

UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA

**ALTERACIONES DE LA FUNCIÓN RENAL EN LA CIRROSIS
HEPÁTICA EXPERIMENTAL: PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO**

TESIS DOCTORAL

MARIA CLARA ORTIZ RUIZ

MARZO 1998

**NOEMÍ MARÍN ATUCHA Y JOAQUÍN GARCÍA-ESTAÑ LÓPEZ,
PROFESORES TITULARES DE FISIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA**

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada "Alteraciones de la Función Renal en la Cirrosis Hepática Experimental: Papel del Oxido Nítrico", ha sido realizada por María Clara Ortiz Ruiz bajo nuestra dirección. Una vez revisada y conforme, autorizamos su presentación para la obtención del título de Doctor en Medicina por considerar que posee el nivel suficiente y constituye una aportación original sobre el tema.

En Murcia, a 2 de Febrero de 1998

Noemí Marín Atucha

Joaquín García-Estañ López

PUBLICACIONES RESULTANTES.

I. Comunicaciones a Congresos.

1. García-Estañ J, Ortíz MC, Ramírez A, Sánchez A, Martínez C, Ortíz AJ, Pérez MC, Atucha NM. Efectos hemodinámicos y excretorios renales de la aminoguanidina en ratas cirróticas anestesiadas. XX Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Gastroenterol Hepatol 1995; 18:233.

2. Ortíz MC, Atucha NM, Quesada T, García-Estañ J. Papel del óxido nítrico y de las prostaglandinas en el control inmediato de la hemodinámica renal en la rata. 1ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión. Hipertensión 1996;13: 50.

3. Ortíz MC, Atucha NM, Martínez C, Quesada T, García-Estañ J. Efectos presores y renales de la aminoguanidina cirróticas con ascitis. XXI Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Gastroenterol Hepatol 1996; 19: 21.

4. Ortíz MC, Atucha NM, Pérez MC, Martínez C, Quesada T, García-Estañ J. Reactividad vascular en anillos aórticos de ratas con cirrosis biliar. XXI Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Gastroenterol Hepatol 1996; 19: 22.

5. Ortíz MC, Fortepiani LA, Martínez C, Ruiz FM, Atucha NM, García-Estañ J. Capacidad vasodilatadora intrarrenal de óxido nítrico y de prostaglandinas en ratas cirróticas con ascitis. XXII Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Gastroenterol Hepatol 1997; 20: 25.

6. Ortíz MC, García-Sanz A, Bentley MD, García-Estañ J., Ritman EL, Romero JC. 3D Micro-CT of renal vasculature in cirrhotic rats with bile duct ligation. *Experimental Biology* 1988. Faseb J 1998; en prensa.

7. Ortíz MC, Fortepiani LA, Martínez C, Atucha NM, García-Estañ J. Efectos renales de la administración crónica de aminoguanidina y L-NAME en ratas cirróticas con ascitis. XXIII Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado. Gastroenterol Hepatol 1998; en prensa.

II. Artículos.

1. Ortíz MC, Atucha NM, Lahera V, Vargas F, Quesada T, García-Estañ, J. Importance of nitric oxide and prostaglandins in the control of the rat renal papillary circulation. Hypertension 27: 377-381, 1996.

2. Ortíz MC, Fortepiani LA, Martínez C, Atucha NM, García-Estañ, J. Vascular hyporesponsiveness in aortic rings from cirrhotic rats: role of nitric oxide and endothelium. Clin. Sci. 91:733-738, 1996.

3. Ortíz MC, Fortepiani LA, Martínez C, Atucha NM, García-Estañ, J. Renal and pressor effects of aminoguanidine in cirrhotic rats with ascites. J. Am. Soc. Nephrol. 7:2694-2699, 1996.

4. Criado M, Flores O, Ortíz MC, Criado F, Rodríguez-López A, Eleno N, Atucha NM, Arévalo M, García-Estañ J, López-Novoa JM. Elevated glomerular and systemic nitric oxide production in rats with chronic bile duct ligation: role of an inducible nitric oxide synthase. Hepatology, 26: 268-276, 1997.

SOPORTE ECONÓMICO.

1. *Mecanismos de la vasodilatación renal y sistémica en la cirrosis hepática.* Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, 95/1717.

2. *Mecanismos celulares de vasodilatación en la hipertensión portal y cirrosis hepática.* Programa Nacional de Salud y Farmacia, SAF97-0176.

ABREVIATURAS.

- AII, angiotensina II.
- ACH, acetilcolina.
- ADH, hormona antidiurética.
- AG, aminoguanidina.
- ANF, factor natriurético auricular.
- Cl₄C, tetracloruro de carbono.
- EDHF, factor hiperpolarizante derivado del endotelio.
- ET, endotelina.
- FE, fenilefrina.
- FSP, flujo sanguíneo papilar.
- FSR, flujosanguíneo renal.
- KCl, cloruro potásico.
- LCB, ligadura del conducto biliar.
- LVP, ligadura de la vena porta.
- NA, noradrenalina.
- L-NAME, N^w-nitro-L-arginina metil ester.
- L-NNA, N^w-nitro-L-arginina.
- NO, óxido nítrico.
- NOS, óxido nítrico sintasa.
- NOSc, óxido nítrico sintasa constitutiva.
- NOSi, óxido nítrico sintasa inducible.
- NPS, nitroprusiato sódico.
- PAM, presión arterial media.
- PG, prostaglandina.
- SNS, sistema nervioso simpático.
- SRAA, sistema renina-angiotensina-aldosterona.
- TEME, tira externa de la médula externa.
- TIME, tira interna de la médula externa.
- TFG, tasa de filtración glomerular.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I- Cirrosis hepática	2
Cirrosis hepática experimental.....	3
II- Patogenia de la ascitis y de los trastornos de la función renal	3
1.- Teorías	3
1.1 Teoría del infrallenado (underfilling)	4
1.2 Teoría del sobrellenado (overflow).....	4
1.3 Teoría de la vasodilatación periférica	4
2.- Alteraciones hemodinámicas de la cirrosis hepática	5
Hiporreactividad vascular a vasoconstrictores circulantes	7
3.- Alteraciones de la función renal en la cirrosis hepática.....	9
Fisiopatología de los trastornos de la función renal.....	10
3.1. Retención de sodio	10
a) Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	10
b) Sistema Nervioso Simpático.....	11
c) Factores natriuréticos endógenos	12
d) Endotelina	13
e) Quininas	14
f) Alteraciones intrarrenales de la cirrosis	14
3.2. Retención de agua	15
a) Hormona Antidiurética	15
b) Prostaglandinas renales.....	16
c) Otros factores	17
3.3. Síndrome hepatorenal	18
III- Oxido nítrico	18
1.- Isoenzimas de la sintasa de óxido nítrico	18
2.- Mecanismos de liberación del NO.....	20
2.1 Basal.....	20
2.2 Estimulada.....	20
a) Por agonistas	21
b) Por agentes físicos	22
3.- Inhibidores de la sintasa de NO	22
3.1 Análogos estructurales de la L-arginina.....	22
3.2 Inhibidores específicos de la sintasa inducible de NO.....	23
3.3 Otros inhibidores.....	23
4.- Mecanismo de acción del NO.....	23
IV- Oxido nítrico y cirrosis hepática	23
1.- El NO en las alteraciones hemodinámicas de la cirrosis hepática.....	23
Papel del NO en la hiporrespuesta vascular de la cirrosis	25
2.- El NO en las alteraciones renales de la cirrosis hepática.....	26
2.1 Fisiología del NO renal	27
2.2 Óxido nítrico, riñón y cirrosis hepática.....	28
3.- Mecanismos que aumentan la producción de NO	31
3.1 NOS inducible versus cNOS endotelial	31
3.2 Ictericia obstructiva, endotoxemia y enfermedad hepática	34

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	36
MATERIAL Y MÉTODOS	38
I- Inducción de la cirrosis	39
1.- Ligadura del conducto biliar	39
2.- Cirrosis por administración de tetracloruro de carbono	39
3.- Método diagnóstico	40
II- Protocolos experimentales	41
Protocolo 1. Estudio de la reactividad vascular en anillos aórticos de ratas cirróticas	41
Protocolo 2. Actividad de óxido nítrico sintasa en riñón y aorta de ratas cirróticas	44
Protocolo 3. Efectos de la inhibición aguda de la síntesis de óxido nítrico y de prostaglandinas sobre la hemodinámica renal de ratas cirróticas.....	45
Protocolo 4. Efectos presores y renales de la inhibición aguda de la síntesis de óxido nítrico en ratas cirróticas.....	50
Protocolo 5. Efectos presores y renales de la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico en ratas cirróticas.....	54
Protocolo 6. Estudio microcomputerizado de la morfología renal en ratas con ligadura del conducto biliar.....	55
III- Métodos estadísticos	59
RESULTADOS	60
Diagnóstico de cirrosis.....	61
Protocolo 1	62
Protocolo 2	65
Protocolo 3	66
Protocolo 4	71
Protocolo 5	83
Protocolo 6	88
DISCUSIÓN	92
SUMARIO DE RESULTADOS	111
CONCLUSIONES	114
BIBLIOGRAFÍA	115

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y caracterización química del factor relajante derivado del endotelio o "endothelium-derived relaxing factor" (EDRF), identificado posteriormente como óxido nítrico (NO), ha provocado el desarrollo de un inmenso campo en el ámbito de la investigación biomédica. Así, algunas condiciones patológicas tan importantes como la hipertensión arterial o la cirrosis hepática se caracterizan por importantes alteraciones, todavía no completamente aclaradas, en la función del NO. El estudio del papel del NO en esas enfermedades es de vital importancia para la adopción de nuevas terapéuticas que mejoren la calidad de vida de los enfermos.

La cirrosis hepática cursa con anomalías en la excreción renal de sodio y agua que conducen eventualmente al desarrollo de ascitis. La ascitis es una complicación frecuente y una de las principales causas de mortalidad junto con la existencia de peritonitis bacteriana espontánea, sangrado por rotura de varices y síndrome hepatorenal. La hipertensión portal que acompaña a la cirrosis se asocia con una temprana vasodilatación esplácnica que puede jugar un papel crítico en el inicio de las alteraciones hemodinámicas sistémicas y locales y contribuir a la formación de ascitis, perturbando las presiones microvasculares locales. Además, conduce a un estado de circulación hiperdinámica caracterizado por disminución de la presión arterial, gasto cardíaco elevado y resistencias vasculares sistémicas disminuidas. Esto se produce, además, a pesar de un aumento del volumen vascular y de la estimulación del eje renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), sistema nervioso simpático (SNS) y hormona antidiurética (ADH).

En la patogenia de la vasodilatación arterial periférica, como evento primario, se ha implicado a numerosas sustancias vasodilatadoras, entre las que figuran el glucagón, la prostaciclina, el péptido natriurético atrial, la sustancia P, los ácidos biliares, etcétera. Sin embargo, con el descubrimiento del papel principal del endotelio en el control del tono vascular, gran parte de las investigaciones actuales se dirigen a estudiar la participación de los factores vasoactivos endoteliales como mediadores de estas alteraciones hemodinámicas y renales de la cirrosis. Actualmente existen suficientes evidencias de una producción excesiva de NO endotelial en los vasos de animales y pacientes con cirrosis. Este aumento de la síntesis de NO vascular ha sido demostrado por estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en nuestro laboratorio que han descubierto una corrección de la hiporrespuesta a vasoconstrictores y de la hipotensión arterial tras la administración de inhibidores de la síntesis de NO. Además, la

inhibición de la producción de NO se acompaña de un marcado aumento de la excreción urinaria de sodio y agua en ratas cirróticas con y sin ascitis. Estos efectos y la reversión de la circulación hiperdinámica se asocian con una disminución plasmática de la actividad de renina y de las concentraciones de aldosterona y vasopresina. Por tanto, el NO emerge como un factor de gran importancia para comprender la fisiopatología de las alteraciones hemodinámicas y renales de la cirrosis.

El estudio de los mecanismos responsables de todas estas alteraciones está lejos de ser completo. Este trabajo experimental aborda de manera casi exclusiva la participación del NO como contribuyente potencial a la vasodilatación y alteraciones renales de la cirrosis hepática.

I- CIRROSIS HEPÁTICA.

La cirrosis hepática es un proceso patológico crónico que representa la vía final común de múltiples hepatopatías. Las características clínicas de la cirrosis se deben a las alteraciones morfológicas y, con frecuencia, son un reflejo de la gravedad de la lesión hepática más que de la etiología de la enfermedad hepática subyacente. El concepto de cirrosis es histológico y sus características anatomopatológicas básicas consisten en una desestructuración difusa del parénquima hepático, con la aparición de fibrosis y nódulos de regeneración. Estas alteraciones se deben a la necrosis de hepatocitos, al colapso de la red de soporte formada por reticulina y a la acumulación de tejido conectivo, distorsión del lecho vascular y regeneración nodular en el parénquima hepático superviviente. El resultado de los mecanismos destructivos y reparativos conduce a una insuficiencia hepatocelular que puede causar ictericia, edema, coagulopatía y diversas alteraciones metabólicas, además de una distorsión vascular que produce hipertensión portal, de la que se derivan la mayoría de las manifestaciones clínicas y complicaciones de esta enfermedad. Lo más frecuente es que el paciente cirrótico consulte por primera vez por la aparición de una complicación de la enfermedad, hecho que refleja un estado avanzado del proceso. Entre estas complicaciones figuran la hemorragia digestiva alta, la ascitis, la encefalopatía hepática, las infecciones bacterianas graves y la degeneración neoplásica (Planas y Quer, 1992). La ascitis o acúmulo de líquido en la cavidad peritoneal, es la complicación más frecuente de la cirrosis hepática y traduce la existencia de profundos trastornos hemodinámicos y de la función renal relacionados con la hipertensión portal. Su aparición es indicativa de un estadio avanzado de la enfermedad y requiere de una actuación

inmediata, constituyendo una de las principales indicaciones de trasplante hepático. La existencia de hipertensión portal y de retención renal de sodio y agua son condiciones necesarias para la formación de ascitis en la cirrosis (Ginès, 1992).

El interés acerca de los mecanismos desencadenantes de la retención de sodio y la formación de ascitis en la cirrosis se ha visto impulsado por la disponibilidad de modelos experimentales sencillos y altamente reproducibles de cirrosis hepática. Estos modelos repiten bastante fielmente las alteraciones histológicas, bioquímicas, hemodinámicas, renales y neurohumorales de la cirrosis hepática humana (Clària y Jiménez, 1992a).

Cirrosis hepática experimental.

Los procedimientos más utilizados para producir cirrosis experimental son la administración crónica de tetracloruro de carbono (Cl₄C) y la ligadura crónica del conducto biliar (LCB). Existe un tercer método, la ligadura parcial de la vena porta (LVP), en el que se provoca una hipertensión portal presinusoidal sin daño hepático, pero que reproduce de un modo predecible y homogéneo la mayoría de las alteraciones hemodinámicas que se observan en la cirrosis (Sikuler y cols, 1985).

El Cl₄C es un tóxico hepático que se ha utilizado en diversas especies animales para producir cirrosis. Los procedimientos empleados incluyen la inyección subcutánea, intramuscular o intraperitoneal, la administración intragástrica o la inhalación del hepatotóxico en el interior de una cámara estanca (Jiménez y cols, 1991). Este último es el que utilizamos en nuestro laboratorio y es una modificación del método de McLean y cols (1969) que consiste en la administración por inhalación de Cl₄C. Además, se añade fenobarbital al agua de bebida con objeto de inducir el metabolismo hepático, lo cual acorta el tiempo necesario para producir cirrosis (8-10 semanas).

La LCB consiste en la ligadura y escisión quirúrgica del conducto biliar principal con el objetivo de interrumpir el flujo y drenaje biliar y producir una cirrosis biliar secundaria. Según unos autores, en unos 15 días se manifiestan signos de cirrosis hepática y a los 28 días, aproximadamente un 75% de las ratas tienen cirrosis establecida (Kountouras y cols, 1984).

II- PATOGENIA DE LA ASCITIS Y DE LOS TRASTORNOS DE LA FUNCIÓN RENAL.

1.- Teorías.

Para explicar las alteraciones hemodinámicas y renales de la cirrosis han surgido varias teorías que exponemos resumidamente a continuación (figura 1):

1.1 Teoría del infrallenado (underfilling).

La cirrosis hepática progresiva conduce a un bloqueo intrahepático al flujo de sangre que determina un aumento del volumen sanguíneo en el territorio esplácnico y un incremento importante de la presión en los sinusoides portales (hipertensión portal sinusoidal). Esto, a su vez, provoca un aumento de la filtración de líquido hacia los vasos linfáticos. A medida que avanza la cirrosis, estos vasos son incapaces de drenar la totalidad de la linfa acumulada, lo que produce una extravasación de líquido hacia la cavidad peritoneal dando lugar a ascitis. El resultado es una disminución del volumen circulante que estimula los barorreceptores intratorácicos y arteriales y éstos, a través de los sistemas neurohumorales, actúan sobre el riñón para que retenga sodio y agua aumentando la formación de ascitis (Witte y cols, 1971, 1980).

1.2 Teoría del sobrellenado (overflow).

La hipertensión portal sinusoidal produce la estimulación de mecanorreceptores intrahepáticos que aumentarían la actividad simpática renal. Este reflejo hepatorenal produce una retención primaria, en el sentido de ser independiente de los cambios en la hemodinámica sistémica, de sodio y agua, provocando secundariamente una expansión de volumen plasmático y un aumento del gasto cardíaco. Las resistencias vasculares periféricas disminuyen para acomodar el alto volumen sanguíneo circulante. El contraste entre la hipervolemia arterial y el aumento de la presión hidrostática en los lechos vasculares hepático y esplácnico conduce a la formación de la ascitis inicial (Lieberman y cols, 1970; Levy, 1994).

1.3 Teoría de la vasodilatación periférica.

Esta teoría se ha propuesto como una revisión de la del infrallenado y la principal distinción de ella es que la hipertensión portal sinusoidal desencadena una vasodilatación arteriolar, inicial y más acentuada en el territorio esplácnico, que provoca una disminución del volumen arterial efectivo. De este modo, la vasodilatación periférica es el determinante inicial del infrallenado vascular y el desequilibrio entre la capacitancia vascular distendida y el volumen disponible ocasiona una disminución del volumen efectivo. La vasodilatación arteriolar esplácnica no sólo juega un papel crítico alterando la hemodinámica sistémica, sino también aumentando la presión hidrostática microvascular, que provoca el paso de fluido desde el compartimento vascular al espacio intersticial durante la hipertensión portal (Arroyo

y Ginès, 1992). La activación de los barorreceptores por el vaciado arterial se acompaña de respuestas neurohumorales que conllevan una retención de sodio y agua, con el consiguiente aumento del volumen intravascular y del gasto cardíaco. Si el aumento del volumen plasmático es inadecuado para normalizar la homeostasis circulatoria, los niveles de las sustancias neurohumorales se mantendrán elevados y la continuada retención de sodio y agua conducirá al desarrollo de ascitis. Si, por el contrario, el aumento del volumen plasmático es adecuado, llenando los lechos vasculares dilatados, las sustancias neurohumorales regresan a los niveles normales y la excreción hidrosódica vuelve a la normalidad (Schrier y cols, 1988 y 1994).

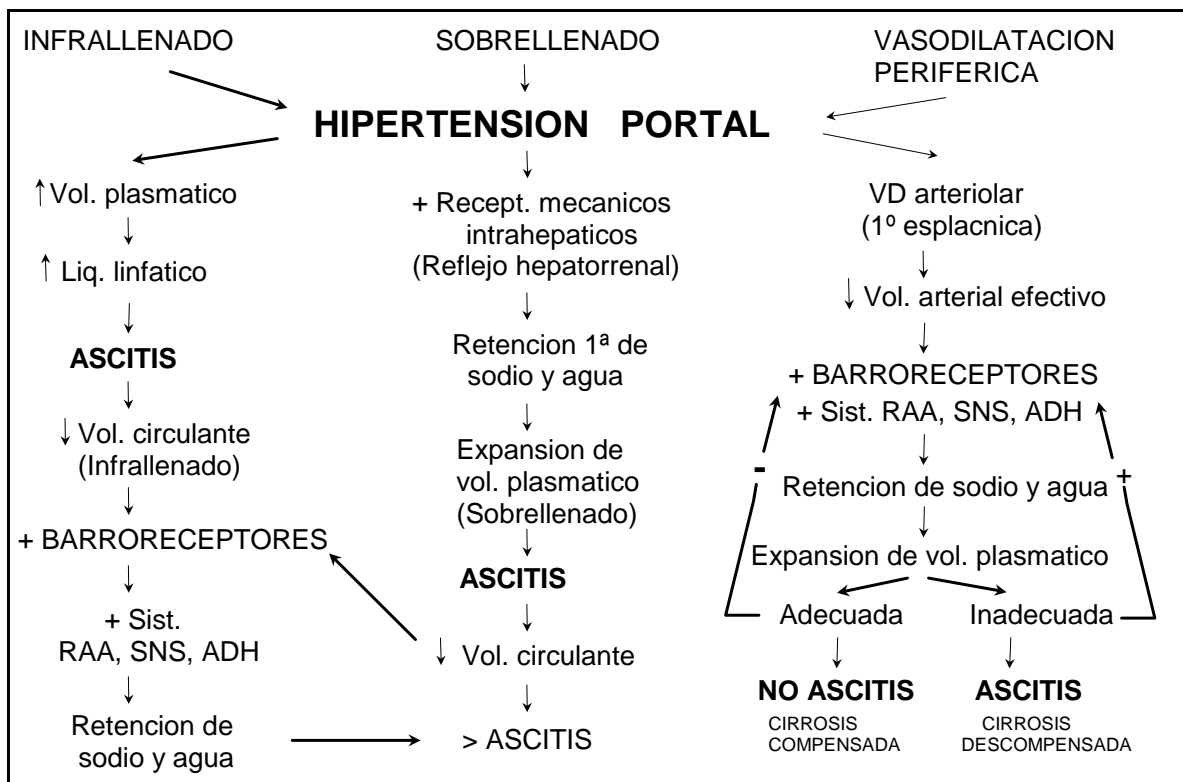


Figura 1. Teorías sobre la retención de sodio en la cirrosis hepática.

2.- Alteraciones hemodinámicas de la cirrosis hepática.

La presión portal puede aumentar tanto por un incremento del flujo sanguíneo como por una elevación de la resistencia vascular, o por ambos factores. El hígado es el principal lugar de resistencia al flujo sanguíneo portal y en la cirrosis existe un aumento de la resistencia vascular hepática que puede ser consecuencia de la desestructuración que sufre la arquitectura vascular o de la existencia de algún componente activo que pueda ser modificado farmacológicamente. Este obstáculo origina la aparición de cortocircuitos (colaterales porto-sistémicas) que eluden el hígado y permiten el paso de sangre a la circulación sistémica.

Por otro lado, el aumento del flujo sanguíneo portal es el resultado de una marcada vasodilatación arteriolar esplácnica, cuyo mecanismo no es bien conocido, si bien se cree que en su aparición juegan un papel muy importante sustancias vasoactivas de origen esplácnico, que llegan a la circulación sistémica y que normalmente metaboliza el hígado y/o cuya producción está aumentada en la hipertensión portal (Bosch y García-Pagán, 1992).

