ascites. *Liver Int* 2005 April;25(2):429-37.
- (212) Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E et al. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study. *Liver Int* 2006 September;26(7):889-98.
- (213) Abraldes JG, Iwakiri Y, Loureiro-Silva M, Haq O, Sessa WC, Groszmann RJ. Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 May;290(5):G980-G987.
- (214) Abraldes JG, Iwakiri Y, Loureiro-Silva M, Haq O, Sessa WC, Groszmann RJ. Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 May;290(5):G980-G987.
- (215) Tsai MH, Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Groszmann RJ. Mesenteric vasoconstriction triggers nitric oxide overproduction in the superior mesenteric artery of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 2003 November;125(5):1452-61.
- (216) Abraldes JG, Iwakiri Y, Loureiro-Silva M, Haq O, Sessa WC, Groszmann RJ. Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 May;290(5):G980-G987.

- (217) Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology* 2006 February;43(2 Suppl 1):S121-S131.
- (218) Groszmann RJ, Abraldes JG. Portal hypertension: from bedside to bench. *J Clin Gastroenterol* 2005 April;39(4 Suppl 2):S125-S130.
- (219) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988 March 31;332(6163):411-5.
- (220) Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G et al. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997 December 1;100(11):2923-30.
- (221) Biecker E, Sagesser H, Reichen J. Vasodilator mRNA levels are increased in the livers of portal hypertensive NO-synthase 3-deficient mice. *Eur J Clin Invest* 2004 April;34(4):283-9.
- (222) Goh BJ, Tan BT, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide synthase and heme oxygenase expressions in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006 January 28;12(4):588-94.
- (223) Bellis L, Berzigotti A, Abraldes JG et al. Low doses of isosorbide mononitrate attenuate the postprandial increase in portal pressure in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2003 February;37(2):378-84.
- (224) Bhimani EK, Serracino-Inglott F, Sarela AI, Batten JJ, Mathie RT. Hepatic and mesenteric nitric oxide synthase expression in a rat model of CCl(4)-induced cirrhosis. *J Surg Res* 2003 July;113(1):172-8.
- (225) Singh S, Shackleton G, Ah-Sing E, Chakraborty J, Bailey ME. Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology* 1992 November;103(5):1625-9.