A nivel sistémico, los pacientes y animales de experimentación con cirrosis presentan una disfunción circulatoria llamada circulación hiperdinámica y caracterizada por hipotensión arterial, marcada disminución de las resistencias vasculares periféricas, hipervolemia y alto gasto cardíaco. La reducción de las resistencias arteriolas no es el resultado de una distensión pasiva de los vasos secundaria al incremento de volumen plasmático, sino la consecuencia de una vasodilatación activa aparentemente debida al incremento del nivel de vasodilatadores en el plasma. La vasodilatación y el incremento del flujo sanguíneo son especialmente manifiestos en el territorio vascular esplácnico, como ya hemos visto. La vasodilatación periférica es el fenómeno hemodinámico inicial y fundamental para el desarrollo de la circulación hiperdinámica, aunque probablemente necesite del concurso de otro factor, como es la expansión de volumen plasmático, que posibilite el aumento del gasto cardíaco y se exprese plenamente el estado de circulación hiperdinámica (Albillos y cols, 1993). En el lado venoso del árbol vascular existe venodilatación y aumento de la capacidad venosa total, consecuencia no de un cambio en el tono vascular sino como adaptación al aumento de la volemia. Recientemente, Ryan y cols (1996) han encontrado una hiporeactividad a noradrenalina, mediada por NO, en un estudio in vitro realizado en venas del antebrazo procedentes de pacientes cirróticos, lo que sugeriría una posible participación activa del lado venoso.

La patogénesis del estado de circulación hiperdinámica todavía no ha sido clarificada, aunque parece evidente la participación de sustancias vasodilatadoras de origen esplácnico, entre los que figuran el glucagón, la prostaciclina, adenosina, colecistoquinina, péptido intestinal vasoactivo, sustancia P y neurotensina. Los datos vigentes sugieren la existencia de uno o varios de estos factores circulantes, que poseerían propiedades vasodilatadoras per se o actuarían estimulando la síntesis y liberación de otros vasodilatadores. Existen evidencias directas de que el glucagón juega un papel destacado y de hecho sus niveles se hallan aumentados en animales y enfermos con hipertensión portal. El glucagón tiene propiedades

vasorrelajantes intrínsecas y, además, reduce indirectamente la sensibilidad vascular a vasoconstrictores circulantes. Sin embargo, la supresión del glucagón disminuye sólo en un 40% el grado de vasodilatación esplácnica que se observa en ratas con hipertensión portal crónica, lo que sugiere la existencia de otros factores (Kiel y cols, 1985; Pizcueta y cols, 1990). Otros factores implicados han sido el péptido natriurético atrial, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, la bradiquinina, los ácidos biliares y, más recientemente, sustancias de origen endotelial, entre las que destaca el NO, el más potente vasodilatador conocido y que juega un papel clave en la función de control vascular del endotelio, en la regulación de la presión arterial y en la homeostasis circulatoria.

La mayoría de las sustancias endoteliales son el arquetipo de hormona paracrina, es decir, efectivas sólo en la vecindad de las células que las sintetizan. Dado que el NO es una hormona que actúa sólo localmente y la vasodilatación arterial es un fenómeno sistémico, es presumible que exista un aumento generalizado de la actividad de la enzima encargada de la síntesis de NO en la mayoría de los lechos vasculares del organismo. Así pues, desde que hace unos años Vallance y Moncada (1991) postularon que la existencia de un aumento de la síntesis de NO podía jugar un papel determinante en la patogénesis de la circulación hiperdinámica, muchos autores han demostrado la existencia de un exceso de NO en la cirrosis, utilizando inhibidores de su síntesis en diferentes modelos experimentales de hipertensión portal (Pizcueta y cols, 1992; Clària y cols, 1992; Sieber y Groszmann, 1992; Bomzon y Blendis, 1994; Fernández y cols, 1996). En cuanto a otros factores endoteliales, el papel desempeñado por los derivados del ácido araquidónico como la prostaciclina (PGI₂) parece ser también significativo (Bruix y cols, 1985; Sitzman y cols, 1991). Por último el EDHF, o factor hiperpolarizante derivado del endotelio produce una relajación independiente del NO que también requiere la presencia del endotelio intacto, y aunque no ha sido identificado todavía, algunos autores le atribuyen cierto papel en la cirrosis y en la hipertensión portal (Moreau y cols, 1992 y 1994; Atucha y cols, 1998).

Hiporreactividad vascular a vasoconstrictores circulantes.

La existencia de hiporreactividad vascular a agentes vasopresores, como noradrenalina (NA), vasopresina (ADH) y angiotensina II (AII), (Murray y Paller, 1985 y 1986; Kiel y cols, 1985; Pizcueta y cols, 1990), es un hecho claramente demostrado en pacientes y en modelos experimentales de hipertensión portal crónica. Dicha hiporreactividad no puede ser atribuida a

un fallo en los receptores por dos razones. En primer lugar, por la existencia de un número y afinidad similar de los receptores vasculares de AII, como demuestran Murray y Paller (1985). Liao y cols (1994) tampoco encuentran cambios en la afinidad o número de los receptores alfa₁-adrenérgicos en arteria mesentérica o del rabo de ratas con hipertensión portal. En segundo lugar, por la presencia de hiporrespuesta al KCl, una sustancia despolarizante que causa vasoconstricción por mecanismos independientes de receptores (Sieber y Groszmann, 1992).

Como se ha sugerido, la hiporreactividad vascular podría estar causada por el aumento del nivel de vasodilatadores circulantes. Estudios experimentales *in vivo* han demostrado que el glucagón disminuye la sensibilidad vascular sistémica e intestinal a NA (Kiel y cols, 1985; Pizcueta y cols, 1990). Sin embargo, la hiporrespuesta persiste en preparaciones *in vitro*, donde los vasos son extraídos fuera del organismo en estudio y, por tanto, de las influencias de los vasodilatadores circulantes, descartando ésta causa como única responsable. Así, Sieber y Groszmann (1992), objetivaron una hiporrespuesta vascular a NA, ADH y KCl en un sistema *in vitro*, como es el lecho vascular mesenterico aislado de ratas con LVP y en el que el bloqueo de la síntesis de NO revirtió esta hiporrespuesta. Por otra parte, Clària y cols (1994), demuestran una mayor respuesta vascular a vasodilatadores dependientes de NO endotelial, como la acetilcolina (ACH) en anillos aórticos de animales cirróticos y descartan una mayor sensibilidad del músculo liso al efecto vasodilatador del NO en ratas cirróticas, ya que la relajación con nitroprusiato sódico (NPS) fue similar a la de las controles. A estos hallazgos, que sustentan el papel del NO en la alteración de la respuesta vascular en la cirrosis hepática, se han unido numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, en diferentes lechos vasculares, en humanos y en diferentes especies animales, tanto en la hipertensión portal crónica como en los diferentes tipos de cirrosis experimental (Castro y cols, 1993; Obberg y cols, 1995; Albillos y cols, 1995; Cahill y cols, 1995; Atucha y cols, 1996b).

A pesar de todo, no existe unanimidad plena para afirmar que exista una participación irrevocable del NO en esta alteración vascular, ni siquiera en la existencia de la hiporreactividad vascular a vasoconstrictores. De hecho, algunos autores han encontrado un aumento de la respuesta vascular *in vitro* a NA en los tres modelos de hipertensión portal (Bomzon y cols, 1991; Cawley y cols, 1995). Otros, en cambio, no encuentran diferencias en la reactividad vascular entre animales cirróticos y controles (Villamediana y cols, 1988) y por

último también ha sido descrita una disociación entre la sensibilidad presora in vivo y la respuesta in vitro a AII en ratas con cirrosis experimental (Leehey, 1993).

Alejándonos de la implicación del NO en la cirrosis hepática, Murray y Paller (1985 y 1986) propusieron un defecto postreceptor, en las células musculares lisas vasculares, como posible causa de la resistencia presora a la AII y ADH en las ratas cirróticas. Esta idea está siendo evaluada en la actualidad por varios grupos de investigadores, quienes proponen la afectación de diferentes pasos, posteriores a la unión del agonista-vasoconstrictor a su receptor (Hartleb, 1995; Atucha y cols, 1996; Huang, 1997; Atucha y cols, 1998), o una alteración intrínseca que afecte al sistema contráctil de las células del músculo liso vascular (Leehey, 1993; Castro y cols, 1994).

3.- Alteraciones de la función renal en la cirrosis hepática.

La asociación entre la cirrosis hepática y la insuficiencia renal incluye dos aspectos fisiopatológicos como son el carácter funcional de los cambios renales y su relación con las alteraciones circulatorias. La mayoría de las alteraciones renales que ocurren en la cirrosis son de carácter funcional, es decir, en ausencia de daño histológico. De hecho, cuando riñones de pacientes cirróticos son trasplantados a personas con un hígado sano, la retención de sodio y agua no ocurre; y viceversa, los pacientes afectados por un síndrome hepatorenal trasplantados de hígado normalizan la función renal a las pocas semanas (Rimola y cols, 1987). Esto sugeriría que en la patogénesis de esta retención estarían implicados mecanismos extrarrenales (Martin y Schrier, 1997).

Así, según la teoría de la vasodilatación periférica, la vasodilatación arteriolar esplácnica secundaria a la hipertensión portal es el evento inicial; la activación del SRAA, SNS y ADH, mediada por la estimulación de los barorreceptores debido al infrallenado del compartimento vascular, desproporcionalmente aumentado respecto al volumen sanguíneo circulante, es el paso intermedio y la retención de sodio y agua sería la consecuencia final de estas alteraciones hemodinámicas.

El cambio más precoz en la función renal de la cirrosis es una disminución de la capacidad renal para excretar sodio, ya presente en pacientes con cirrosis compensada. Cronológicamente, es seguida por una alteración para la excreción de agua libre, estimada como aclaramiento de agua libre tras una sobrecarga de agua y es normal en pacientes con cirrosis compensada y en un porcentaje significativo de pacientes con ascitis (Camps y cols,

1987). La anomalía que aparece en último término es una vasoconstricción renal que conduce a una reducción del flujo sanguíneo renal (FSR) y de la tasa de filtración glomerular (TFG). El rango puede oscilar desde una alteración moderada hasta una intensa vasoconstricción. El resultado final es un fracaso renal severo (síndrome hepatorenal) que constituye la anomalía renal más grave, siendo, en este caso, el trasplante hepático la alternativa terapéutica más útil (Arroyo y cols, 1996).

Fisiopatología de los trastornos de la función renal.

3.1 Retención de sodio.

Durante años ha existido una intensa polémica respecto a la relación temporal entre la retención de sodio y la formación de ascitis. Actualmente se admite que la retención de sodio es anterior al desarrollo de ascitis, lo que fue inicialmente demostrado por Levy y Allotey (1978) y posteriormente confirmado por López Novoa y cols (1980). Sin embargo, la polémica continúa en lo que se refiere al mecanismo que inicia dicha retención. Respecto a este tema, se debaten dos posturas correspondientes a las teorías con más vigencia en la actualidad, que son la teoría de la vasodilatación periférica y la del sobrellenado. La primera defiende que es la vasodilatación arterial periférica la que origina una disminución del volumen plasmático efectivo y, consecuentemente, un aumento de los sistemas hormonales presores y retenedores de sodio, la causa inicial de la retención de sodio en la cirrosis. La segunda apoya la existencia de un barorreflejo hepatorenal que estimularía la actividad nerviosa simpática renal, lo que iniciaría la reabsorción de sodio.

La presencia de ascitis está invariablemente asociada a retención renal de sodio, cualquiera que sea la causa de su inicio, tanto en el paciente cirrótico como en el animal de experimentación, y el grado de retención varía considerablemente según los casos. En muchos pacientes, la retención de sodio tiene lugar con una TFG normal, y en otros está disminuida. En el primer grupo hay una excesiva reabsorción tubular de sodio en el túbulo proximal y en la parte distal de la nefrona, mientras que en el segundo, una disminución del sodio filtrado puede jugar un papel importante en esta retención. El mecanismo que produce un aumento en la reabsorción tubular de sodio en la cirrosis es multifactorial. A continuación, haremos un breve repaso de los principales factores implicados en la retención de sodio.

a) Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA).

El SRAA se encuentra activado en la mayor parte de los cirróticos con ascitis y en todos los que presentan insuficiencia renal funcional (Arroyo y cols, 1983; Epstein, 1996c). A pesar de que la renina y la aldosterona se catabolizan en el hígado, se sabe que el hiperreninismo y el hiperaldosteronismo presentes en la cirrosis son debidos a un aumento de su producción y no a una reducción de su catabolismo hepático (Ginès, 1992). Los mecanismos que intervienen en la liberación de renina serían principalmente la hipoperfusión renal, la disminución del volumen plasmático efectivo y la estimulación del SNS. La AII, componente activo del sistema, estimula la secreción de aldosterona a nivel de la cápsula suprarrenal, lo que condiciona un aumento en la reabsorción de sodio en los túbulos distal y colector. La AII podría contribuir al mantenimiento de la presión arterial y de la hemodinámica renal en pacientes cirróticos con y sin ascitis (Gentilini y cols, 1993), ya que se encuentra entre las sustancias de mayor poder vasoconstrictor. Citar también que la expresión renal del gen de renina está aumentada en animales con LCB antes de que la actividad de renina plasmática se altere, lo cual sugiere que el SRAA intrarrenal podría ser uno de los principales factores implicados en el inicio de la retención de sodio (Ubeda y cols, 1994). Existen evidencias de que la aldosterona desempeña un papel primordial en la patogénesis de la retención de sodio (Epstein, 1996d). Así, se sabe que hay una estrecha correlación inversa entre el grado de hiperaldosteronismo y la excreción renal de sodio. Además, la administración de espironolactona, que antagoniza la acción de la aldosterona, puede revertir la retención de sodio en la mayor parte de las ocasiones. Por último, estudios experimentales han demostrado una estrecha relación temporal entre el desarrollo de hiperaldosteronismo y la retención renal de sodio, en ratas con cirrosis experimental (Jiménez y cols, 1985).

b) Sistema nervioso simpático (SNS).

El sistema nervioso simpático juega un papel importante en la retención de sodio de la cirrosis hepática (Bichet y cols, 1982; DiBona y Sawin, 1991; Henriksen y Ring-Larsen, 1994). La concentración plasmática de NA en la circulación sistémica, un índice de activación del SNS, está aumentada en la mayoría de pacientes con ascitis y es normal o está ligeramente elevada en ausencia de ascitis (Braillon y cols, 1992). La denervación bilateral renal, un método que permite valorar el papel del SNS, incrementa la excreción urinaria de sodio en cerdos con ligadura del colédoco (Zambraski, 1985). La evidencia más directa de una hiperactividad del SNS en la cirrosis con ascitis ha sido obtenida por estudios que demuestran

un aumento de la liberación de NA tritriada total en plasma, o midiendo directamente la actividad nerviosa simpática de los nervios musculares periféricos (Floras y cols, 1991). Otros estudios indican la existencia de un aumento generalizado de la actividad del SNS, incluyendo riñones, órganos espláncnicos, corazón, músculo y piel (Arroyo y cols, 1996). La disminución del volumen sanguíneo efectivo y la hipotensión arterial también constituirían un estímulo para el aumento de la actividad del SNS, cuyas acciones hemodinámicas se deben a una acción directa de las catecolaminas (principalmente NA) y a una estimulación de la liberación de renina y ADH. En el riñón, la acción del SNS produce una vasoconstricción y estimula directamente la reabsorción de sodio en el túbulo proximal, asa de Henle y nefrona distal.

A pesar de todas estas evidencias que indican un papel del SRAA y del SNS en la patogénesis de la retención de sodio en la cirrosis, una proporción significativa de pacientes con cirrosis y ascitis y retención de sodio muy marcada, tienen niveles normales de actividad de renina plasmática, aldosterona y NA. Esto indica que la retención puede ocurrir en ausencia de la activación de estos dos sistemas antinatriuréticos (Saló y cols, 1995), y sugiere que también están envueltos otros factores.

c) Factores natriuréticos endógenos.

Uno de los principales estímulos para la liberación del factor natriurético atrial (ANF) es la distensión atrial, por lo que una reducción en el volumen sanguíneo central, hecho descrito en pacientes cirróticos, conduciría a una disminución de la secreción de ANF. Así, Bonkovsky y cols (1988) descubrieron que los pacientes cirróticos con ascitis tenían unos niveles de ANF disminuidos, si bien más de la mitad de estos pacientes estaban siguiendo una terapia diurética. Sin embargo, la mayoría de los estudios han demostrado que los niveles plasmáticos de ANF y BNF (brain natriuretic factor) en pacientes con cirrosis y ascitis, son apropiados o están aumentados (Epstein, 1996a). Este hecho indicaría que la retención de sodio no es debida a una síntesis y/o liberación deficitaria de estas hormonas natriuréticas (Wong y Blendis, 1994).

No obstante, hay una clara disociación entre los niveles circulantes de estos factores y sus acciones natriuréticas. En este sentido, López y cols (1987) demostraron una alteración de la respuesta diurética y natriurética al ANF, en ratas con cirrosis y ascitis, que está relacionada con las alteraciones sistémicas de esta enfermedad. Sin embargo, otros autores han señalado la existencia de una resistencia renal a la acción del ANF, tanto al endógeno (Xiping y cols,

1996), como al administrado exógenamente (Salerno y cols, 1988). En contraste a estos hallazgos, Angeli y cols (1994) destacan la importancia de los péptidos natriuréticos endógenos en el mantenimiento de la perfusión renal, TFG y regulación del SRAA en ratas cirróticas con ascitis, excluyendo que desempeñen algún papel en la homeostasis de la presión arterial.

En general, la variabilidad plasmática en los niveles de ANF puede ser atribuida a muchos factores entre los que se incluyen la técnica de extracción, radioinmunoensayo, la postura de los sujetos, variaciones en la ingesta de sodio, tratamiento diurético concomitante, y posibles variaciones en el aclaramiento hepático y renal del ANF. En parte, estas discrepancias también podrían ser explicadas por los distintos estadios de la cirrosis. Siguiendo la teoría del suprallenado, en fases iniciales de la enfermedad aumentos pequeños de la volemia y de la distensión de la aurícula pueden elevar los niveles de ANF o desplazar el umbral para su liberación y como los pacientes siguen reteniendo sodio, el ANF continuaría aumentando. Sin embargo, esto no explicaría porqué en fases tardías, cuando la ascitis es masiva y los fluidos tienden a localizarse fuera del compartimento vascular, disminuyendo el volumen central, los niveles de ANF continúan elevados. En este sentido, se ha sugerido que el volumen atrial no se afecta sustancialmente por una disminución del volumen sanguíneo central, o que la presencia de ascitis altera las relaciones espaciales en el corazón, o bien que existan factores mecánicos, incluyendo la estimulación alfa-adrenérgica o por otros vasoconstrictores, capaces de distender la aurícula y aumentar la liberación de ANF (Wong y Blendis, 1994; Epstein, 1996b).

d) Endotelina (ET).

Las concentraciones plasmáticas de endotelina-1 (ET-1) están significativamente aumentadas en animales y pacientes con cirrosis y ascitis (Leivas y cols, 1995; Uchiarra y cols, 1992) y este aumento está asociado con una disfunción renal. El mecanismo preciso de esta elevación y su papel fisiopatológico en la cirrosis permanece sin ser aclarado (Goligorsky y Nord, 1996). Los niveles elevados de endotoxina circulante, existentes en la cirrosis, son un estímulo conocido para la síntesis de ET. Junto a éste, la hipoxia, debida a la vasoconstricción renal que tiene lugar en estadios avanzados de la cirrosis, constituye un estímulo adicional de la síntesis de ET en el riñón (Lüscher y cols, 1993). Además, parece poco probable que el aumento de los niveles plasmáticos de esta sustancia se deba a una reducción de su

aclaramiento hepático (Asbert y cols, 1993). Aunque la infusión de ET a humanos sanos produce una disminución en la excreción de sodio (Rabelink y cols, 1994), Clària y cols (1991) han demostrado que la administración exógena de endotelina tiene efectos natriuréticos en ratas cirróticas con ascitis, que están relacionados con acciones de la ET a nivel tubular. Un estudio reciente evidencia que la concentración de ET y la densidad de los receptores ET_B están significativamente aumentadas en la médula renal de ratas cirróticas, y esta alteración indica que el sistema paracrino de la endotelina renal contribuye a la regulación de la excreción de agua en ratas cirróticas con ascitis (Hoher y cols, 1996).

e) Quininas.

Los estudios acerca del papel del sistema renal calicreina-quinina en la cirrosis son escasos (Pérez-Ayuso y cols, 1984b; Solomon y cols 1988). La bradiquinina cumple un importante papel como vasodilatador renal fisiológico (Carretero y cols, 1995), por lo que alteraciones en su formación podrían contribuir a las alteraciones hemodinámicas y excretoras renales que ocurren en la cirrosis hepática. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones publicadas relacionan la actividad de este sistema con la medida de la calicreina urinaria, y hasta la fecha no hay una prueba clara de que la medida de calicreina en orina sea paralela a la generación intrarrenal de quininas.

f) Alteraciones intrarrenales de la cirrosis.

Existe una relación entre la presión de perfusión renal (PPR) y la distribución del flujo sanguíneo en las diferentes regiones del riñón, que a su vez está estrechamente ligada a la estructura microvascular renal. En las situaciones en las que la perfusión renal es mantenida por debajo de los límites de autorregulación se produce un llamativo descenso del volumen vascular en la corteza, mientras que la médula se afecta menos (Bentley y cols, 1994). Del mismo modo, en la estenosis renovascular crónica la corteza permanece infraperfundida mientras la circulación medular está preservada (Lerman y cols, 1996). Esta redistribución es lógica ya que las nefronas de asa más larga son perfundidas por glomérulos yuxtamedulares y en ellas el tiempo de tránsito de los fluidos es mayor, siendo mayor también la capacidad para reabsorber sodio que las nefronas de asa más corta. Este acoplamiento de la vasculatura renal a la función tubular podría determinar estados fisiológicos y/o patológicos relacionados con cambios en la excreción de sodio. En este sentido, Saló y cols (1993), han señalado que una

alteración capilar peritubular podría influir de forma importante en la retención de sodio de pacientes cirróticos.

Viejos estudios en pacientes con ascitis encontraron una disminución de la perfusión renal con vasoconstricción en corteza y relativo mantenimiento del flujo sanguíneo medular (Kew y cols, 1971; Sacerdoti y cols, 1986). Estos datos son compatibles con la existencia de una redistribución del flujo lejos de la corteza. Atucha y cols (1993a) descubrieron una relación alterada entre la presión de perfusión y la natriuresis en ratas cirróticas con ascitis y denervación renal, postulando la intervención de mecanismos intrarrenales en la retención renal de sodio de la cirrosis. Aunque el aumento de presión mejora la respuesta diurética y natriurética, las ratas cirróticas, con y sin ascitis, reabsorbieron más del sodio y agua filtrados que sus controles a todos los niveles de presión de perfusión estudiados en este trabajo. Los cambios hormonales descritos previamente, como son los niveles elevados de AII y aldosterona, podrían reflejarse intrarrenalmente e intervenir en esta alteración.

Antes del desarrollo de ascitis, los animales cirróticos son habitualmente normotensos, con FSR y TFG dentro de la normalidad (Atucha y cols, 1993a y b). Sin embargo, el flujo sanguíneo papilar (FSP) está reducido, y esto podría contribuir a la menor excreción basal de agua y sodio en la cirrosis. Numerosos factores nerviosos y humorales cuyos niveles están alterados en la cirrosis son capaces de afectar a la circulación medular y pueden tener un papel en la disminución del FSP. Además, los animales cirróticos presentan incrementos menores del FSP, en respuesta a maniobras que aumentan la función excretora renal (expansión de volumen, infusión de vasodilatadores y aumentos en la presión de perfusión renal), respecto a los animales controles (Atucha y García-Estañ, 1996). Junto a estos también participarían en esta alteración, un aumento de la permeabilidad capilar (Caramelo y cols, 1986) y una respuesta alterada de la presión hidrostática intersticial renal a estas maniobras excretoras. El reflejo tubular de estas alteraciones es una mayor reabsorción de sodio y agua, mediados por un menor lavado medular, una posible liberación de autacoides intrarrenales disminuida (NO, prostaglandinas) y un aumento de la generación local de AII (Atucha y García-Estañ, 1996). Otras alteraciones intrarrenales implicadas en la retención de sodio y agua en la cirrosis son una escasa redistribución intrarrenal de la TFG (López-Novoa y cols, 1984), una menor liberación de fluidos y sodio hacia zonas distales de la nefrona (Anderson y cols, 1976;

Abraham y cols, 1995), y cambios funcionales y estructurales en el segmento grueso del asa de Henle (Jonassen y cols, 1997)

3.2 Retención de agua.

Los pacientes y animales cirróticos también desarrollan una alteración de la capacidad renal para excretar agua libre de solutos. Ésta se estima como el aclaramiento de agua tras una sobrecarga acuosa y es normal en la cirrosis compensada y en una proporción significativa de pacientes con cirrosis y ascitis, aunque en la mayoría de éstos el aclaramiento de agua libre está reducido (Arroyo y cols, 1994). En la patogénesis de esta alteración están implicados varios factores:

a) *Hormona antidiurética (ADH).*

Distintos estudios han proporcionado evidencias que indican que la ADH juega un papel principal en la retención de agua que tiene lugar en pacientes y animales con cirrosis y ascitis (Arroyo y cols, 1994). Camps y cols (1987) demostraron que el defecto en la excreción de agua en la cirrosis está correlacionado cronológica y cuantitativamente con una hipersecreción de ADH. La explicación más probable para esta hipersecreción en la cirrosis estaría en relación con una estimulación no osmótica, ya que en esta enfermedad existe cierto grado de hiponatremia e hipoosmolaridad que suprimiría la liberación de ADH en condiciones normales. Este aumento en la secreción de ADH es debido a un aumento de su síntesis, ya que el contenido hipotalámico de su ARNm está aumentado en ratas cirróticas (Kim y cols, 1993). Además, la expresión del ARNm del canal de agua (Aquaporin 2), regulado por la ADH a través de los receptores V_2 en el túbulo colector, está aumentada en ratas cirróticas (Fujita y cols, 1995) con el consiguiente aumento de la reabsorción de agua. Estudios de Clària y cols (1989) han demostrado que el bloqueo de los receptores V_2 de ADH normaliza la excreción de agua de ratas cirróticas, lo cual enfatiza el papel de la ADH como mediador de la retención de agua de la cirrosis.

b) *Prostaglandinas renales (PGs).*

En condiciones normales existe un balance entre la actividad de los agentes vasoconstrictores endógenos y la generación intrarrenal de PGs. Este equilibrio parece conservarse en la cirrosis. Los enfermos cirróticos con ascitis presentan, como hemos visto, una marcada activación de los sistemas RAAA, SNS y un aumento de los niveles plasmáticos de ADH. Por un lado la AII, la NA y la ADH aumentarían la síntesis renal de PGs. Por otra

parte, la PGE₂ y la PGI₂ antagonizarían el efecto vascular de la AII y la NA y la acción hidrosmótica de la ADH. Se ha demostrado un aumento de la síntesis renal de PGs en pacientes y animales con cirrosis (Guarner y cols, 1986; Jiménez y Arroyo, 1993; Ros y cols 1995b), reflejado por un aumento en la excreción urinaria de PGE₂ y 6-keto-PGF_{1α} (metabolito de la PGI₂). Esta elevada síntesis renal de PGs es probablemente un mecanismo homeostático para mantener la hemodinámica renal y la excreción de agua libre dentro de los límites normales. De hecho, la administración de antiinflamatorios no esteroideos, que inhiben la síntesis de PGs, tiene un efecto deletéreo para la función renal en esta enfermedad (Leehey y cols, 1989; Pérez-Ayuso y cols, 1984a; Boyer y cols, 1979). Algunos autores han sugerido un aumento en la actividad de la ciclooxigenasa, por estímulos físicoquímicos (aumento del flujo sanguíneo) o agentes inflamatorios circulantes, para explicar la producción aumentada de PGs (Fernández y cols, 1996). Bannikuppe y cols (1996) suben un escalón más en la formación de PGs, y demuestran un aumento en la actividad renal y hepática de la fosfolipasa A₂ en ratas cirróticas. A pesar de todas estas evidencias, algunos trabajos han demostrado que en algunos grupos de pacientes con cirrosis la producción renal de PGE₂ es normal o está disminuida (Pérez-Ayuso y cols, 1984a). Estos casos son en los que existe una mayor incapacidad para diluir la orina puesto que además de la ausencia de un aumento urinario de la PGE₂, no pueden contrarrestar a la ADH.

c) Otros factores.

Otra posibilidad, para explicar la alteración de la excreción de agua en la cirrosis, podría ser una liberación reducida del filtrado glomerular hacia los segmentos distales de la nefrona. En esta zona, si el fluido liberado a la nefrona distal ha sido adecuado, el cloruro sódico es eliminado selectivamente del filtrado, sin agua, resultando en un aclaramiento positivo de agua, en ausencia de ADH. El aclaramiento de litio, que estima la liberación de fluido distal, está disminuido en pacientes con cirrosis y ascitis (Angeli y cols, 1992). Del mismo modo se ha propuesto que una disminución de la entrega distal de sodio sería la responsable del escape del sodio a la acción de la aldosterona y de la resistencia al ANF, en la cirrosis descompensada (Abraham y cols, 1995). Esta disminución del filtrado glomerular unida a una excesiva reabsorción de sodio proximal, son factores que contribuyen a la alteración de la excreción de agua libre en la cirrosis.

3.3 Síndrome hepatorenal (SHR).

Es la anomalía de aparición más tardía en la cirrosis y el rango de intensidad de la vasoconstricción renal varía desde una modesta alteración, sólo detectable utilizando técnicas que midan flujo plasmático renal y TFG, hasta una vasoconstricción intensa dando lugar a un fracaso renal severo (SHR) de pronóstico pésimo, más de un 90% de mortalidad. Este síndrome ocurre en pacientes con enfermedad crónica hepática, avanzado fracaso hepático e hipertensión portal, en ausencia de cualquier otra causa de patología renal identificable. En pacientes cirróticos, es frecuentemente precipitado por una hipovolemia (diuréticos o sangrado gastro-intestinal), tratamiento con AINEs o sepsis, y se caracteriza por una disfunción renal, en el seno de alteraciones llamativas en la circulación arterial y estimulación marcada de muchos sistemas vasoactivos endógenos, que ya hemos descrito previamente, y que tienen en el SHR su máxima expresión. Las sustancias implicadas en la vasoconstricción son la AII, NA, ADH y endotelina, cuyas elevaciones en plasma se correlacionan inversamente con el FSR y la TFG. Por otro lado, una alteración en la síntesis de sustancias vasodilatadoras también ha sido implicada en la patogénesis de la vasoconstricción, como es la disminución de la producción renal de prostaglandinas (PGE_2 y PGI_2). Las PGs son de extrema importancia, junto al aumento de NO y factores natriuréticos, para contrabalancear los elevados niveles de vasoconstrictores circulantes y mantener el FSR y la TFG (Arroyo y cols, 1996). En el riñón, la vasoconstricción conduce a un descenso de la TFG, causada por una disminución tanto del FSR como de la fracción de filtración renal (Moore, 1997). En la circulación extrarrenal, hay una vasodilatación arteriolar que da lugar a una reducción de la resistencia sistémica total e hipotensión arterial, causando una reducción de la presión de perfusión renal.

III- ÓXIDO NÍTRICO.

El NO es un radical libre inorgánico, de fórmula $\cdot\text{NO}=\text{O}$, mediador de numerosos eventos fisiológicos. El NO reactivo es un gas incoloro, fácilmente difundible a través de las membranas biológicas, y muy inestable, ya que se inactiva rápidamente en contacto con moléculas como la hemoglobina, dando lugar a una oxidación a NO_2 que en solución forma nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Todo esto explica su vida media tan corta, entre 5 y 8 segundos. La formación de NO en células de mamíferos está catalizada por una familia de

isoenzimas llamadas sintasas de óxido nítrico (NOS) de localización intracelular. Todas las isoformas usan L-Arginina y O₂ molecular como sustratos. Las enzimas son dioxigenasas dependientes de NADPH que requieren tetrahidrobiopterina (BH₄), flavín-adenin dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN) como cofactores. Todas ligan calmodulina y contienen un grupo hemo. La síntesis de NO representa una reacción de oxidación de uno de los átomos de nitrógeno contenido en el grupo guanidino del aminoácido L-Arginina, que da como resultado NO y el coproducto L-Citrulina.

1.- Isoenzimas de la sintasa de óxido nítrico (figura 2).

Según el orden cronológico de purificación y aislamiento de las cadenas de DNA, se denominan como I, II y III a los tres tipos de isoenzimas (Förstermann y cols, 1994).

-*Isoenzima I*: Constitutivamente presente en células neuronales centrales y periféricas y en algunas células epiteliales. También se le denomina como bNOS (brain-NOS) o como bc-NOS (brain-constitutive-NOS).

-*Isoenzima II*: Su actividad puede ser inducida por lipopolisacárido y citoquinas en multitud de células diferentes. Ha sido encontrada en macrófagos de ratones (preferentemente en hígado, riñón y pulmón), músculo liso de rata, hepatocitos de rata y humanos, condrocitos

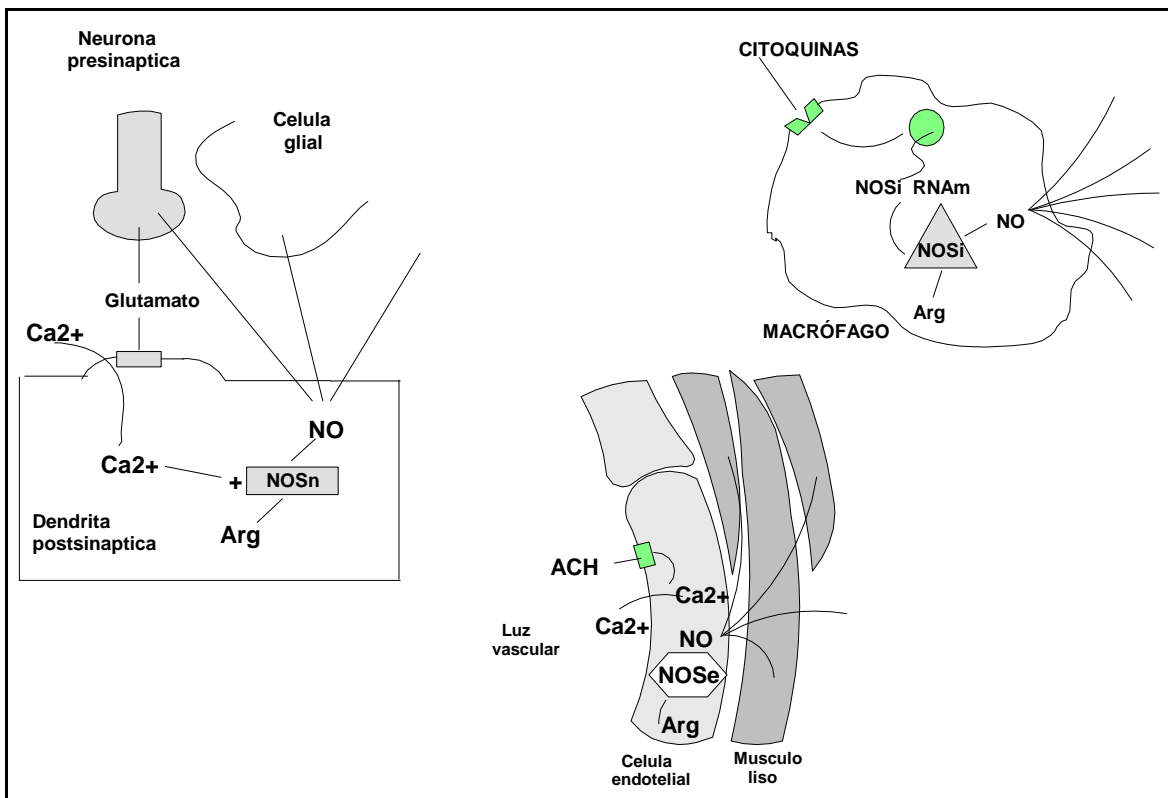


Figura 2. Isoenzimas de la sintasa de óxido nítrico (NOS).

humanos y una línea de células de adenocarcinoma colorrectal humano. Hasta el momento no hay evidencias de que exista más que una enzima inducible. Referido en la literatura como iNOS (sintasa inducible de NO).

-Isoenzima III: Descubierta principalmente en células endoteliales en las que se expresa de forma constitutiva (ecNOS; endothelial-constitutive-NOS). Ha sido hallada en células endoteliales de venas y arterias, y en el epitelio tubular renal.

Knowles y Moncada (1994) denominan y definen a los isoenzimas según el lugar donde fueron identificados originalmente. Los primeros sistemas de mamíferos donde la síntesis de NO fue demostrada son el endotelio vascular (eNOS), el cerebro (nNOS) y los macrófagos activados (iNOS). Así, la nNOS sintetiza NO en una neurona en respuesta a glutamato, la iNOS sintetiza NO en un macrófago tras inducción con citoquinas y la eNOS sintetiza NO en la célula endotelial vascular en respuesta a ACH y otros agonistas.

Clásicamente se han descrito dos tipos del enzima: *constitutivo e inducible*. La unión de la calmodulina a la isoforma constitutiva (I o bNOS, bcNOS, nNOS; y III o eNOS, ecNOS) es promovida por iones de calcio; por tanto, su actividad está regulada por la concentración de calcio intracelular. Sin embargo, la calmodulina está unida fuertemente como grupo prostético a la sintasa inducible (II o iNOS), manteniéndola en un estado de actividad que es independiente del calcio intracelular (Busse y cols, 1993a y b, Southan y Szabó, 1996).

2.- Mecanismos de liberación del NO.

El NO puede ser liberado por multitud de vías (figura 3):

2.1 Basal: Es una liberación continua de NO por las células endoteliales no estimuladas. Éstas producen cantidades significativas de NO en condiciones de reposo, en ausencia de flujo sanguíneo y/o agonistas. La formación de NO por debajo del nivel basal, lo que es posible cultivando células endoteliales en condiciones estáticas, parece ser sustancialmente más pequeña que en las células endoteliales nativas. Las células endoteliales podrían contener sintasas dependientes e independientes del Ca^{2+} y ésto reflejaría la expresión de una sintasa inducible en células endoteliales nativas que contribuiría a la liberación basal de NO y que estaría causada por la presencia continua de citoquinas en la vecindad de la pared del vaso sanguíneo in vivo (Busse y cols, 1993b).

2.2 Estimulada.

a) Por agonistas: Estimulan la liberación del NO por encima del nivel basal. Puede ser de dos tipos, dependiente de receptor como la que producen la ACH, el ATP o la bradiquinina e independientes de receptor, como la que consiguen los ionóforos del calcio, algunos policationes o los inhibidores de la Ca^{2+} -ATP-asa.

Los agonistas, dependientes e independientes de receptor, evocan una liberación de Ca^{2+} intracelular desde los almacenes intracelulares, mediado por un aumento transitorio de inositol-1, 3,5-trifosfato (IP_3) y por un influjo más sostenido de Ca^{2+} a través de la membrana desde el espacio extracelular. El IP_3 , es formado bajo la activación de una fosfolipasa C. El aumento de Ca^{2+} intracelular conduce a la apertura de canales de K^+ activados por el Ca^{2+} , que resulta en una salida de K^+ fuera de la célula. Por un lado, la hiperpolarización resultante contrarresta los efectos despolarizantes del influjo de Ca^{2+} y, por otro, la salida de K^+ contribuye a sostener el influjo de Ca^{2+} . Además, los agonistas dependientes de receptor, como la bradiquinina, pueden aumentar la sensibilidad al Ca^{2+} de los canales de K^+ , vía un mecanismo dependiente de una proteína G.

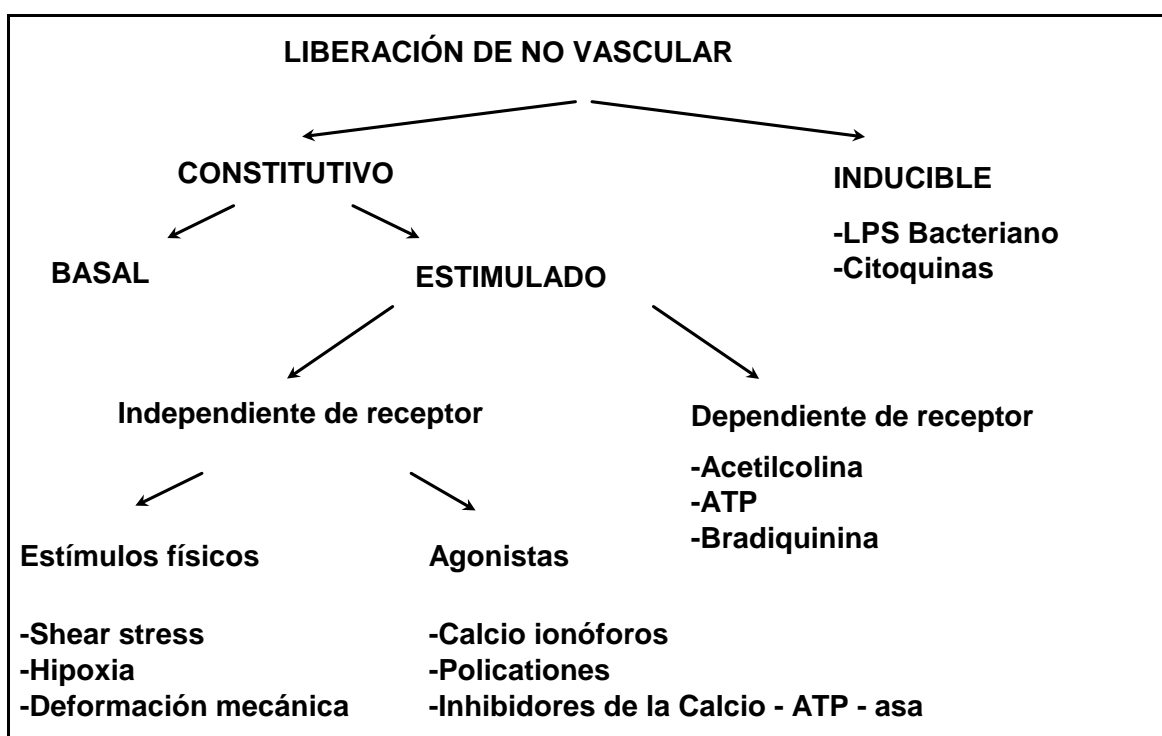


Figura 3. Mecanismos de liberación de óxido nítrico (NO).

b) Por agentes físicos. Estos son el *shear stress* (o estrés por rozamiento del flujo), el estiramiento pulsátil de la pared del vaso y una baja presión parcial de O₂. Puede representar el mecanismo fisiológico más importante de liberación de NO desde el endotelio vascular. La liberación producida por el *shear stress* parece ser el factor principal que regula el tono vascular y, de hecho, nutre de flujo sanguíneo a órganos activos mientras que la liberación mediada por agonistas puede ser considerada como una reserva para satisfacer los requerimientos locales transitorios de concentraciones más altas de NO, por ejemplo contrarrestando la formación de microtrombos. Es concebible que el avance viscoso causado por el flujo sanguíneo sea percibido por estructuras localizadas en la parte externa de la membrana celular. Este "sensor" de *shear stress* no ha sido identificado, aunque podría estar acoplado a canales iónicos, al citoesqueleto o a almacenes de Ca²⁺ ligados a membrana. La hipoxia induce vasodilatación en una variedad de lechos vasculares. Así, las células endoteliales liberan autacoides vasoactivos, como NO y PGI₂, en respuesta a la hipoxia. Aunque las enzimas NOS y cicloxigenasa requieren al O₂ como sustrato, su síntesis está aumentada porque el incremento crucial de Ca²⁺ intracelular tiene lugar dentro del rango bajo pero fisiológico de presión de O₂ (20-50 mmHg).

Por último, el NO de origen inducible se expresa únicamente después de una inducción transcripcional, en presencia de lipopolisacáridos bacterianos y/o citoquinas. Se localiza en células activadas por citoquinas, principalmente en macrófagos y células musculares lisas. La sintasa inducible no parece estar sujeta a ningún mecanismo de control celular más que la disponibilidad de la L-Arginina y/o los cofactores necesarios.

3.- Inhibidores de la sintasa de NO.

3.1 Análogos estructurales de la L-Arginina: muchos análogos de la L-arginina son inhibidores de la NOS, en particular aquéllos en los que es sustituido uno o ambos nitrógenos del grupo guanidino terminal. El mecanismo de inhibición de la actividad de la NOS implica la ocupación del lugar de unión del sustrato al enzima. La N⁰-Nitro-L-Arginina (L-NNA), L-NAME y N⁰-Monometil-L-Arginina (L-NMMA) son los inhibidores más representativos de este grupo. Producen una inhibición competitiva, en mayor o menor grado, sobre ambos tipos de sintasa, constitutiva e inducible. El L-NAME es tan potente como el L-NNA para inhibir la NOS constitutiva, pero menos para la inducible. El L-NMMA no muestra una preferencia marcada por ninguna de las isoformas, siendo de los tres el de menor potencia.

3.2 Inhibidores específicos de la sintasa inducible de NO: la aminoguanidina (AG) ha sido descrita como un potente inhibidor específico de este enzima (Misko y cols, 1992; Hasan y cols, 1993; Griffiths y cols, 1993). Contiene en su estructura dos grupos nitrógeno-guanidínicos, químicamente equivalentes a los de la L-Arginina, conectados a hidracina que es la molécula que puede conferir la selectividad para inhibir la forma inducible del enzima. Algunos análogos estructurales de la L-Arginina parecen inhibir de manera más potente al enzima inducible que al constitutivo, aunque esta inhibición no es tan selectiva como la de la AG. El L-NMMA es tan potente como la AG para inhibir a la sintasa inducible y más potente que ella en la inhibición de la constitutiva, aunque ésta parece ser selectiva para la liberación basal de NO y no para la estimulada por agonistas.

3.3 Otros inhibidores: Otros inhibidores actúan sobre el NADPH y sobre la calmodulina causando también una inhibición competitiva. También se pueden usar los inhibidores de la BH₄ y otros agentes que interaccionan con el grupo hemo (el CO, el azul de metileno y el propio NO como sistema de inhibición feedback).

4.- Mecanismo de acción del NO.

El NO generado dentro de la célula endotelial difunde hacia el músculo liso, y activa a la guanilato ciclasa soluble que eleva los niveles de GMPc. El mecanismo intracelular por el cual el aumento de GMPc produce vasorrelajación parece estar mediado por la fosforilación de una proteína quinasa que, a su vez, produce la defosforilación de la unidad reguladora de la cadena ligera de miosina, iniciando el proceso de relajación del músculo liso vascular.

IV- ÓXIDO NÍTRICO Y CIRROSIS HEPÁTICA.

1.- El NO en las alteraciones hemodinámicas de la cirrosis hepática.

La inhibición de la NOS *in vivo* da como resultado la atenuación o reversión de los disturbios hemodinámicos y vasodilatación esplácnica en ratas con ligadura de la vena porta (Lee y cols, 1992) y en ratas cirróticas por inhalación crónica de Cl₄C (Clària y cols, 1992b). En este último estudio se demuestra un efecto presor dependiente de la dosis a la inhibición de la síntesis de NO mucho más importante en los animales cirróticos que en controles. Esta mayor sensibilidad a la inhibición de la NOS también ha sido mostrada en un estudio de Ramírez y cols (1994), en el que dosis no presoras en animales controles, modifican significativamente la presión arterial en animales con LCB.

Una de las mayores pruebas de la participación del NO en las alteraciones hemodinámicas de la cirrosis ha sido aportada por Niederberger y cols (1995a). En este trabajo, la normalización de la producción vascular de NO en animales cirróticos, estimada como la concentración aórtica de GMPc, se asoció a la normalización de la PAM, del índice cardíaco y de las resistencias vasculares sistémicas, así como a una reducción significativa de la actividad de renina plasmática y de la concentración de vasopresina. Albillos y cols. (1995), estudian a pacientes con cirrosis hepática alcohólica y por hepatitis C, y sus resultados, hiporrespuesta a fenilefrina y aumento de la respuesta a metacolina pero no a NPS, unido a elevados niveles séricos de NO_2^- y NO_3^- en los cirróticos, sugieren la mediación de un aumento en la síntesis de NO para su explicación. Este aumento de NO, también ha sido descrito recientemente en las venas porta y hepática de pacientes con cirrosis, medido como complejos nitrosil-hemoglobina (Battista y cols, 1997).

Evidencias indirectas acerca del papel del NO en las alteraciones hemodinámicas de la cirrosis han sido ampliamente sustentadas en las preparaciones *in vitro*. La administración de inhibidores de la NOS, una de las herramientas más utilizadas para demostrar este hecho, ha revertido parcial o totalmente la hiporrespuesta a diferentes vasoconstrictores, en distintos lechos vasculares y modelos de hipertensión portal (Sieber y Groszmann, 1992; Castro y cols, 1993; Karatapanis y cols, 1994; Obbergh y cols, 1995; Atucha y cols, 1996a; García-Estañ y cols, 1996). Además, este tipo de preparación permite manipulaciones como la desendotelización, por lo que en la mayoría de las ocasiones se combina esta técnica con la anterior, permitiéndonos diferenciar la participación de la sintasa localizada en músculo liso de la endotelial. Un aumento de la actividad sintética de NO endotelial ha sido propuesto como el mecanismo más probable para explicar, al menos en su mayor parte, la reducida respuesta a vasoconstrictores (Weigert y cols, 1995; Atucha y cols, 1996b) y el aumento de la respuesta a vasodilatadores dependientes de endotelio como la ACH y ADP (Clària y cols, 1994; Heinemann y cols, 1996b; Gadano y cols, 1997). Los niveles de GMPc, otra vía de estimación indirecta de la producción vascular de NO, aumentados basalmente en animales cirróticos, también sufrieron un mayor incremento tras estimulación con bradiquinina, ACH y ADP. Estas diferencias con los controles desaparecieron, tanto después de la coincubación con un inhibidor la NOS, como tras la eliminación del endotelio (Ros y cols, 1995a).

En contraste a todos estos resultados, algunos autores no han encontrado una producción mayor de la síntesis de NO como responsable de la vasodilatación sistémica que tiene lugar en animales con cirrosis (Sogni y cols, 1992), o un papel significativo del NO en la hiporrespuesta vascular a vasoconstrictores, característica de la circulación hiperdinámica presente en esta enfermedad (Heinemann y Stauber, 1996a; Ralevic y cols, 1996). De la misma manera, existen estudios en los que la respuesta vasodilatadora dependiente de NO es normal en ratas cirróticas (Lee y cols, 1995a) e incluso otros la encuentran disminuida (Karatapanis y cols, 1994).

Papel del NO en la hiporrespuesta vascular de la cirrosis.

La contracción vascular dependiente de receptor requiere de una serie de pasos intermedios que conducen a un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , lo que provoca una fosforilación de la cadena ligera de miosina y contracción de la célula muscular lisa. La unión del agonista a su respectivo receptor activa una fosfolipasa C acoplada a una proteína G, que está situada entre ambos, receptor y fosfolipasa, en la membrana. La fosfolipasa dará lugar a la formación de IP_3 y a 1,2-diacilglicerol. El IP_3 es el segundo mensajero fisiológico para la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, y el otro producto de la hidrólisis lo es para sostener la respuesta de contracción, produciendo un influjo de Ca^{2+} extracelular. El aumento de Ca^{2+} intracelular activa a la calmodulina, que actúa sobre la protein kinasa C (PKC) encargada de catalizar la fosforilación de la cadena de miosina.

Se ha sugerido que la cirrosis tiene alterado algún mecanismo en la señal de transducción que conduce a la vasoconstricción, dependiente de la proteína G. El aumento de NO podría participar en esta alteración ya que estimula la síntesis de GMPc, y éste, a su vez, podría afectar a los mecanismos por los que la proteína G aumenta el Ca^{2+} intracelular (Hartleb y cols, 1995). En este sentido, se ha demostrado una respuesta atenuada en la formación de IP_3 tras la unión del agonista al receptor, en ratas con hipertensión portal. Esta alteración no se observó tras activación directa de la proteína G ni de la PLC, por lo que se ha planteado la existencia de algún el problema en el acoplamiento del receptor a la proteína G, en el que podría influir los niveles elevados de sustancias vasodilatadoras como glucagón, protaciclina y NO, presentes en animales con cirrosis e hipertensión portal (Huang y cols, 1997). Otro estudio propone la existencia de una alteración endotelial, en la que el NO está implicado pero no es

el único participante, que afecta a la respuesta contráctil a un nivel previo a la activación de la PKC (Atucha y cols, 1996a). Estos resultados, sin embargo, no coinciden con los hallados por otros autores que sugieren una disfunción posterior a la activación de la PKC (Wu y Benoit, 1994).

Los mecanismos por los que el NO produce vasodilatación son mediados intracelularmente por el GMPc y por la activación de los canales de K^+ que provocan un eflujo de este ión fuera de la célula. Dada la importancia del endotelio, como modulador del tono vascular, las alteraciones a este nivel en las respuestas vasodilatadoras podrían repercutir en la anormal respuesta a vasoconstrictores, como veíamos anteriormente con el GMPc. Así, se han implicado a los canales de K^+ , dependientes e independientes de NO, en la hiporrespuesta vascular a vasoconstrictores como la metoxamina (Atucha y cols, 1998). Esta activación anormal de las corrientes de K^+ , podría contribuir a la relajación del músculo liso vascular de los animales cirróticos y a la circulación hiperdinámica en ratas con hipertensión portal (Moureau y cols, 1992 y 1994). En contraposición a estos datos, se ha demostrado que las ratas con cirrosis son hiporreactivas al efecto depresor de diferentes vasodilatadores como los activadores de los canales de K^+ , bloqueantes de canales del Ca^{2+} , y a la vasodilatación mediada por GMPc y AMPc (Safka y cols, 1997). En este estudio, los mecanismos más afectados parecen ser los mediados por NO, por lo que de nuevo se pone en duda la participación de esta sustancia en la patogenia de las alteraciones de la reactividad vascular de la cirrosis.

2.- El NO en las alteraciones renales de la cirrosis hepática.

La producción renal de NO deriva de la actividad de las tres isoformas de la NOS, distribuidas entre los diversos tipos de células del riñón: endoteliales, musculares lisas, mesangiales y células epiteliales tubulares.

La NOS I ha sido localizada en las células de la mácula densa. Además, ha sido detectada en el túbulo colector de la médula interna, y en menor proporción en el glomérulo, en la parte delgada del asa de Henle de la médula interna y en los túbulos corticales y colectores de la médula externa, así como en parte del árbol vascular renal.

La NOS III está presente en el endotelio de las arteriolas renales y, en general, en todo el endotelio de la extensa red vascular renal.

La NOS II se ha identificado en la porción preglomerular de la arteriola aferente, incluyendo las células granulares y en células del túbulo proximal y de túbulos colectores de la capa medular interna (Bachmann y Mundel, 1994). La iNOS también está representada en la capa medular externa y en los glomérulos y es posible inducir su expresión en las células mesangiales. Así, se ha sugerido que la fuente principal de producción renal de NO tras la administración de lipopolisacárido es el glomérulo (Saura y Lamas, 1995; Raij, 1993).

2.1 Fisiología del NO renal.

Teniendo en cuenta la amplia distribución intrarrenal de la NOS y la mayor sensibilidad renal a su inhibición, hecho demostrado con la administración de dosis que no modifican la presión arterial sistémica pero que sí alteran la función renal (Atucha y cols, 1994b), es fácil reconocer la gran importancia del NO en el control de la hemodinámica y la función excretora renal. En condiciones normales, el NO es muy importante en el mantenimiento de la presión de perfusión renal, como lo demuestra la reducción, dependiente de la dosis, que sufre el FSR tras la administración de inhibidores de la NOS (Romero y cols, 1992).

El NO también ha sido implicado en la autorregulación del FSR y TFG, ejerciendo un papel modulador de la contractilidad del músculo liso de las arteriolas, de la liberación de renina, y de la respuesta de retroalimentación túbulo-glomerular. Además, podría actuar como regulador de la TFG interactuando con la angiotensina en las células mesangiales y del epitelio glomerular (Bachmann y Mundel, 1994).

El mecanismo por el que el NO produce diuresis y natriuresis parece ser debido tanto a mecanismos hemodinámicos como tubulares. Por un lado, el NO formado a nivel medular ejerce un control en el mantenimiento del flujo sanguíneo papilar, junto a las prostaglandinas. Por otro lado, la capacidad de los vasodilatadores renales para aumentar la excreción urinaria de sodio, está íntimamente conectada a su capacidad para redistribuir el FSR total y, específicamente, para aumentar el flujo sanguíneo medular y la presión hidrostática intersticial, lo que impediría la reabsorción tubular de sodio (Romero y cols, 1996). Los efectos tubulares del NO pueden ser directos sobre el túbulo colector o debidos a un antagonismo del efecto de la AII en el túbulo proximal (Raij, 1993), inhibiendo la reabsorción de sodio en ambos casos. Se ha sugerido que el NO puede mediar los efectos de la AII sobre el túbulo en un rango variable, desde inhibición hasta estimulación de la reabsorción tubular (Bachmann y Mundel, 1994).

2.2 Óxido nítrico, riñón y cirrosis hepática.

La repercusión renal de la activación sistémica del SRAA, SNS y de la ADH junto a un déficit en la síntesis, liberación o acción de sustancias vasodilatadoras como el ANF, prostaglandinas y quininas, da como resultado un desequilibrio entre factores antinatriuréticos o vasoconstrictores y factores natriuréticos o vasodilatadores que inician la reabsorción de sodio y agua. En condiciones normales el NO produce vasodilatación renal, diuresis y natriuresis. Así, la inhibición de su síntesis a dosis no presoras reduce el FSR y la excreción de sodio y agua y dado que en estas condiciones la TFG no cambia, se puede deducir que este efecto se deriva de una acción a nivel tubular, inhibiendo la reabsorción de sodio y agua (Lahera y cols, 1991a). Teniendo en cuenta su papel sobre la función renal y la importancia de su participación en las alteraciones hemodinámicas de la cirrosis hepática, se ha propuesto al NO como mediador de las alteraciones renales de la cirrosis hepática. Inicialmente, Clària y cols (1992b) observaron que la mayor sensibilidad presora de los animales cirróticos a la administración del inhibidor de la síntesis de NO, L-NNA, coincidía con un aumento de la diuresis y natriuresis hasta alcanzar valores similares a los controles. Atucha y cols (1994) demostraron el papel del NO en la menor excreción renal de ratas cirróticas al encontrar una gran respuesta diurética y natriurética a la inhibición, con dosis no presoras, de la síntesis de NO. Esta mayor sensibilidad presora ha sido demostrada por otros autores y en diferentes modelos de cirrosis y de hipertensión portal experimental (Pizcueta y cols, 1992a y b). Posteriormente, Ramírez y cols (1994) han observado que dosis de L-NAME que no modifican la PAM en animales controles, producen un marcado incremento de la PAM en los animales con ligadura crónica del conducto biliar, hasta alcanzar los valores de sus controles. Este efecto se acompañó de una mayor respuesta renal, hemodinámica y excretora, en las ratas cirróticas.

Estos hallazgos indican que la inhibición de la síntesis de NO podría tener un efecto beneficioso en la homeostasis del volumen del animal cirrótico (Clària y cols, 1992b; Lee y cols, 1993; Atucha y cols, 1994b), al contrario de lo que ocurre en condiciones normales. Los mecanismos implicados en este efecto no están totalmente aclarados, pero si como hemos visto las alteraciones hemodinámicas tienen unas repercusiones renales, la mejoría o corrección de las primeras también tendrá su reflejo en un mejor funcionamiento renal. Así, el efecto beneficioso sobre la función renal debido a la mayor respuesta presora a la inhibición

de la producción de NO, podría estar determinada por el aumento de la presión en sí, por la disminución de la síntesis de NO, o por ambos. Algunos trabajos en los que han administrado vasoconstrictores con objeto de mejorar la PAM, en pacientes y animales con cirrosis, presentan resultados contradictorios en cuanto a los efectos sobre la función renal. Esto no resulta extraño si tenemos en cuenta la existencia de hiporrespuesta vascular a vasoconstrictores, en presencia de una elevación endógena de los mismos. Además, ha sido demostrado que la capacidad renal para responder a elevaciones de la presión arterial está comprometida y esto se relaciona directamente con el estadio de la cirrosis (Atucha y cols, 1993a). Con estas aportaciones podemos sugerir que, si bien la existencia de hipotensión contribuye a la menor excreción de sodio y agua en la cirrosis, el factor principal de esta relación entre las alteraciones sistémicas y renales podría ser el aumento de NO.

Es posible que la inhibición de la síntesis de NO a dosis presoras reduzca significativamente los niveles de actividad de renina plasmática y de hormona antidiurética (Niederberger y cols, 1995a). De cualquier manera, un aumento importante de la presión (20 mmHg) también puede, por sí mismo, disminuir la actividad de renina plasmática (Romero y cols, 1996). Estos hechos contribuirían al efecto beneficioso de los inhibidores de la NOS sobre la excreción de sodio y agua. Al igual que sucede con la PAM, la inhibición de la síntesis de NO reduce en mayor medida el FSR y produce una mayor vasoconstricción medular en los animales cirróticos que en los controles. Estos efectos se acompañaron de una mayor respuesta excretora renal (Ramírez y cols, 1994). También se ha descrito un aumento en la respuesta vasodilatadora renal a ACH de los animales cirróticos y el L-NAME disminuye *in vivo* y abole *in vitro* estas diferencias, sugiriendo que el aumento de la actividad de NO media dicha alteración (García-Estañ y cols, 1994). Estos datos sugieren que el NO desempeña un papel muy importante en el mantenimiento de la hemodinámica renal en los animales cirróticos y que existe una elevación del NO intrarrenal.

La mayor actividad intrarrenal del NO podría ser un mecanismo compensador frente a los elevados niveles de hormonas antinatriuréticas presentes en la cirrosis, pero el riñón del animal cirrótico parece ser refractario a los efectos diuréticos y natriuréticos del NO, aunque no al vasodilatador. También es probable que la elevación en la producción renal de NO no sea suficiente para contrarrestar las influencias antinatriuréticas, de forma que la existencia de niveles intrarrenales elevados de AII o aldosterona, como reflejo de su elevación plasmática,

participarían en la menor excreción de sodio y agua y en el menor flujo sanguíneo papilar que presentan los animales cirróticos (Atucha y García-Estañ, 1996). En este sentido, la inhibición de la síntesis del NO, como sistema vasodilatador, podría ser balanceada por una disminución de vasoconstrictores y, por otro lado, daría lugar a un aumento compensatorio de prostaglandinas, vasodilatadores muy importantes para el mantenimiento de la función renal en situaciones, como la cirrosis hepática, en las que los sistemas antinatriuréticos están activados. Resultados recientes indican que la inhibición de la síntesis de NO en animales cirróticos no modifica, a diferencia de los controles, el FSR mientras que aumenta la excreción urinaria de prostaglandinas (Clària y cols, 1992b). En esta misma línea, Ros y cols (1995b) encuentran que el bloqueo de la síntesis de PGs sólo afecta al FSR de los animales cirróticos y cuando el bloqueo es simultáneo, de las PGs y del NO, la reducción del FSR en dichos animales es mucho más drástica. De estos resultados se deduce que la inhibición de la síntesis de NO permitiría una activación de la síntesis de PGs que puede no sólo compensar la acción natriurética y diurética del NO, sino que incluso podría aumentarla.

Atucha y cols (1994b) demuestran que el efecto diurético y natriurético de la inhibición del NO, en animales cirróticos, es consecuencia de una inhibición de la reabsorción tubular, ya que la presión arterial y la TFG no variaron a lo largo el experimento. Aunque en este estudio, la utilización de dosis subpresoras de L-NAME no modificó la renina plasmática, es posible que una disminución de los niveles intrarrenales de AII, pueden no reflejarse en cambios de la renina, y sí estar envueltos, junto con las PGs, en el efecto diurético de la inhibición del NO. Del mismo modo, este grado de inhibición del NO, permitiría un aumento de las resistencias vasculares sistémicas y una disminución del gasto cardíaco, reduciendo el infralleno del sistema arterial sin tener una repercusión objetivable sobre la presión arterial. Esto sería suficiente para aumentar la excreción de agua y sodio en los animales con cirrosis.

Por último, sugerir que este desequilibrio hormonal en el interior del riñón podría provocar cambios en la distribución del flujo sanguíneo intrarrenal, que estarían relacionados con las alteraciones renales de la cirrosis hepática, y en los que el NO, dado su papel modulador en la función renal, podría estar implicado. Además algunos resultados obtenidos en riñones aislados de animales con hipertensión portal (García-Estañ y cols, 1996), indican que además del papel vasodilatador del NO y las PGs, otros factores, probablemente

estructurales, podrían también intervenir en la reducción basal de la resistencia a la perfusión renal.

3.- Mecanismos que aumentan la producción de NO.

3.1 NOS inducible versus NOSc endotelial.

La regulación de la producción de NO bajo condiciones fisiológicas o fisiopatológicas es muy compleja y está determinada básicamente por la actividad de las tres principales formas de la NOS (I, II y III), enzima encargada de la síntesis de NO. Hace algunos años, Vallance y Moncada (1991), postularon la existencia de un aumento de la producción de NO en la cirrosis, debida a la inducción de la NOS dentro del ambiente endotoxémico que envuelve a la cirrosis. Este NO participaría activamente en la patogénesis de la vasodilatación arterial que caracteriza a los pacientes cirróticos. Actualmente, son considerables las evidencias de que el NO es producido en exceso en la cirrosis hepática, sin embargo, los mecanismos que conducen a este aumento están todavía por determinar.

La implicación del endotelio en la excesiva producción de NO ha sido ampliamente documentada y representa, hasta la fecha, la procedencia principal del aumento de la síntesis de NO en la cirrosis. Así, el aumento del flujo sanguíneo derivado de la circulación hiperdinámica que aparece en la cirrosis, constituye un mecanismo sistémico de estimulación por estrés de rozamiento para la síntesis y liberación de NO por la NOS localizada en el endotelio. La participación de la sintasa endotelial ha sido demostrada en estudios *in vitro* en los que la eliminación del endotelio corregía la hiporrespuesta, de distintos vasos y lechos vasculares, a diferentes vasoconstrictores (Atucha y cols, 1996b; Gadano y cols, 1997). El aumento de la NOSc endotelial también ha sido propuesto como el mecanismo más probable para explicar el aumento de la respuesta a vasodilatadores como ACH, ADP y bradiquinina (Claria y cols, 1994; Albillos y cols, 1995; Ros y cols, 1995a). Otras observaciones, sin embargo, han puesto de manifiesto un efecto beneficioso de los inhibidores de la NOS, después de que la eliminación del endotelio no restableciera totalmente la reactividad normal en los vasos de animales con cirrosis. Estos resultados sugieren la participación de la sintasa localizada en el músculo liso en el aumento de NO vascular (Karatapanis y cols, 1994; Obbergh y cols, 1995; Michielsen y cols, 1995).

Desde la hipótesis inicial de Vallance y Moncada, el papel de la iNOS en el aumento de NO existente en la cirrosis ha sido muy controvertido. Algunos autores subrayan al NO

procedente del músculo liso como principal causa de la hiporespuesta a vasoconstrictores, excluyendo la participación del NO endotelial (Ryan y cols, 1996; Mathie y cols, 1996). Además, la administración de inhibidores preferenciales de la iNOS, como la aminoguanidina, corrige la circulación hiperdinámica en ratas con hipertensión portal (Lee y cols, 1997) y mejora la hipotensión arterial y las alteraciones renales observadas en animales cirróticos (Criado y cols, 1997). Por el contrario, en otros estudios, la administración de aminoguanidina resultó inefectiva para restaurar la respuesta contráctil a vasoconstrictores en animales con ligadura de la vena porta o con cirrosis (Heinemann y Stauber, 1995; Weigert y cols, 1995). Como vemos, hay una amplia variabilidad de resultados en cuanto a la participación de la iNOS en la patogenia de la cirrosis hepática.

Una vez purificadas, caracterizadas y clonadas las tres isoformas de la NOS, y dadas las discrepancias entre los estudios farmacológicos, se están aplicando técnicas moleculares para valorar la expresión de las diferentes isoenzimas en diferentes tejidos, que en combinación con otras técnicas permitirán dilucidar qué enzimas y en qué medida participan del aumento en la producción de NO existente en la cirrosis. Así, Cahill y cols (1995 y 1996) han documentado un aumento de la actividad de la NOS en el endotelio vascular de la arteria mesentérica superior y aorta torácica de animales con hipertensión portal. Además, la detección inmune de la iNOS mediante Western blot resultó ser nula o escasa, en ambos estudios, a diferencia de la de NOS endotelial. La mayor actividad de ésta última se correspondió con una mayor concentración de nitritos y nitratos plasmáticos y niveles de GMPc significativamente elevados en los animales hipertensos portales. También se ha demostrado una mayor expresión del ARNm y de la proteína enzimática eNOS, con las técnicas Northern y Western blot, en anillos aórticos de animales con cirrosis (Weigert y cols, 1995 y 1997). Estos resultados confirman a nivel molecular los hallazgos farmacológicos, obtenidos en sendos estudios, que evidencian una excesiva producción de NO de origen endotelial, y argumentan en contra de la expresión funcional de la iNOS en la cirrosis.

Sin embargo, no se descarta totalmente la participación de la enzima inducible vascular, muscular y endotelial, ya que niveles muy pequeños de iNOS podrían pasar desapercibidos por estas técnicas. En este sentido, se ha demostrado la existencia de cantidades detectables de expresión del ARNm de la iNOS en arteria mesentérica y aorta de animales cirróticos, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (Morales-Ruiz y cols, 1996; Martin y cols,

1996a). Dado que este aumento no se correspondió con una expresión de la proteína, al contrario que sucede con la sintasa endotelial, esos autores proponen la existencia de una regulación pretransduccional de la NOS y, por tanto, la expresión de la iNOS estaría limitada por el aumento de la NOS_e endotelial. Pero un estudio reciente ha encontrado una expresión protéica aumentada de la iNOS en linfocitos mononucleares y en los glomérulos de animales cirróticos, por Western blot. Este aumento también se observó en las células mesangiales de ratas sanas tras la incubación con plasma de animales cirróticos (Criado y cols, 1997).

Es difícil dictaminar si el incremento de NO es el fenómeno primario que induce la vasodilatación, o bien es secundario al estrés de la pared del vaso causado por un aumento en el flujo sanguíneo. Este flujo aumentado, a su vez, puede ser la consecuencia de un fenómeno mecánico desencadenado por la hipertensión portal o bien ser debido al incremento de sustancias circulantes con acción vasodilatadora per se, o capaces de estimular su producción.

En primer lugar, hemos comentado la existencia de una vasodilatación sistémica y un aumento del flujo sanguíneo que es inicial y más importante en el territorio esplácnico. Debido a que el *shear stress* puede aumentar la expresión de la NOS_e en el endotelio (Uematsu y cols, 1995), es posible que el aumento de producción de NO sea una consecuencia mecánica directa de la hipertensión portal (Sogni y cols, 1995). Según esto, la intensidad del estímulo podría correlacionarse con la gravedad de la enfermedad, a la vez que influiría en la expresión de la sintasa. Este hecho ha sido demostrado por Niederberger y cols (1996), en el que la expresión de la NOS_e endotelial estuvo significativamente aumentada tanto en aorta como en arteria mesentérica de los animales cirróticos, en contraste a lo que ocurrió en ratas con ligadura de la vena porta. En estas últimas, sólo se encontró una expresión aumentada de esta enzima en arterias mesentéricas y el incremento fue similar al observado en las ratas con cirrosis. Estos hallazgos explicarían que los disturbios de la hemodinámica sistémica, la función renal y la homeostasis de fluidos, son más marcados en el modelo cirrótico que en el de hipertensión portal, a pesar de la existencia de un síndrome circulatorio hiperquinético cualitativamente similar entre ambos modelos. Además, sugieren que a mayor severidad de enfermedad hepática existe una mayor producción de NO vascular.

En segundo lugar, el ambiente endotoxémico y la mayor predisposición de los cirróticos a la infección, podría inducir la síntesis de NO por activación de la NOS_i. Los pacientes y animales con cirrosis tienen significativamente aumentados los niveles plasmáticos de

endotoxina (Laffi y cols, 1995; Inan y cols, 1997) y la expresión de esta enzima podría constituir, además, un mecanismo de respuesta frente a la infección (Morales-Ruiz y cols, 1996 y 1997).

3.2 Ictericia obstructiva, endotoxemia y enfermedad hepática.

Endotoxemia y bacteriemia han sido ampliamente reconocidas como marcadores de alteración hepática. Numerosos estudios han implicado a las bacterias intestinales en la patogénesis del daño hepático agudo y crónico en animales de experimentación. No solamente la endotoxina intestinal parece jugar un papel importante en el desarrollo de la cirrosis experimental, sino que la lesión hepática convierte al animal en excesivamente susceptible a sus efectos.

La endotoxina, que normalmente es liberada desde el intestino hacia la circulación portal, sufre una eliminación hepática en un proceso de dos pasos que requiere la cooperación entre las células de Kúpffer y los hepatocitos. En la enfermedad hepática, estos procesos de detoxificación están alterados y además los *shunts* portosistémicos que aparecen en pacientes con cirrosis e hipertensión portal permiten a los microorganismos y endotoxinas del intestino evitar a los macrófagos y células de Kúpffer del hígado, lo cual provoca un exceso en el paso de endotoxina hacia la circulación sistémica. Concentraciones elevadas de endotoxina circulante son halladas incluso en pacientes cirróticos sin evidencia clínica de infección. La endotoxemia inicia una cascada biológica de daño multiorgánico resultado de una compleja red de interacciones entre factores humorales y celulares que inducen a la liberación de múltiples quimiotoxinas. La disfunción orgánica mediada por endotoxinas juega, probablemente, un papel importante en el marco de la obstrucción biliar extrahepática. Entre el 25 y el 85 % de los pacientes con ictericia obstructiva presentan endotoxemia y hay evidencias considerables que la implican como causa de algunas de las complicaciones que aparecen en estas condiciones.

Muchos estudios, clínicos y experimentales, han puesto un énfasis especial sobre el papel de los ácidos biliares en el desarrollo de endotoxemia durante la ictericia obstructiva. Ésta se caracteriza por una escasa cantidad de ácidos biliares en el intestino combinada con un elevado nivel sérico de los mismos, y ambos sucesos podrían contribuir a la endotoxemia. Así, la ausencia de ácidos biliares en el intestino permite el aumento de la absorción de endotoxina

desde el tracto gastrointestinal y, por otra parte, el aumento de los niveles circulantes de ácidos biliares conduce a una alteración de la función detoxificadora de las células de Küpffer.

Una interesante influencia de la endotoxemia, la estimulación del NO en el tejido vascular, ha sido implicada en la patogénesis de la hipotensión sistémica y otras complicaciones observadas en la enfermedad hepática e ictericia obstructiva. La enfermedad crónica hepática, por ej. la cirrosis hepática, así como la ictericia obstructiva están asociadas con una disminución de la resistencia vascular periférica y refractariedad a los agentes vasoconstrictores. La mediación de estos cambios por el vasodilatador endógeno NO está recibiendo una considerable atención.

Hemos descrito previamente que la NOS_i puede ser estimulada por endotoxina y algunas citoquinas en el endotelio y células musculares lisas vasculares. Estudios *in vitro* han demostrado que la inducción de esta enzima conduce a una vasodilatación sostenida y resistencia a vasoconstrictores. Estudios en perros y ratas han demostrado que la vasodilatación y la disminución de la contracción vascular que ocurre en respuesta a endotoxina o citoquinas están mediadas por la síntesis de NO. Dada la alta incidencia de endotoxemia en la enfermedad hepática y en la ictericia obstructiva, se ha propuesto que los altos niveles de endotoxinas en estas condiciones desencadenarían la inducción de la síntesis de NO vascular, y como ya hemos visto hay muchas evidencias indirectas que implican al NO en la patogenia de las alteraciones hemodinámicas de la cirrosis hepática, tanto en humanos como en animales de experimentación (Green y Better, 1995).

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El aumento de la síntesis vascular de NO que tiene lugar en la cirrosis hepática ha sido demostrado, junto a otros, por estudios realizados en nuestro laboratorio, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos han encontrado una corrección de la hiporrespuesta vascular a vasoconstrictores y de la hipotensión arterial tras la administración de inhibidores inespecíficos de la sintasa de NO. Además, estos efectos se acompañan de una mejoría de la función excretora renal en los animales con cirrosis experimental. El enzima responsable de la síntesis del NO existe en, al menos, tres isoformas. Hasta la fecha, el tipo de enzima implicado, constitutivo o inducible, en la mayor producción de NO de la cirrosis no está suficientemente claro. Aunque la mayoría de los trabajos apuntan a la existencia de un aumento de la actividad de la sintasa de NO endotelial, incluso en ratas cirróticas sin ascitis, el papel de la sintasa inducible en el aumento de NO es mucho más controvertido. Algunos autores han encontrado una participación de la NOS₃, sin embargo el uso de inhibidores preferenciales de esta isoforma muestra un espectro variado de resultados tanto sobre la circulación hiperdinámica como sobre la hiporrespuesta vascular. La aparición de nuevas drogas que inhiben selectivamente las diferentes isoformas de la NOS ha abierto nuevas perspectivas, tanto para el estudio de su participación en el aumento del NO como para el tratamiento de las alteraciones hemodinámicas y renales de la cirrosis hepática.

En esta Tesis Doctoral hemos valorado el papel del NO en dos modelos de cirrosis experimental. En primer lugar, estudiando la contribución de las dos isoformas principales, constitutiva e inducible, a la menor respuesta vascular a vasoconstrictores, una de las más significativas alteraciones de la hemodinámica vascular. Así, como primer objetivo nos planteamos:

- 1. Valorar la participación global del NO en ratas con cirrosis experimental, mediante el estudio de la respuesta vascular *in vitro* en anillos de aorta y comprobar el grado de participación del endotelio y de las sintasas de NO, constitutiva e inducible, en esta respuesta.**

Como se ha comentado en la introducción, el riñón es uno de los principales órganos diana en las enfermedades hepáticas. Estudios previos han descrito una mayor producción de NO renal en varios modelos experimentales. Sin embargo, ninguno de estos trabajos lo ha hecho de forma directa. Por lo tanto, como segundo objetivo nos propusimos:

2. Determinar la actividad de la sintasa de NO, constitutiva e inducible, en riñones y aorta de ratas con cirrosis experimental.

El interés de nuestro laboratorio por la médula renal, debido a la importante función que esta pequeña zona renal juega en el control de la excreción de agua y sodio mediante el ajuste de la distribución intrarrenal del flujo sanguíneo, nos ha llevado a estudiar el papel del NO y el del otro mediador vasodilatador de importancia en la médula renal, las prostaglandinas, en el control de la hemodinámica intrarrenal. Por lo tanto, en el tercer objetivo nos propusimos:

3. Estudiar el papel del NO y de las prostaglandinas en el control inmediato de la hemodinámica intrarrenal.

Es conocido que, a pesar del aumento de NO a nivel sistémico y renal, el riñón del animal cirrótico se comporta como si existiese un déficit de NO en su interior. Esto puede ser el resultado de un desequilibrio entre los sistemas vasoconstrictores y los vasodilatadores. El NO puede ser de origen constitutivo o inducible y sería interesante valorar el papel de cada uno de ellos en la cirrosis, para actuar específicamente sobre uno u otro tipo, sin comprometer las acciones fisiológicas del otro. Dado que la participación de la NOS α en el aumento de NO no está claramente establecida, nuestro cuarto objetivo fue:

4. Comparar los efectos renales derivados de la administración aguda de un inhibidor preferencial de la sintasa inducible de NO, aminoguanidina, con los de un inhibidor inespecífico de la NOS, el N^w-nitro-L-arginina.

Como quiera que los efectos agudos pueden ser reversibles y, por tanto, de corta duración, una forma de valorar la implicación del NO más profundamente como contribuyente a las alteraciones sistémicas y renales de la cirrosis hepática sería mediante la administración crónica de los inhibidores de la síntesis de NO. Por ello, en nuestro quinto objetivo hemos intentado:

5. Determinar si la administración crónica de los inhibidores de la síntesis de NO, constitutivo e inducible, ejerce efectos beneficiosos sobre la presión arterial y la función excretora renal de animales cirróticos.

Finalmente, como apertura de una nueva línea de investigación, hemos utilizado una tecnología innovadora para analizar la estructura vascular intrarrenal en las fases iniciales de la cirrosis. Para ello hemos contado con la inestimable colaboración del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Clínica Mayo, en Rochester (USA), poseedores del único escáner

Microcomputerizado que permite el análisis de las estructuras renales mediante la reconstrucción tridimensional de los riñones perfundidos con un contraste radiopaco. Mediante el uso de esta tecnología, hemos intentado dilucidar si el trastorno vascular sistémico que ocurre en los pacientes y animales con cirrosis, en el que el NO juega un papel importante, tiene alguna repercusión vascular morfológica sobre el riñón que justifique su alteración excretora. Así pues, nuestro sexto y último objetivo ha consistido en:

6. Estudiar, mediante tomografía microcomputerizada, los patrones morfológicos intrarrenales de ratas con cirrosis experimental.

Todos los experimentos se han realizado de acuerdo con el Convenio Europeo sobre la protección de animales utilizados para experimentación (Estrasburgo, 18 de marzo de 1986, ratificado en España el 25 de octubre de 1990) y con el RD 233/1988 del 14 de marzo del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España sobre la protección de los animales destinados a fines experimentales y otras funciones científicas.

Los animales proceden, en su mayor parte, del Animalario de la Universidad de Murcia (Centro Usuario en la actividad de cría con N° de registro del M.A.P.A.: 30030-2AB). Los animales usados en el protocolo 6 son de Harlan Sprague-Dawley (Indianápolis, IN, USA).

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos se han realizado de acuerdo con el Convenio Europeo sobre la protección de animales utilizados para experimentación (Estrasburgo, 18 de marzo de 1986, ratificado en España el 25 de octubre de 1990) y con el RD 233/1988 del 14 de marzo del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España sobre la protección de los animales destinados a fines experimentales y otras funciones científicas.

Los animales proceden, en su mayor parte, del Animalario de la Universidad de Murcia (Centro Usuario en la actividad de cría con N° de registro del M.A.P.A.: 30030-2AB). Los animales usados en el protocolo 6 son de Harlan Sprague-Dawley (Indianápolis, IN, USA).

I- INDUCCIÓN DE LA CIRROSIS.

1. Ligadura del conducto biliar (LCB).

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley y Munich-Wistar macho, sanos y de un peso inicial de 150 a 200 g. Mediante anestesia con éter dietílico (Panreac) se prepara al animal bajo condiciones de asepsia para la intervención quirúrgica. Para acceder al conducto biliar principal se procede a una laparotomía media de aproximadamente 2 cm, por debajo de la apófisis xifoides. Una vez identificado y aislado el conducto biliar, se ligan los extremos distal y proximal guardando una distancia entre ellos de 8 a 10 mm. Posteriormente se reseca el fragmento entre ambas ligaduras y se cierra la pared abdominal por planos. Los animales controles se prepararon de la misma forma, pero sin ligar ni reseca el conducto biliar. Para prevenir las infecciones postoperatorias se administró una combinación antibiótica de gentamicina y ampicilina (0.1ml/100g), por vía subcutánea (Bi-Gentavetina; Schering Plough, Segre, Francia).

2. Cirrosis por administración de tetracloruro de carbono (Cl₄C).

Se han utilizado las mismas cepas y del mismo peso inicial que en el apartado anterior. El procedimiento empleado para inducir cirrosis fue descrito por McLean y cols (1969) y modificado por López-Novoa y cols. (1976). El método consiste en la administración de Cl₄C (Probus, Barcelona, España) por inhalación, aumentando progresivamente el tiempo de exposición al tóxico. Para acortar el tiempo necesario para producir cirrosis, se añade un inductor enzimático, fenobarbital (Fluka, Buchs, Switzerland), al agua de bebida a una concentración de 0.4 g/L, desde una semana antes de empezar la administración del

hepatotóxico, y se mantiene durante todo el tiempo de exposición. La mezcla gaseosa se crea burbujeando el Cl_4C líquido, contenido en un frasco, con aire comprimido a un flujo de 2 L/min. El gas así formado se dirige al interior de una cámara estanca de dimensiones 48 x 29 x 38 cm, donde los animales son expuestos al tóxico. Una vez transcurrida la primera semana de ingesta de fenobarbital, se inician las sesiones en las que las ratas se someten a inhalación de Cl_4C tres veces por semana. El tiempo de exposición es de 1 min la 1ª semana; 2 min, la 2ª y 3ª semanas; 3 min, la 4ª, 5ª y 6ª; 2 x 3 min, la 7ª, 8ª y 9ª y 3 x 3 min a partir de la 10ª semana. Dado que el Cl_4C tiene propiedades anestésicas, se debe prestar especial atención cuando los períodos de exposición son prolongados. Además, no todos los animales presentan una misma sensibilidad al tóxico, por lo que en fases avanzadas la duración de la exposición al gas se hace de manera individualizada. Aproximadamente a partir de la 10ª semana del inicio de las sesiones, los animales empiezan a desarrollar ascitis.

Dado que en estudios preliminares descubrimos que los animales Munich-Wistar resultaron ser mucho más sensibles al Cl_4C los tiempos de exposición al tóxico en esta cepa variaron ligeramente respecto al método descrito anteriormente. El tiempo de exposición se incrementa a partir de la 1ª semana de 0.5 en 0.5 min por semana hasta llegar a la 5ª, y el resto continua igual al anterior, excepto que a partir de la 9ª semana rara vez es necesario sobrepasar los 2 x 3 min, consiguiéndose de este modo que el desarrollo de la ascitis ocurra también alrededor de la décima semana.

Los grupos controles están formados por ratas de la misma cepa, sexo, edad y peso que las sometidas a inducción de la cirrosis, y son tratadas con fenobarbital durante el mismo periodo de tiempo que los animales cirróticos, con objeto de anular posibles alteraciones bioquímicas inducidas por esta sustancia. Al menos una semana antes de someter a los animales a cualquier procedimiento experimental, se les retira la administración de Cl_4C y fenobarbital.

3. Método diagnóstico.

Al finalizar los experimentos y tras sacrificar al animal, se le extrae el hígado y se obtiene una muestra del lóbulo izquierdo. Esta muestra se fija en formol al 10% y posteriormente se le incluye en parafina, se corta y se examina tras tinción con hematoxilina-eosina. Las muestras fueron analizadas por un mismo observador y clasificadas como hígado

normal o como cirrosis. Los animales en los que no se confirmó la presencia de cirrosis en la histología no se incluyeron en el estudio.

II- PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.

1. ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN ANILLOS AÓRTICOS DE RATAS CIRRÓTICAS POR LIGADURA CRÓNICA DEL CONDUCTO BILIAR.

En total, se han utilizado 12 animales controles y 14 animales con LCB. Los experimentos se realizaron alrededor del día 28 después de la cirugía. Se han estudiado los siguientes grupos experimentales:

Grupo 1: Anillos con endotelio. Controles, n=11; LCB, n=12.

Grupo 2: Anillos con endotelio, pretratados con el inhibidor inespecífico de la síntesis de NO, L-NAME. Controles, n=12; LCB, n=10.

Grupo 3: Anillos con endotelio, pretratados con el inhibidor preferencial de la síntesis de NO inducible, aminoguanidina (AG). Controles, n=11; LCB, n=15.

Grupo 4: Anillos sin endotelio. Controles, n=10; LCB, n=15.

1.1 Preparación del animal.

Los animales se sacrificaron mediante traumatismo retrocervical y subsiguiente descerebración. Tras apertura del tórax, se extrae la aorta torácica y se sitúa en una placa Petri con solución Krebs oxigenada (95% O₂, 5% CO₂, Sociedad Española del Oxígeno, Murcia).

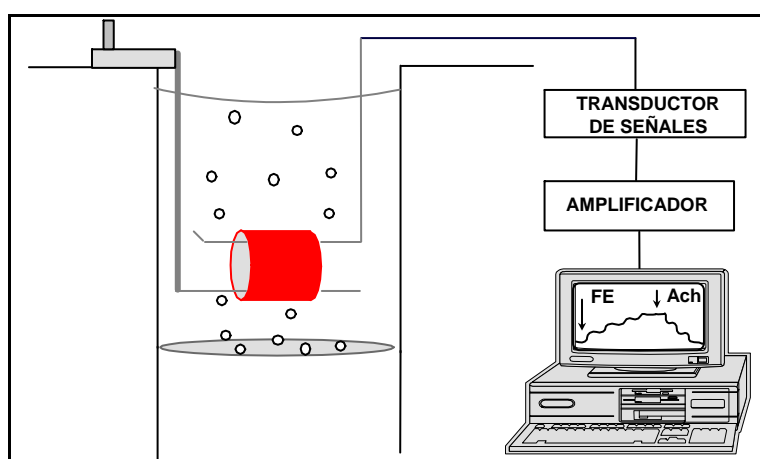


Figura 1. Representación esquemática del método usado para la reactividad vascular.

Una vez disecada cuidadosamente de la grasa y tejidos circundantes, cada aorta se corta en 6-8 anillos de longitud aproximada de 3 mm. Los anillos se sitúan horizontalmente, entre dos ganchos, en el interior de baños de órganos individuales, con una capacidad de 5 ml, y en todo momento se mantienen inmersos en la solución Krebs oxigenada, a una temperatura de 37° C y a un pH de 7,4. El gancho superior, de los dos entre los que se interpone el anillo, es el que está conectado a un transductor isométrico de señales (Pioden UF-1, Panlab, Barcelona), y registra el grado de respuesta contráctil en gramos (g). Las señales, una vez amplificadas, se registran en un monitor y son grabadas para su posterior análisis en un ordenador (Cibertec, Madrid, España). La figura 1 esquematiza este procedimiento.

La solución Krebs tiene la siguiente composición (mM): ClNa, 128; ClK, 4,7; Cl₂Mg.6H₂O, 1,2; PO₄H₂K, 1,2; Cl₂Ca.2H₂O, 2,5; EDTA, 0,01; CO₃HNa, 12,5; Glucosa, 11. Todos los productos son de la casa Panreac y Merck.

1.2. Proceso experimental.

Una vez colocados los anillos, se mantienen en estabilización durante 60 minutos, ajustando continuamente la tensión basal a 2 g, lo que corresponde a la tensión óptima para la expresión de la contracción. Cada 15 minutos se renueva la solución Krebs de los baños.

Anillos con endotelio: Tras el periodo de estabilización se realizaron dos curvas dosis-respuesta consecutivas, una de vasoconstricción y otra de vasodilatación. La primera consiste en la administración de concentraciones progresivas y acumulativas de fenilefrina (FE; L-Fenilefrina, Sigma, Madrid), desde 10⁻⁹ a 10⁻⁵ M. Después, se realizan varios lavados con solución Krebs para eliminar el fármaco, a lo que sigue un segundo periodo de estabilización (45-60 min) hasta recuperar de nuevo la tensión basal óptima de 2 g. La curva de vasodilatación se efectúa mediante la aplicación de concentraciones progresivas y acumulativas de acetilcolina (ACH, Sigma), 10⁻⁹-10⁻⁴ M, tras la vasoconstricción previa utilizando la dosis máxima de FE (10⁻⁵ M). Las distintas concentraciones se añaden una vez alcanzada la respuesta máxima de la concentración previa.

Anillos sin endotelio: El procedimiento para eliminar el endotelio consiste en frotar suavemente la cara interna del anillo vascular con un palo fino de madera de superficie ligeramente rugosa. En este grupo, y tras un periodo de estabilización de 20-25 min, se realiza una precontracción con la dosis máxima de FE (10⁻⁵ M), para comprobar después con la administración de ACH (10⁻⁴ M) que la eliminación del endotelio ha sido efectiva. El resto del

proceso es idéntico al realizado en los anillos con endotelio intacto. Además, antes de finalizar el experimento se añade nitroprusiato sódico (NPS, 10^{-6} a 10^{-4} M, Panreac) para confirmar que la manipulación inicial del anillo no ha afectado la capacidad del músculo liso para la relajación.

1.3. Inhibidores de la síntesis de NO.

Los inhibidores de la NOS, aminoguanidina (AG, aminoguanidina hemisulfato, Sigma) y L-NAME (Sigma), ambos a una concentración de 10^{-4} M, se agregaron 15 minutos antes de la realización de la curva correspondiente.

1.4. Parámetros determinados.

La respuesta de contracción a FE, se expresó en gramos respecto al valor basal de 2 g, y la de relajación a ACH y NPS, como porcentaje de la máxima contracción obtenida con FE (10^{-5} M). Además, se calcularon las dosis efectivas del 50 % de las respuestas a FE y ACH (DE_{50}), mediante un análisis de regresión individual para cada anillo.

2. ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN RIÑÓN Y AORTA DE RATAS CIRRÓTICAS Y CON LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR.

La actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) se determinó por la conversión de L-[³H]-arginina a L-[³H]-citrulina. Se han usado 6 ratas cirróticas por Cl₄C y 6 controles y 6 ratas con ligadura del conducto biliar (en la cuarta semana tras la cirugía) y 6 controles. Los animales se sacrificaron mediante traumatismo retrocervical y subsiguiente descerebración y los riñones y la aorta torácica se extrajeron, pesaron y se homogeneizaron (4°C) en un tampón que contiene 50 mmol/L de HCl-Tris, 0.1 mmol/L de EDTA, 0.1 mmol/L de EGTA, 12 mmol/L de mercaptoetanol, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de PMSF, 10 µg/ml de *soy bean trypsin inhibitor* y 2 µg/ml de aprotinina, a pH 7.5. Los riñones se homogeneizaron en 5 ml de tampón y las aortas en 0.5 ml. El homogeneizado (20 µl) se incubó a 37°C durante 20 minutos en presencia de una mezcla de reacción que contiene calmodulina (100 nmol/L), NADPH (1 mmol/L), tetrahidrobiopterina (30 µmol/L), L-arginina (10 µmol/L), L-[³H]-arginina (3 pmol) y cloruro cálcico (2.5 mmol/L). La reacción se para añadiendo 1 ml de un tampón (4°C) que contiene HEPES (20 mmol/L), EDTA (2 mmol/L) y EGTA (2 mmol/L). Finalmente, la mezcla se deposita en una columna de 1 ml de Dowex AG 50W-X8 (forma sódica) y la L-[³H]-citrulina se eluye con 2 ml del tampón de paro antes citado. La radiactividad en el eluído se mide en un contador de centelleo líquido tras añadir 5 ml de cóctel de centelleo. Todo el procedimiento se realizó por duplicado, en muestras tal como se ha indicado y en presencia de L-NAME (0.1 mmol/L) para inhibir la NOS y en ausencia de calcio. La actividad de NOS constitutiva (dependiente de calcio) se obtuvo tras restar la actividad en presencia presencia de L-NAME (0.1 mmol/L) de la actividad total. La actividad de NOS inducible (independiente de calcio) se obtuvo tras restar la actividad en ausencia de calcio de la actividad total.

3. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN AGUDA DE LA SÍNTESIS DE NO Y DE PROSTAGLANDINAS SOBRE LA HEMODINÁMICA RENAL DE RATAS CON CIRROSIS POR Cl₄C

3.1. Grupos experimentales.

Se han utilizado ratas Munich-Wistar cirróticas por inhalación de Cl₄C y sus respectivos controles. Esta cepa se caracteriza por presentar una gran papila renal que protuye hacia la pelvis renal, lo que resulta idóneo para medir el flujo sanguíneo papilar mediante fluximetría láser-doppler. En este protocolo se han realizado dos estudios:

Estudio 1: A estos animales se les administra primero el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME, y tras la estabilización de los parámetros hemodinámicos, el inhibidor de la ciclooxigenasa, indometacina. Este estudio se ha realizado en 8 animales controles y en 6 cirróticos.

Estudio 2: En este segundo estudio, el orden de administración de las drogas fue el inverso al anterior. Primero la indometacina y aproximadamente 15 minutos después, el L-NAME. Este protocolo consta de 6 animales controles y de 10 cirróticos.

3.2. Preparación quirúrgica.

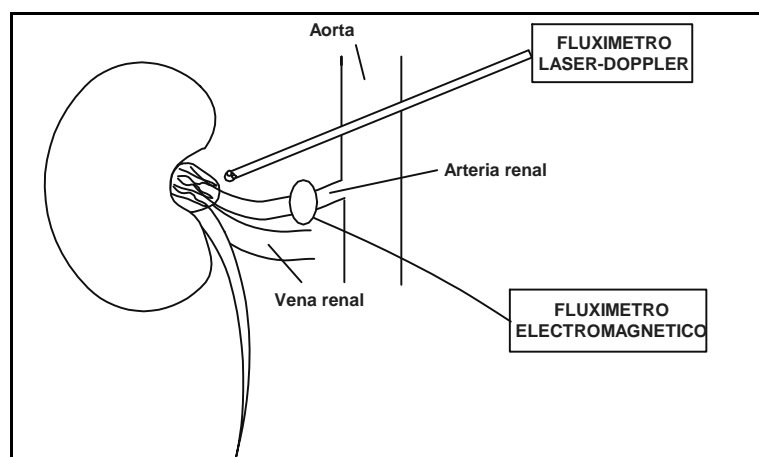


Figura 2. Representación esquemática del método usado para la determinar el flujo sanguíneo papilar y renal.

Todos estos experimentos se han realizado en ratas ayunadas desde la tarde anterior (unas 16 horas antes del inicio del experimento), siguiendo el método utilizado previamente en nuestro laboratorio (Atucha y cols, 1994). Los animales son anestesiados con thiobutabarbital (Inactín, 100 mg/kg, i.p.; Rersearch Biochemical International, Natick, MA) y colocados sobre una mesa quirúrgica conectada a un baño termostataado, para mantener una temperatura rectal constante de 37°C a lo largo de todo el experimento. Se efectúa una traqueotomía para facilitar la respiración (cánula PE 90), y se canulan (PE 50) la arteria y vena femorales derechas. La canulación arterial nos permite determinar la presión arterial media (PAM), que se monitoriza a lo largo de todo el experimento (transductor PDCR 75, amplificador 5241 y registro Multitrace 2, todos de Lectromed, Reino Unido), y obtener muestras de sangre. A través de la cánula venosa se infunde (Harvard Apparatus, mod. 11, Boston, MA, USA) una solución de suero salino isotónico al 0.9% (Grifols), con albúmina sérica bovina al 1% (Sigma), a una tasa de infusión de 1.5 ml/100g/h. Posteriormente se coloca al animal en decúbito lateral derecho y se practica una incisión en el flanco izquierdo para acceder el riñón, evitando de este modo la salida de líquido ascítico en los animales cirróticos. Después, se libera al riñón de la grasa perirrenal y de la glándula suprarrenal y se le sitúa en un recipiente especialmente diseñado para su inmovilización, exponiendo la cara dorsal renal. Tras la disección y escisión del uréter se libera a la papila de todos los tejidos circundantes y se la aísla del resto del tejido renal, colocando a su alrededor un algodón humedecido con solución salina. La arteria renal izquierda también se disecciona cuidadosamente del resto de vasos y tejidos de alrededor para medir el flujo sanguíneo renal (FSR). Para ello se coloca una sonda de flujo de 0,8 mm de diámetro interno alrededor de la arteria renal izquierda y se registra el flujo sanguíneo en un fluxímetro electromagnético (Skalar 1401, Skalar Medical, Holanda). El flujo sanguíneo papilar (FSP) se determina con un fluxímetro láser-doppler (Periflux PF3, Perimed, Suecia) cuya sonda (Dental probe, PF 316, Perimed) colocada en un micromanipulador apunta hacia la papila formando aproximadamente un ángulo de unos 30° con ella. El FSP se registra de forma continua en otro canal del mismo sistema Lectromed utilizado para la PAM. Finalmente, la apertura lateral abdominal y el riñón expuesto se cubren con Parafilm (American National Can) para minimizar la evaporación.

3.3. Proceso experimental.

Tras un periodo de estabilización de 1 hora, en el que se registran continuamente la PAM, FSR y FSP, se toma un periodo basal de 15 min y a continuación se administran bolos intravenosos (0.1 ml/100 g), de L-NAME (10 mg/kg) y de indometacina (7.5 mg/kg). La inyección de cada droga se realiza una vez que los parámetros se estabilizan en el periodo previo, normalmente unos 15 minutos después. En el otro grupo, el orden de administración de las drogas se invirtió, primero indometacina y después L-NAME. En la mitad de cada periodo se toman muestras de sangre arterial en capilares heparinizados para determinar el hematocrito. Estos se centrifugan a 12000 r.p.m. durante 5 min (Centrífuga de microhematocrito Hermle, Z 230 HA, Alemania) y en un lector de hematocrito se obtiene el porcentaje (%) que corresponde a las células rojas. El valor cero de ambos fluxímetros se obtuvo ocluyendo cuidadosamente la arteria renal, al concluir los periodos experimentales. Al finalizar, se sacrifica al animal con una sobredosis de pentobarbital y se pesa el riñón izquierdo.

3.4. Parámetros determinados.

3.4.1. Determinación del FSP por medio de fluximetría láser-doppler.

El efecto Doppler consiste en el cambio de frecuencia que se produce en una onda electromagnética al reflejarse sobre un objeto en movimiento. La diferencia entre la frecuencia emitida y la reflejada se denomina frecuencia Doppler. La aplicación para la determinación del flujo sanguíneo en los tejidos se basa en el impacto de una luz láser (haz de luz monocromática de helio-neón) contra los hematíes en movimiento, de un área tisular de aproximadamente 1 mm de diámetro. La señal recogida por el fluxímetro es proporcional al número y velocidad de los hematíes en movimiento dentro de la zona iluminada. El uso de la cepa Munich-Wistar convierte a este procedimiento en fácil y no invasivo, permitiendo un enfoque directo del haz de luz hacia la papila. Además, permite monitorizar de forma continua el flujo sanguíneo y detectar cambios transitorios en distintos periodos experimentales, que es uno de los objetivos de este protocolo. El flujo sanguíneo se obtiene como unidades de perfusión, expresado en voltios (100 U de perfusión corresponden a 1 voltio).

3.4.2. Determinación del FSR por medio de fluximetría electromagnética.

La sonda colocada alrededor de la arteria renal crea un campo electromagnético a su través. El movimiento de sangre que cruza el campo magnético genera un voltaje inducido,

proporcionalmente, por la velocidad y por el diámetro del vaso. La señal obtenida es amplificada y procesada por el fluxímetro en cuyo registro digital puede realizarse la lectura directa de los valores del FSR (ml/min), o bien conectarse a cualquier registro de señales de uso común.

3.5. Determinación de los niveles de prostaglandinas E₂ y F_{2a} urinarias.

Para este fin, algunos animales (4 cirróticos por inhalación de Cl₄C y 5 controles) se someten a un estudio metabólico.

3.5.1 Preparación de los animales y obtención de muestras.

Las ratas se situaron en jaulas metabólicas individuales y fueron alimentadas *ad libitum* con comida estándar convenientemente triturada (Panlab, Barcelona, España) y agua corriente. Esta dieta proporciona una dieta normal de sodio (104 mEq/kg). Tras un periodo de adaptación del animal de 3 días, se inicia el estudio durante los dos siguientes en los que se recogen las muestras de orina definitivas. Durante los 5 días se determinaron la ingesta de agua y comida, el volumen urinario y la concentración urinaria de sodio, con objeto de comprobar la estabilización de los parámetros. Una alícuota de 1 ml de cada muestra de orina de 24 horas de los días objeto del estudio, fue centrifugada a 2000 r.p.m. (10 min, a 4°C; Centrifuga Heraeus-Christ, CRYOFUGE 6-4). Las alícuotas se dividen en dos partes iguales, una que es congelada a -20° C para la determinación de la excreción urinaria de prostaglandinas, y otra para medir la excreción urinaria de sodio.

3.5.2. Parámetros metabólicos.

La ingesta de comida y agua, se determina mediante la diferencia de peso entre la comida (g/24h) o agua (ml/24h) colocadas en el comedero o bebedero, respectivamente, y el residuo encontrado a las 24 h.

El volumen urinario, V_u (ml/24h), se calcula gravimétricamente, restando al peso del recipiente que contiene la orina de 24h, el peso del recipiente vacío.

La concentración urinaria de sodio, Na_u (mEq/L) se determina por fotometría de llama (Corning 435; Isaza, Barcelona, España).

Ingesta de sodio (Na_i). La ingesta diaria de sodio se determina mediante la siguiente ecuación, Na_i (mEq/24h) = P_c (g/24h) x Na_c (mEq/g), donde P_c es el peso de la comida y Na_c es la concentración de sodio de la comida.

Excreción urinaria de sodio (UNaV). Con parámetros ya descritos previamente, podemos calcular la excreción diaria de sodio con la ecuación, $UNaV \text{ (mEq/24h)} = V_u \text{ (L/24h)} \times Na_u \text{ (mEq/L)}$.

Balance de sodio (B_{Na}). Estimamos el balance de sodio como la diferencia entre la ingesta de sodio diaria y su excreción urinaria en 24 h. No se considera la excreción fecal de sodio ya que es prácticamente despreciable. Así, $B_{Na} \text{ (mEq/24h)} = Na_i \text{ (mEq/24h)} - UNaV \text{ (mEq/24h)}$.

3.5.3. Determinación de Prostaglandinas E_2 e I_2 .

Se ha realizado un análisis cuantitativo de los niveles de PGE_2 en orina mediante inmunoensayo (ELISA KIT, Neogen corporation, Lexington, Kentucky, USA). La base de este test consiste en la competición entre un enzima conjugado con PGE_2 y la PGE_2 de la muestra por un lugar de unión a los anticuerpos adosados a los pocillos de una placa. Tras un periodo de incubación, se añade el sustrato para el enzima conjugado, cuya unión dará lugar a una reacción colorimétrica. La intensidad del color será inversamente proporcional a la cantidad de PGE_2 contenida en la muestra, ya que a menor cantidad de PGE_2 más enzima conjugado se une al anticuerpo y más sustrato es metabolizado. Los resultados se obtienen midiendo la absorbancia de las muestras en los pocillos con un lector de microplacas a 650 nm (MULTISKAN MCC/340 P, Versión 2.33), y contrastándola con la de los estándares. Con los valores estándar se construye una curva, con cuya regresión lineal pueden calcularse los valores de las muestras (ng/ml). Por último, con la diuresis obtenemos la excreción urinaria (ng/24h).

La cuantificación de la producción de la PGI_2 se determina midiendo los niveles de su metabolito estable 6-keto- $PGF1\alpha$. El procedimiento seguido es idéntico al descrito para la PGE_2 .

4. EFECTOS PRESORES Y RENALES DE LA INHIBICIÓN AGUDA DE LA SÍNTESIS DE NO EN RATAS CIRRÓTICAS.

4.A. EFECTOS DE LA AG EN LA CIRROSIS INDUCIDA POR LCB.

4.A.1. Grupos experimentales.

En este protocolo se han utilizado ratas Sprague-Dawley macho, cirróticas por LCB (n=7), y sus respectivos controles (n=7). Los experimentos se realizaron en la 4ª semana después de la cirugía. A ambos grupos se les administró AG en forma de bolos intravenosos.

4.A.2. Preparación quirúrgica.

Los experimentos se realizan en ratas no ayunadas. Tras anestesia con Inactín, se sitúan sobre una mesa quirúrgica termostataada para mantener una temperatura corporal constante a 37° C. Se canulan la tráquea, y la vena y arteria femorales derechas del mismo modo que en el protocolo 2. Además, se canuló la vejiga urinaria (PE 70) para la obtención de muestras de orina. Todos los animales reciben una infusión intravenosa de NaCl 0.9 %, a la que se añadió inulina tritiada (³H-Inulin, 1µCi/ml, New England Nuclear, Itisa, Madrid) para la medida de la TFG, y ácido paraminohipúrico al 0.6 % (PAH; Serva, Madrid) para la determinación del FSR. A lo largo de todo el experimento se mantiene una tasa de infusión constante de 1.5 ml/100g/hora.

4.A.3. Proceso experimental.

Tras la cirugía, se aguarda al menos 1 hora de estabilización antes del comienzo del experimento. La PAM fue registrada continuamente a lo largo del mismo (transductor Hewlett-Packard 1280; amplificador Hewlett-Packard 8805D). En primer lugar, se determinan dos periodos basales de 10 min. y, a continuación, se administran bolos intravenosos consecutivos de AG a dosis de 10, 50 y 100 mg/kg. Después de cada bolo se espera 5 min. antes de iniciar los dos períodos de aclaramiento de 10 min. Al final de cada periodo se recolectan las muestras de orina, para calcular la diuresis, natriuresis y la concentración de inulina y del PAH en orina. En la mitad del aclaramiento se extraen las muestras de sangre, para determinar el hematocrito y la inulina y el PAH plasmáticos. Para valorar el grado de actividad de NO remanente, inyectamos un bolo i.v. de L-NAME (10 mg/kg) después de la última dosis de AG, recogiendo el trazado de la PAM durante un período adicional de 15 min.

Al completar el experimento se obtiene sangre de la arteria femoral para medir la concentración plasmática de sodio, y otra de la vena renal para conocer la concentración venosa de PAH. El plasma se extrae tras centrifugación (Hermle, Z 231 M). Finalmente se pesan el bazo y ambos riñones.

4.A.4. Parámetros determinados.

Los períodos de aclaramiento, basales y de cada una de las dosis de AG, se expresan como una media, por lo que presentamos únicamente un dato por período.

Volumen urinario y flujo urinario.

El V_u se calculó gravimétricamente, restando el peso de los tubos vacíos, al peso total tras la recolección de la orina en cada período. Se asume que la densidad de la orina es la misma que la del agua, 1 g = 1 ml. El flujo urinario (F_u), ahora expresado en $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$, se obtiene de la división del V_u (μl) recogido en cada período por la duración del mismo (min) y por gramo de tejido renal.

Excreción urinaria de sodio.

Ahora expresada como, $\text{UNaV} (\mu\text{Eq}/\text{ml}) = F_u \times \text{Na}_u / 1000$.

Tasa de filtración glomerular.

Se estima mediante el cálculo del aclaramiento de ^3H -inulina. La radiactividad se determina por duplicado aplicando 10 μL de las muestras de plasma y orina, a un 1 ml de líquido de centelleo (EcoscintTM H; Atlanta, Georgia). Después de agitar cada tubo, se mide la radiactividad en cuentas por minuto (c.p.m.) en un contador de centelleo líquido (Betamatic Basic, Kontron, Madrid). Dos tubos blancos, sólo con líquido de centelleo, son incluidos en el contador y sus c.p.m. se sustraen de las c.p.m. de todas las muestras. Así, el aclaramiento de ^3H -inulina se calcula con la siguiente fórmula, $\text{TFG} (\text{ml}/\text{min}/\text{g}) = \text{c.p.m. Orina} \times F_u / \text{c.p.m. Plasma}$.

Flujo plasmático renal total (FPRT).

Las concentraciones plasmáticas y urinarias de PAH se obtienen mediante una técnica colorimétrica descrita por Waugh y Beall en 1974, usada previamente en nuestro laboratorio (Úbeda y cols, 1994). El FPRT (ml/min) se calcula a partir del aclaramiento de PAH, usando la extracción renal de PAH y el hematocrito, según fórmulas establecidas que resumimos a continuación: $\text{FPRT} = \text{PAH Orina} \times F_u / (\text{PAH Plasma}_{\text{arterial}} - \text{PAH Plasma}_{\text{venoso renal}})$, y

$$\text{FPRT} = \text{FPRT} / (1 - \text{hematocrito})$$

4.B. EFECTOS PRESORES Y RENALES DE LA INHIBICIÓN AGUDA DE LA SÍNTESIS DE NO EN LA CIRROSIS INDUCIDA POR ADMINISTRACIÓN DE Cl₄C.

En este caso las ratas Sprague-Dawley macho, se hicieron cirróticas por inhalación de Cl₄C (n=6) y se usaron también 6 ratas controles.

4.B.1. Preparación quirúrgica.

La preparación fue idéntica al apartado anterior (4.A.2.), que resumimos a continuación. Se anestesiaron ratas no ayunadas con Inactín, y, sobre una mesa quirúrgica termostataada, se canularon la tráquea, la vena y arteria femorales derechas y la vejiga urinaria. A lo largo de todo el experimento se infundió una solución intravenosa de NaCl 0.9% con ³H-Inulina, a razón de 1.5 ml/100g/h.

4.B.2. Proceso experimental.

Después de la preparación quirúrgica y de la recuperación de los animales, se determinan dos periodos basales de 10 min y, a continuación, se administran bolos intravenosos consecutivos de AG a dosis de 10, 25, 50 y 100 mg/Kg. Después de cada bolo aguardamos 5 minutos antes de iniciar los períodos de aclaramiento de 15 minutos de duración. Al final de cada periodo se recolectan las muestras de orina, para calcular la diuresis, natriuresis y la concentración de inulina en orina, y las de sangre arterial para determinar el hematocrito y la inulina plasmática. Además, se realiza una extracción adicional de 250 µl de sangre en cada período para medir nitritos y nitratos plasmáticos, que fue centrifugada a 10000 r.p.m. durante 10 min. El plasma recogido, se congeló inmediatamente en una cámara frigorífica a -20°C y el resto de células sanguíneas son resuspendidas en solución salina y reinfundidas a los animales, con objeto de evitar fluctuaciones en el hematocrito. Antes de concluir el experimento conservamos una muestra final de sangre de la arteria femoral, para medir la concentración plasmática de sodio. Finalmente se pesan el bazo y ambos riñones.

4.B.3. Parámetros determinados.

El volumen urinario y flujo urinario, la excreción urinaria de sodio y la TFG se determinan según los métodos descritos previamente.

Niveles plasmáticos de nitritos y nitratos:

La producción de NO puede ser medida indirectamente a través de productos que son el resultado de su catabolismo. Así, los nitritos y nitratos son aniones estables derivados del metabolismo del NO que permiten ser cuantificados. Con este fin, se utilizó un ensayo comercial (Cayman's Kit; Alexis corporation, Laufelfingen, Suiza) cuyo método consiste en reducir los nitratos a nitritos, con la nitrato-reductasa, y después medir los nitritos mediante la reacción de Griess. El reactivo de Griess convierte a los nitritos en compuestos de color púrpura, sobre los que se mide la absorbancia en el lector de microplacas a 540 nm. El cálculo de la concentración de nitritos ($\mu\text{mol/L}$) en las muestras, es similar al realizado para las PGs en el punto 3.5.3.

4.C. EFECTOS DEL INHIBIDOR NO ESPECÍFICO DE LA NOS, L-NNA.

El protocolo seguido aquí fue similar al 4.B, pero los animales cirróticos (Cl_4C $n=5$), y sus controles ($n=5$) recibieron N^w -nitro-L-arginina (L-NNA) a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1, y 5 mg/Kg, administrados en bolos intravenosos (0.1 ml/100 g).

4.D. EFECTOS DEL VEHÍCULO.

Este protocolo es un control de tiempo, en el que los animales (Cirróticos por Cl_4C $n=4$ y controles, $n=4$) reciben solamente el vehículo de disolución de las drogas, solución salina al 0.9%. El resto del procedimiento es idéntico al apartado anterior (4.C.).

5. EFECTOS PRESORES Y RENALES DE LA INHIBICIÓN CRÓNICA DE LA SÍNTESIS DE NO EN RATAS CIRRÓTICAS CON ASCITIS.

5.1. Grupos experimentales.

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley macho, cirróticas por inhalación de Cl_4C y sus correspondientes controles, divididos en los siguientes grupos:

1. Aminoguanidina crónica: Animales que reciben AG (100 mg/kg/día) en el agua de bebida durante 10 días. Se han usado 7 ratas cirróticas y 5 controles.
2. L-NAME crónico: Animales que reciben N^w -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 0,5 mg/kg/día) en el agua de bebida durante 10 días. Se han usado 7 ratas cirróticas y 5 controles.
3. Controles de tratamiento: Animales que reciben sólo agua como bebida. Se han usado 4 cirróticas y 4 controles.

La correcta ingesta de las concentraciones indicadas se comprobó diariamente mediante la evaluación de la ingesta de agua.

5.2. Preparación quirúrgica.

Una vez transcurridos los 10 días de tratamiento, se realiza el procedimiento quirúrgico que es idéntico al realizado en el apartado 4.A.2., excepto que en primer lugar, se canula la arteria femoral para realizar la extracción de 250 μ l de sangre, necesarios para evaluar los nitritos y nitratos plasmáticos, previamente a cualquier manipulación. Después le siguen las canulaciones de la tráquea, vena femoral derecha y vejiga urinaria. la solución salino, con 3H -Inulina y PAH, se infunde a razón de 1.5 ml/100g/h.

5.3. Proceso experimental.

Tras la cirugía y el periodo de estabilización, se determina 1 período de 30 min de duración. En la mitad del período experimental se recogen muestras de sangre arterial para determinar el hematocrito, la inulina y PAH plasmáticos, y al final de dicho período se recolectan las muestras de orina para medir la diuresis, natriuresis, y la inulina y PAH urinarios. Al acabar el experimento se obtiene sangre de la vena renal izquierda para conocer la concentración venosa de PAH. Por último se pesan el bazo y ambos riñones.

5.4. Parámetros determinados.

El flujo urinario, la excreción urinaria de sodio, la TFG, el FSR y los niveles plasmáticos de nitratos+nitritos (Nitric Oxide Colorimetric Assay; Boehringer Mannheim, GmbH, Germany), se determinan según los métodos descritos previamente.

6. ESTUDIO MICROCOMPUTERIZADO DE LA MORFOLOGÍA RENAL EN RATAS CIRRÓTICAS POR LCB.

6.1. Grupos experimentales.

Para realizar este protocolo se utilizan los riñones de ratas Sprague-Dawley macho, 5 cirróticas por LCB (15 días tras la cirugía) y 3 controles.

6.2. Preparación quirúrgica.

En primer lugar los animales se anestesian con Inactín, 100 mg/kg, i.p. (Byk Gulden Konstanz, Germany). Tras laparotomía media se colocan tres ligaduras sin anudar: una alrededor de las arterias celíaca y mesentérica superior, otra por encima de la mesentérica superior y la tercera alrededor de la aorta abdominal por debajo de las arterias renales. Dos ligaduras adicionales se sitúan alrededor de ambos hilos renales, también sin anudar, y después se aísla y canula la aorta abdominal distal a las arterias renales. La cánula (aguja epicraneal G16; Vigon, Ecouen, Francia) se conecta mediante una llave de tres vías a un transductor de presión (Recorder 2000, Gould Inc. Instrument System Decision, Cleveland, Ohio) para determinar la PAM del animal y a una bomba de infusión continua (Harvard Apparatus, mod. 22). Se inicia entonces una perfusión retrógrada (1-3 ml/100g/min) a través de la aorta, con una solución salina isotónica que contiene heparina (10 U/L; Elkins-Sinn, Inc. Cherry Hill, NJ) y lidocaína (0.2 mg/ml; Elkins-Sinn) para relajar los vasos. Al mismo tiempo que comenzamos esta infusión de lavado, se corta la vena cava infrarenal hasta que el salino drene, libre de sangre, a su través (3-5 min). La presión de perfusión se mantiene ajustando la tasa de infusión con la bomba. Después comienza el periodo de fijación del tejido renal mediante infusión con formalina (10%) durante 5 min, a cuyo inicio se sacrifica a la rata. Se anudan las ligaduras existentes por arriba de las arterias renales, y se elimina el exceso de formalina con la misma solución del lavado inicial, durante otros 5 min. Una vez fijado el tejido renal, se perfunde un medio de contraste sólido radiopaco de color amarillo, *Microfilm silicone rubber* (MV-122, Canton Bio-Medical Products Inc, Boulder, CO, USA). Cuando el riñón está perfundido completamente adquiere una coloración uniforme y el contraste fluye libremente a través de la vena renal. Entonces, se ligan los hilos renales, los riñones son extraídos y pesados, y se mantienen inmersos en formol (10%) hasta su preparación para el escáner.

6.3. Preparación del riñón para el escáner.

El riñón se sumerge en alcohol 70% durante toda la noche, para preservar los tejidos. Después es transferido sucesivamente a soluciones de glicerina al 30, 50, 75 y 100%, durante 24 horas en cada una de ellas. Tras esto, el riñón se mantiene en acetona durante un minuto, y se limpia con un paño seco para eliminar posibles restos de glicerina. El último paso es introducir al riñón en una resina líquida biosintética (Bio-Plastic, Wards, Rochester, NY) que se endurece al añadir un catalizador. A medida que la reacción avanza, el gel plástico se polimeriza y se convierte en un cristal claro. Entonces el riñón está preparado para ser escaneado.

6.4. Sistema de escáner microcomputerizado (MCT).

Todos los riñones fueron escaneados por el escáner-MCT de la Clínica Mayo (Rochester, Minnesota). El diseño de este sistema está basado en una modificación del desarrollado inicialmente por Flannery y cols. en 1987 (Ritman y cols., 1997). Básicamente, consiste en un tubo espectroscópico (foco de molibdeno, PW 2275/20; Phillips), como fuente de rayos X, con un punto focal de 0.6 x 0.4 mm. Los rayos pasan a través del riñón que es rotado en incrementos angulares de 0.499 grados, durante 85 segundos, lo que proporciona 721 perspectivas distintas cada 360 grados de rotación. La imagen de cada proyección se consigue gracias a un cristal brillante de cesio iodado cargado con talio, y es grabada en una cámara de vídeo (Princeton Instruments TE/ccd-1025 TKB/PI-1) conectada a un procesador (ordenador Sun Microsystems, Inc.). En la cámara las imágenes son digitalizadas (16 bits) y se almacenan en pequeñas cajas de información (*pixels*) formadas por distintas tonalidades del color gris, cuya escala puede alcanzar 65.000 tonos diferentes. Como el tejido es rotado en incrementos muy pequeños, los *pixels* son agrupados en volúmenes (*voxels*) en el proceso de reconstrucción tridimensional de las imágenes. Para esto se utiliza el algoritmo de retroproyección de Feldkamp y cols. (1984), modificado. El tamaño de los *voxels* depende de la magnificación óptica que se consigue mediante una lente (Nikon, 50 mm f/2.8), situada entre el cristal brillante y la cámara. En este estudio, todos los riñones fueron escaneados a una magnificación 1X, que originó *pixels* de 42 μm de tamaño, aunque la máxima resolución realizable es de 6 μm . La proyección tridimensional se crea a partir de la información recogida de todas las imágenes reconstruidas hacia volúmenes o rodajas (*slices*).

6.5. Análisis de las imágenes.

Un programa de ordenador, *Analyzetm* (Robb y Hanson, 1991), nos proporciona los métodos para analizar las imágenes volumétricas reconstruidas, de tal manera que la arquitectura vascular renal puede ser representada de diferentes formas, a fin de obtener una mejor visualización de las regiones de interés. Los parámetros determinados han sido:

1. Volumen tisular (mm^3): Para medir el volumen de los riñones y sus regiones se utilizó la aplicación "*stereology*" que distribuye de forma ordenada puntos espaciados ortogonalmente 2.1 mm a lo largo del volumen escaneado total. La fracción de volumen en las regiones de interés se determina contando el número de puntos dentro de los límites del tejido, y dividiendo por el número total de puntos. El volumen de tejido se determina multiplicando el tejido de interés por el volumen total escaneado de la imagen (figura 1).

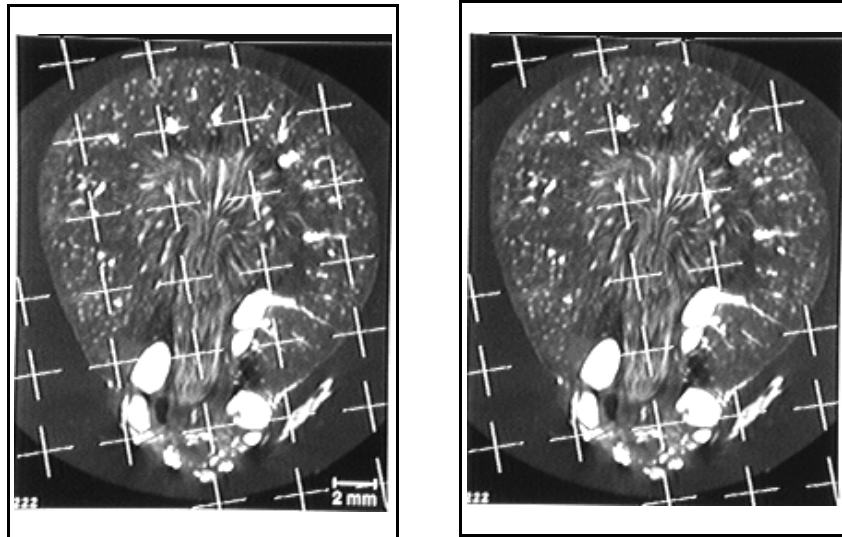


Figura 3. Visualización de la aplicación utilizada para la estimación del volumen tisular.

2. Fracción de volumen vascular (%): Se determina siguiendo el método de Hillman y cols. (1982), sobre cortes medio-transversales que incluyen corteza, tira externa e interna de la médula externa (TEME y TIME, respectivamente) y médula interna (figura 2). La opacidad media se mide en el interior de una arteria interlobar (O_{arteria}), en los tejidos (O_{tejidos}), y en la matriz de resina sintética (bioplástico, O_{bp}) en la que el riñón queda inmerso antes de ser escaneado. La fracción de volumen vascular en un tejido se determina como:

$$(O_{\text{tejidos}} - O_{\text{bp}}) / (O_{\text{arteria}} - O_{\text{bp}})$$

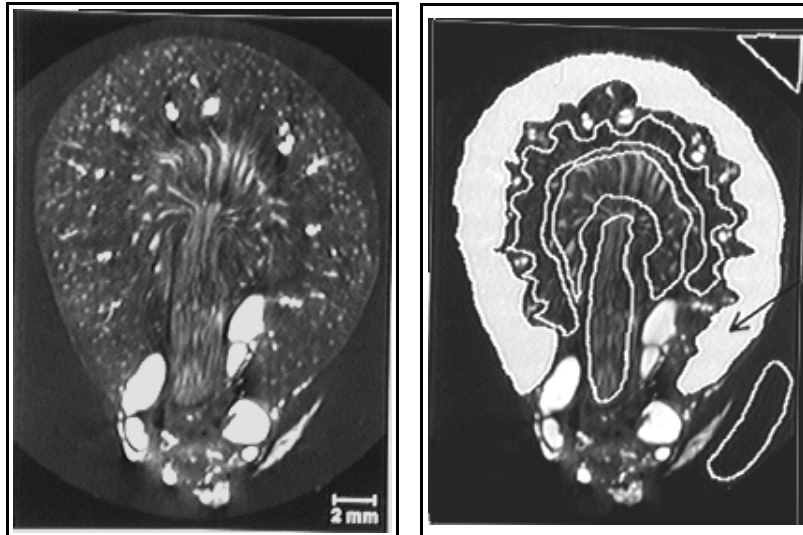


Figura 4. Visualización de la aplicación utilizada para la estimación del volumen vascular.

3. Diámetros de vasos (μm): Medidos mediante el teorema de Pitágoras y utilizando la aplicación del programa *compás de calibres* (figura 3).

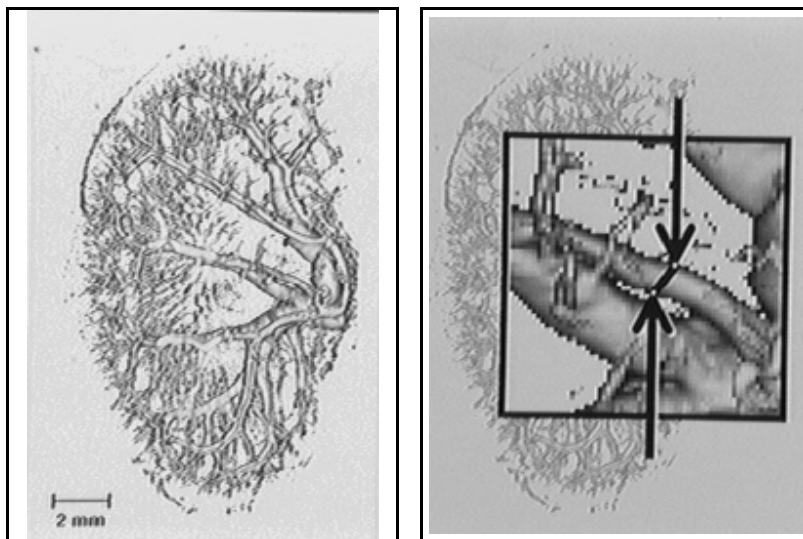


Figura 5. Visualización de la aplicación utilizada para la estimación del diámetro vascular.

III- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Los resultados se expresan como la media \pm un error estándar. Para valorar las diferencias estadísticas dentro de un mismo grupo aplicamos el análisis de varianza simple para comparaciones múltiples, y cuando los resultados fueron significativos se realiza el test de Duncan para obtener las diferencias estadísticas dos a dos. Las diferencias entre grupos se evalúan mediante análisis de varianza doble para comparaciones múltiples y cuando es necesario se realiza el test de Duncan posterior. El resto de comparaciones entre grupos de las DE₅₀ del protocolo 1 y de todas las medias de los protocolos 4 y 5 se realiza con la t de Student, considerando estadísticamente significativo un valor del nivel de significación $p < 0,05$.

RESULTADOS

DIAGNÓSTICO DE CIRROSIS.

Todas las ratas cirróticas por inhalación crónica de Cl₄C mostraron coluria y un abdomen abombado que unido a la presencia de líquido ascítico en la bolsa escrotal nos ayudó a realizar un diagnóstico rápido para la elección inicial de los animales que serían sometidos a experimentación. La inspección abdominal reveló un hígado de consistencia firme y tamaño variable, esplenomegalia y colaterales portosistémicas, edema mesentérico y ascitis de grado variable (entre 10 y 30 ml). El estudio histológico reveló una cirrosis micronodular con importante desestructuración de la arquitectura hepática, presencia de necrosis de hepatocitos y nódulos de regeneración rodeados de gruesos tractos fibrosos. En este modelo de cirrosis experimental (Cl₄C), además de la proliferación de los conductos biliares, aparece esteatosis en las células hepáticas.

En el modelo de cirrosis secundaria a la ligadura del conducto biliar (LCB) son especialmente llamativas la coluria y la ictericia, consecuencias de la hiperbilirrubinemia conjugada. La inspección abdominal es básicamente similar a los animales anteriores, excepto que el hígado y los riñones adquieren un característico color verde oliva y que la ascitis, cuando estuvo presente, fue de menor cuantía (5-10 ml). Lo mismo ocurrió con el análisis histológico que como en el caso anterior puso de manifiesto una cirrosis micronodular con la peculiaridad de presentar una gran dilatación y neoformación de numerosos canalículos biliares por todo el tejido hepático y acúmulo de pigmento biliar en los hepatocitos.

PROTOCOLO 1. ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD VASCULAR EN ANILLOS AÓRTICOS DE RATAS CIRRÓTICAS POR LIGADURA CRÓNICA DEL CONDUCTO BILIAR.

El día del experimento, 28 ± 2 días después de la cirugía, el peso de los animales fue de 327.0 ± 18.0 g en las LCB y 361.5 ± 24.9 g en los controles. Todos los animales con LCB presentaron ascitis en una cantidad variable. El tamaño del bazo estuvo aumentado significativamente en las ratas cirróticas respecto a los controles (2.14 ± 0.21 vs 0.73 ± 0.02 g). La respuesta contráctil a FE (figura 1 y tabla 1) fue significativamente menor en los anillos de los animales LCB que en los controles. La administración de L-NAME aumentó significativamente y desplazó hacia la izquierda esta respuesta en ambos grupos, de forma que eliminó la hiporrespuesta en los anillos de animales con LCB.

La respuesta contráctil a FE (figura 1 y tabla 1) fue significativamente menor en los anillos de los animales LCB que en los controles. La administración de L-NAME aumentó significativamente y desplazó hacia la izquierda esta respuesta en ambos grupos, de forma que eliminó la hiporrespuesta en los anillos de animales con LCB. De forma similar, la eliminación del endotelio provocó un aumento significativo de la contracción, también en ambos grupos, pero esta maniobra no consiguió suprimir completamente la hiporrespuesta de los anillos de animales cirróticos. En contraste con estos resultados, el tratamiento de los anillos con AG potenció ligeramente la contracción a FE en ambos grupos, permaneciendo evidente la menor respuesta en los animales cirróticos.

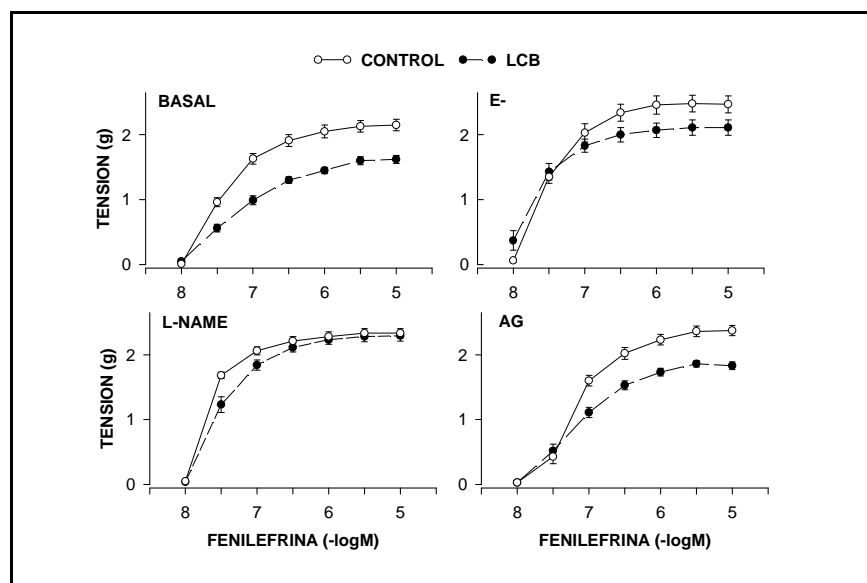


Figura 1. Respuesta vasoconstrictora en anillos aórticos de ratas controles y con LCB. E-, anillos sin endotelio; AG, aminoguanidina; L-NAME, N^w-nitro-L-arginina metil ester.

Los valores de la DE_{50} fueron similares entre grupos, controles y LCB, en todas las condiciones experimentales. Sin embargo, el L-NAME y la eliminación del endotelio disminuyeron significativamente este valor respecto a la situación basal, y la AG, por el contrario, aumentó la DE_{50} también de forma significativa (tabla 1).

Respecto a la respuesta vasodilatadora (figura 2 y tabla 2), la ACH causó una relajación semejante en ambos grupos de anillos, de modo que no existieron diferencias entre los animales cirróticos y los controles. La vasodilatación producida por la ACH fue eliminada en presencia de L-NAME y después de suprimir el endotelio, en ambos grupos; sin embargo, la administración de AG no modificó la curva de relajación con ACH en ninguno de ellos, ni en los anillos de animales controles ni en los cirróticos.

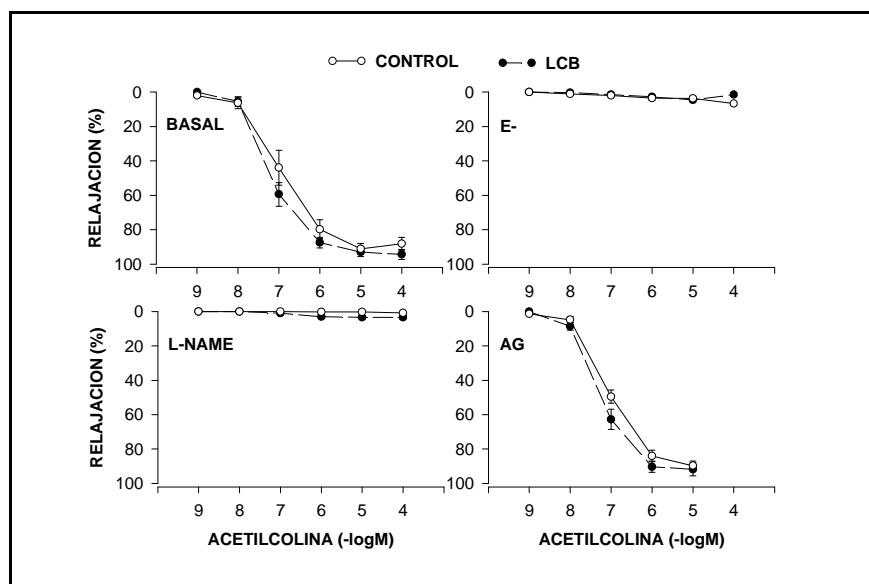


Figura 2. Respuesta vasodilatadora en anillos aórticos de ratas controles y con LCB. E-, anillos sin endotelio; AG, aminoguanidina; L-NAME, N^W -nitro-L-arginina metil ester.

Tabla 1. Valores de DE₅₀ y de contracción máxima a fenilefrina (Max, g) en anillos aórticos de ratas controles y con ligadura del conducto biliar.

FENILEFRINA		DE ₅₀ (10 ⁻⁷ M)	Max (g)
BASAL	CONTROL (11)	0.83 ± 0.14	2.15 ± 0.09
	LCB (12)	1.10 ± 0.15	1.62 ± 0.06+*
L-NAME	CONTROL (12)	0.26 ± 0.02+	2.33 ± 0.07+
	LCB (10)	0.53 ± 0.11+	2.29 ± 0.08+
E-	CONTROL (9)	0.47 ± 0.06+	2.47 ± 0.13+
	LCB (10)	0.29 ± 0.05+	2.11 ± 0.12+*
AG	CONTROL (11)	1.20 ± 0.10+	2.37 ± 0.08+
	LCB (15)	1.27 ± 0.14	1.83 ± 0.06+

El número en paréntesis es el número de anillos de 3 a 4 ratas; E-, sin endotelio; AG, aminoguanidina. +, p < 0.05 respecto a los anillos en condiciones basales; *, p < 0.05 respecto a los anillos controles.

Tabla 2. Valores de DE₅₀ y de relajación máxima a acetilcolina (%) en anillos aórticos, precontraídos con fenilefrina, de ratas controles y con ligadura del conducto biliar.

ACETILCOLINA		DE ₅₀ (10 ⁻⁶ M)	%
BASAL	CONTROL	0.24 ± 0.05	91.1 ± 3.1
	LCB	0.13 ± 0.02*	94.4 ± 2.9
L-NAME	CONTROL	n.d.	0.9 ± 0.6+
	LCB	n.d.	3.5 ± 1.1+
E-	CONTROL	n.d.	6.8 ± 0.8+
	LCB	n.d.	4.5 ± 1.1+
AG	CONTROL	0.16 ± 0.03	89.7 ± 2.7
	LCB	0.13 ± 0.01	91.8 ± 3.7

El número entre paréntesis es el número de anillos de 3 a 4 ratas; n.d., no determinado; E-, sin endotelio; AG, aminoguanidina.. +, p < 0.05 respecto a los anillos en condiciones basales; *, p < 0.05 respecto a los anillos controles

PROTOCOLO 2. ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN RIÑÓN Y AORTA DE RATAS CIRRÓTICAS Y CON LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR.

La tabla 3 muestra los valores de actividad de NOS, constitutiva o dependiente de calcio (NOSc) e inducible o independiente de calcio (NOSi), en los riñones y aorta torácica en los diferentes grupos experimentales. Como se aprecia, en los animales cirróticos por Cl₄C no hubo diferencias en las actividades de la NOS en el riñón, aunque la actividad NOSi fue el doble en estos animales cirróticos. Respecto a la aorta, la actividad NOSc fue significativamente mayor en los cirróticos y no hubo diferencias en la NOSi. En los animales con LCB, no hubo diferencias significativas en la NOSc en ninguno de los órganos, mientras que la NOSi fue significativamente mayor sólo en el riñón de los animales LCB. Estos datos se expresan también en la figura 3.

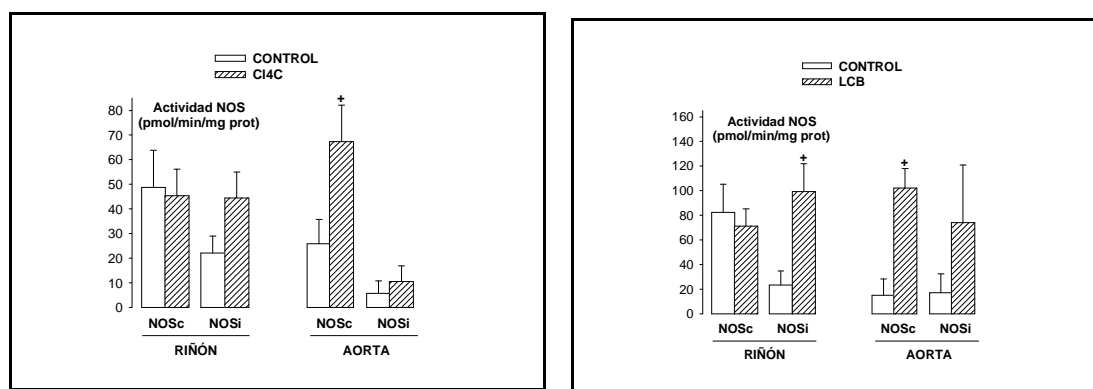


Figura 3 y Tabla 3. Actividad de NOS constitutiva (NOSc) e inducible (NOSi) en riñón y aorta torácica de ratas cirróticas por Cl₄C y por ligadura del conducto biliar (LCB). +, p<0.05 vs CONTROL.

Tabla 3. +, p < 0.05 vs CONTROL.

	NOS Constitutiva		NOS Inducible	
	CONTROL	Cl ₄ C	CONTROL	Cl ₄ C
RIÑÓN	48.79 ± 15.01	45.42 ± 10.75	22.11 ± 6.86	44.44 ± 10.51
AORTA	25.91 ± 9.86	67.39 ± 14.70+	5.71 ± 5.11	10.60 ± 6.30
	CONTROL	LCB	CONTROL	LCB
RIÑÓN	82.24 ± 23.06	71.18 ± 14.11	23.20 ± 11.63	99.22 ± 22.67+
AORTA	14.90 ± 13.33	102.18 ± 15.87+	17.07 ± 15.27	74.14 ± 46.78

PROTOCOLO 3. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN AGUDA DE LA SÍNTESIS DE NO Y DE LAS PROSTAGLANDINAS SOBRE LA HEMODINÁMICA RENAL DE RATAS CON CIRROSIS POR TETRACLORURO DE CARBONO (Cl₄C).

3.A. Estudios hemodinámicos renales.

El peso de los animales tratados primero con el bolo de L-NAME (estudio 1) fue similar entre los cirróticos (234.2 ± 9.6 g) y los controles (252.0 ± 2.4), a diferencia del grupo tratado primero con indometacina (estudio 2) donde los animales con cirrosis (240.1 ± 6.6) pesaron menos que los controles (283.4 ± 5.9). Esto se invirtió en caso del peso renal que fue significativamente mayor en los animales cirróticos, pero sólo en el grupo tratado con L-NAME en primer lugar (1.06 ± 0.04 vs 0.94 ± 0.02 en el estudio 1 y 1.02 ± 0.07 vs 0.90 ± 0.03 en el estudio 2). En cualquier caso, las ratas cirróticas mostraron un bazo significativamente aumentado respecto a sus controles (1.03 ± 0.02 vs 0.69 ± 0.01 en el estudio 1 y 1.10 ± 0.11 vs 0.70 ± 0.02 en el estudio 2) y ascitis en una cantidad variable.

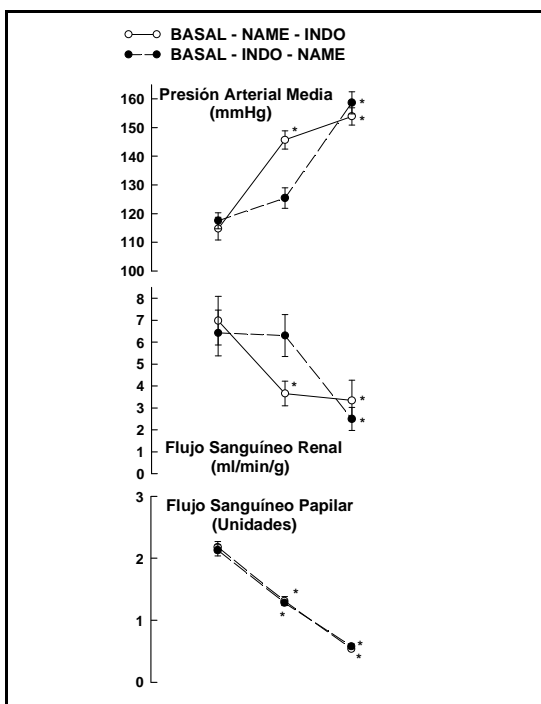


Figura 4. Efectos presores y renales de la inhibición de la síntesis del NO (L-NAME) y las prostaglandinas (INDO) en ratas controles. *, $p < 0.05$ vs basal.

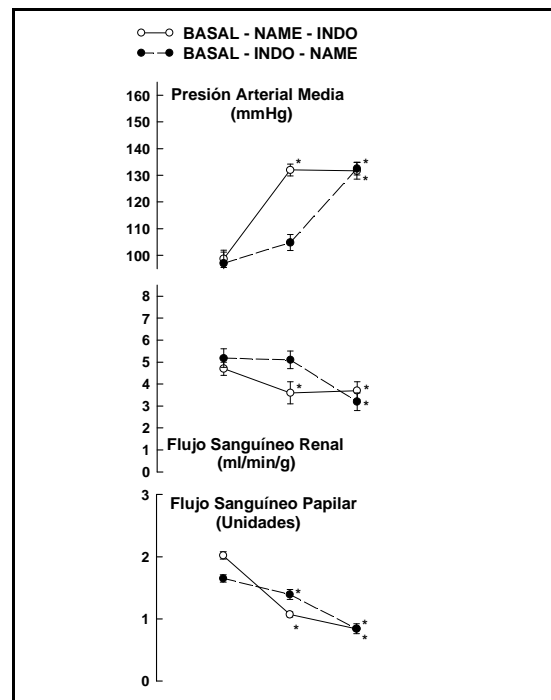


Figura 5. Efectos presores y renales de la inhibición de la síntesis del NO (L-NAME) y las prostaglandinas (INDO) en ratas cirróticas. *, $p < 0.05$ vs basal.

En los animales controles, (figura 4 y tabla 4), la administración de L-NAME aumentó la PAM y disminuyó el FSP y el FSR, todos de forma significativa. La subsiguiente administración de indometacina no modificó la PAM ni el FSR aunque disminuyó significativamente el FSP. En el estudio 2, la administración de indometacina primero, sólo disminuyó de forma significativa el FSP y la administración posterior de L-NAME aumentó la PAM y disminuyó ambos flujos renales. En los animales cirróticos (figura 5 y tabla 5), que mostraron menor PAM y FSP basales que los controles, los cambios inducidos por la administración de ambas drogas fueron en el mismo sentido que los ocurridos en los controles, aunque de distinta magnitud.

Las figuras 6a y 6b y las tablas 6 y 7 ofrecen los resultados porcentuales para una mejor comprensión. Como se observa, la PAM se comportó de forma similar en ambos grupos, aumentando alrededor de un 30% como resultado de la administración del inhibidor del NO. Sin embargo, el efecto presor de la indometacina es mucho menor, por debajo del 10%. Por lo que hace al FSR, el efecto predominante es el del L-NAME que lo descende en ambos grupos aunque más en los controles que en los cirróticos. La indometacina, por el contrario no modifica apenas este parámetro. Donde sí se aprecian mayores diferencias entre ambos grupos es en el comportamiento del FSP. Así, en los animales controles, tanto el L-NAME como la indometacina descenden el FSP en un porcentaje similar e independiente del orden. Sin embargo, en los cirróticos, el L-NAME tiene mayor efecto que la indometacina, lo que indicaría una mayor cantidad de NO que de prostaglandinas en la papila de los animales cirróticos. Los valores del hematocrito, siempre significativamente más bajos en las ratas con cirrosis (41.0 ± 1.1 % vs 46.0 ± 0.2 en el estudio 1 y 38.5 ± 1.4 vs 45.0 ± 0.7 en el estudio 2), permanecieron sin cambios durante la realización del experimento en los dos grupos experimentales.

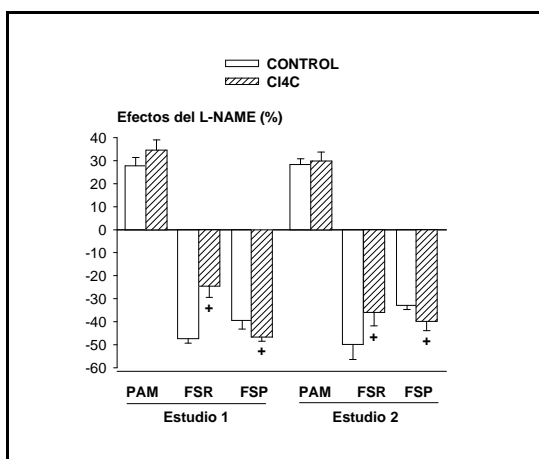


Figura 6a. Efectos porcentuales del L-NAME en ratas controles. +, $p < 0.05$ vs basal.

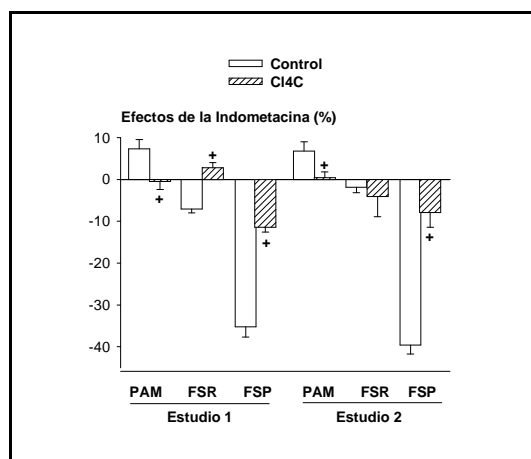


Figura 6b. Efectos porcentuales de la Indometacina en ratas cirróticas. +, $p < 0.05$ vs basal.

3.B. Estudios metabólicos.

En este estudio (tabla 8), el peso de los animales fue inferior en los cirróticos, y en ellos la existencia de ascitis se detectó por inspección abdominal y por la presencia de líquido ascítico en la bolsa escrotal, antes de introducir a los animales en las jaulas metabólicas. Aunque la ingesta de sodio fue similar en ambos grupos, la diuresis y la natriuresis de 24 h fueron menores en el grupo de ratas con cirrosis. El balance de sodio, por el contrario, fue superior en los animales cirróticos solamente durante el segundo día objeto del estudio, aunque el balance acumulado en los dos días es significativamente mayor en los animales cirróticos. La excreción urinaria de prostaglandinas (PGE_2 y PGI_2) fue superior en estos animales durante el primer día, mientras que en el segundo día, este aumento sólo resultó significativo para la excreción de PGE_2 .

Tabla 4. Efectos de la inhibición del NO y de las PGs en ratas controles.

ESTUDIO 1			
	BASAL	L-NAME	INDO
PAM	114.8 ± 3.9	145.7 ± 3.2*	153.9 ± 3.0
FSR	6.9 ± 1.1	3.7 ± 0.6*	3.4 ± 0.9
FSP	2.18 ± 0.09	1.31 ± 0.07*	0.54 ± 0.03*+
ESTUDIO 2			
	BASAL	INDO	L-NAME
PAM	117.5 ± 2.8	125.4 ± 3.5	158.7 ± 3.9*
FSR	6.4 ± 1.0	6.3 ± 0.9	3.1 ± 0.1*+
FSP	2.13 ± 0.09	1.28 ± 0.04*	0.58 ± 0.04*+

PAM, presión arterial media (mmHg); FSR, flujo sanguíneo renal (ml/min/g); FSP, flujo sanguíneo papilar (unidades); *, p < 0.05 vs basal; +, p < 0.05 vs periodo anterior.

Tabla 5. Efectos de la inhibición del NO y de las PGs en ratas cirróticas.

ESTUDIO 1			
	BASAL	L-NAME	INDO
PAM	98.7 ± 3.3	132.0 ± 2.2*	131.7 ± 3.1
FSR	4.7 ± 0.3	3.6 ± 0.5*	3.7 ± 0.4
FSP	2.02 ± 0.06	1.07 ± 0.04*	0.84 ± 0.02*+
ESTUDIO 2			
	BASAL	INDO	L-NAME
PAM	102.9 ± 4.4	103.1 ± 4.1	132.9 ± 2.9*+
FSR	5.2 ± 0.4	5.1 ± 0.4	3.2 ± 0.4*+
FSP	1.66 ± 0.07	1.51 ± 0.05*	0.86 ± 0.06*+

PAM, presión arterial media (mmHg); FSR, flujo sanguíneo renal (ml/min/g); FSP, flujo sanguíneo papilar (unidades); *, p < 0.05 vs basal; +, p < 0.05 vs periodo anterior.

Tabla 6. Efectos porcentuales de la inhibición del NO y de las PGs en ratas controles.

	ESTUDIO 1		ESTUDIO 2	
	L-NAME	INDO	INDO	L-NAME
PAM	27.8 ± 3.6	7.3 ± 2.2	6.8 ± 2.2	28.3 ± 2.5
FSR	-47.4 ± 1.9	-7.1 ± 0.9	-1.9 ± 1.3	-49.8 ± 6.6
FSP	-39.4 ± 3.8	-35.2 ± 2.5	-39.6 ± 2.1	-32.9 ± 1.8

PAM, presión arterial media; FSR, flujo sanguíneo renal; FSP, flujo sanguíneo papilar.

Tabla 7. Efectos porcentuales de la inhibición del NO y de las PGs en ratas cirróticas.

	ESTUDIO 1		ESTUDIO 2	
	L-NAME	INDO	INDO	L-NAME
PAM	34.5 ± 4.5	-0.5 ± 1.9+	0.4 ± 1.4+	29.8 ± 3.9
FSR	-24.5 ± 4.9+	2.8 ± 1.2+	-4.1 ± 4.8	-35.9 ± 5.9
FSP	-46.6 ± 1.9+	-11.4 ± 1.2+	-7.9 ± 3.5+	-39.9 ± 3.9

PAM, presión arterial media; FSR, flujo sanguíneo renal; FSP, flujo sanguíneo papilar; +, p < 0.05 vs porcentaje en los animales controles (tabla 6).

Tabla 8. Balance de sodio en animales controles y cirróticos (Cl₄C).

	CTRL DIA1	CIR DIA1	CTRL DIA2	CIR DIA 2
Peso corporal (g)	288.0 ± 4.9	225.0 ± 5.2+	-	-
Ingesta de sodio (mEq)	1.67 ± 0.10	1.30 ± 0.14	1.71 ± 0.06	1.60 ± 0.08
Diuresis (ml)	7.36 ± 0.66	4.79 ± 0.20+	7.72 ± 0.44	5.93 ± 0.57+
Natriuresis (mEq)	0.89 ± 0.10	0.35 ± 0.16+	0.80 ± 0.07	0.22 ± 0.05+
Balance de sodio	0.78 ± 0.02	0.95 ± 0.25	0.91 ± 0.12	1.38 ± 0.11+
Excreción de PGI ₂ (ng/24h)	18.5 ± 1.9	23.8 ± 0.9+	20.5 ± 1.5	26.6 ± 2.4
Excreción de PGE ₂ (µg/24h)	1.48 ± 0.03	2.22 ± 0.06+	1.04 ± 0.09	2.09 ± 0.15+

CTRL, animales controles; CIR, animales cirróticos; +, p < 0.05 vs CTRL.

PROTOCOLO 4. EFECTOS PRESORES Y RENALES DE LA INHIBICIÓN AGUDA DE LA SÍNTESIS DE NO.

4.A. Efectos de la aminoguanidina (AG) en ratas con ligadura del conducto biliar (LCB).

Todos los experimentos se realizaron durante la 4ª semana posterior a la LCB (23-25 días) y en ninguna de las ratas se detectó la existencia de ascitis. El peso de los animales cirróticos y el de los controles fue similar, aunque el del bazo y el los riñones fue mayor en los animales con cirrosis (tabla 9).

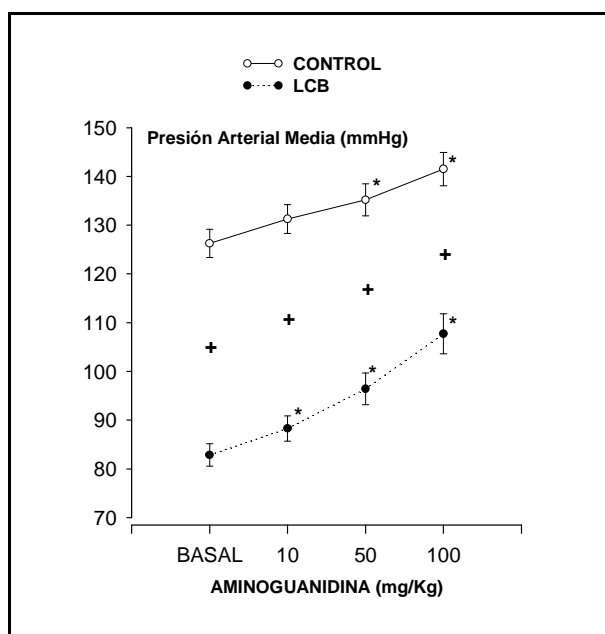


Figura 7. Efectos presores de la AG en ratas controles y con LCB. *, $p < 0.05$ vs basal; +, $p < 0.05$ vs control.

La PAM (figura 7 y tabla 10) basal que presentaron las ratas con cirrosis biliar fue significativamente menor que sus controles. La AG elevó de modo significativo la PAM de los animales LCB en todas las dosis administradas, y en las dosis de 50 y 100 mg/Kg de los controles. Aunque no se consiguió eliminar las diferencias entre ambos grupos, el incremento total de la PAM sufrido por las LCB fue mayor que el de las controles (26.5 ± 4.4 mmHg vs 13.6 ± 2.6). La administración de L-NAME tras la última dosis de AG, aumentó la PAM de forma similar en ambos grupos (26.0 ± 2.8 en LCB y 26.5 ± 1.4 mmHg en los controles). Al igual que la PAM, la diuresis y natriuresis (figura 8 y tablas 11 y 12) basales también estuvieron disminuidas en los animales con LCB y, tras la administración de aminoguanidina, aumentaron de forma significativa y dependiente de la dosis. En los controles, sólo la última dosis de AG aumentó significativamente estos parámetros.

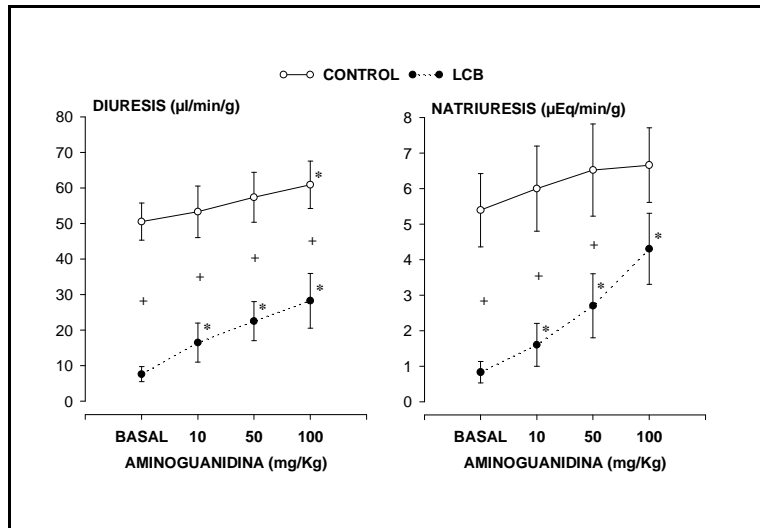


Figura 8. Efectos excretores de la AG en ratas controles y con LCB. *, $p < 0.05$ vs basal; +, $p < 0.05$ vs control.

Lo mismo ocurrió con la TFG (figura 9 y tabla 13), pero el incremento tras la primera dosis de AG no se modificó con las dosis superiores. En los controles, la AG no modificó de forma significativa estos parámetros, excepto por el aumento de la diuresis con la última dosis de AG. En cuanto al FSR (figura 9 y tabla 14), cuyos valores fueron similares en ambos grupos, disminuyó solamente con la última dosis de AG tanto en el grupo cirrótico como en el control.

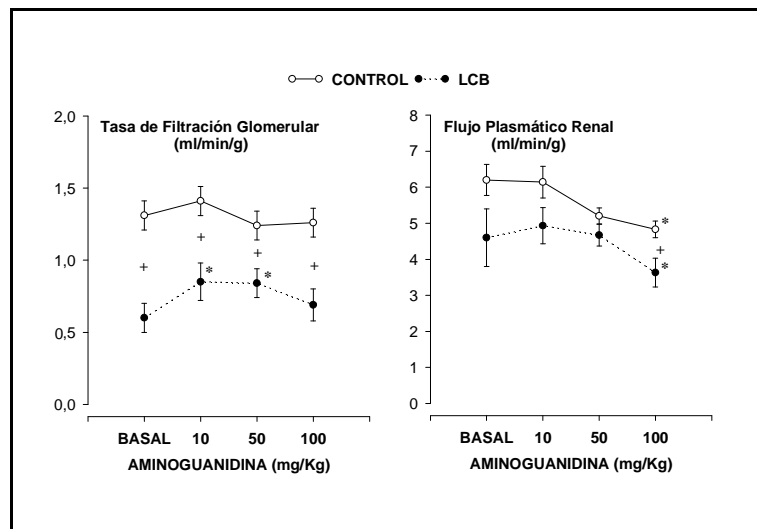


Figura 9. Efectos hemodinámicos renales de la AG en ratas controles y con LCB. *, $p < 0.05$ vs basal; +, $p < 0.05$ vs control.

Tabla 9. Variables generales de los animales controles y con ligadura del conducto biliar (LCB) usados para la administración aguda de aminoguanidina.

	PESO (g)	PESO RENAL (g)	PESO BAZO (g)
CONTROL	277.5 ± 9.7	2.28 ± 0.08	0.90 ± 0.06
LCB	286.4 ± 10.9	2.82 ± 0.13+	1.81 ± 0.13+

+, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 10. Cambios de **PRESIÓN ARTERIAL MEDIA** (mmHg) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y con ligadura del conducto biliar.

	BASAL	AG 10	AG 50	AG 100
CONTROL	126.3 ± 2.4	131.3 ± 2.9	135.2 ± 3.3*	139.8 ± 3.5*
LCB	82.9 ± 2.3+	88.3 ± 2.6*+	96.4 ± 3.2*+	107.7 ± 4.1*+

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 11. Cambios de **DIURESIS** (µl/min/g) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y con ligadura del conducto biliar.

	BASAL	AG 10	AG 50	AG 100
CONTROL	50.5 ± 6.2	53.3 ± 7.2	57.4 ± 7.0	60.9 ± 6.7*
LCB	7.6 ± 0.9+	16.5 ± 5.5*+	22.5 ± 5.5*+	28.3 ± 7.7*+

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 12. Cambios de **NATRIURESIS** (µEq/min/g) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y con ligadura del conducto biliar.

	BASAL	AG 10	AG 50	AG 100
CONTROL	5.4 ± 1.0	6.0 ± 1.2	6.5 ± 1.3	6.7 ± 1.3
LCB	0.2 ± 0.3+	1.6 ± 0.6*+	2.7 ± 0.9*+	4.3 ± 1.5*+

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 13. Cambios de la **TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR** (ml/min/g) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y con ligadura del conducto biliar.

	BASAL	AG 10	AG 50	AG 100
CONTROL	1.31 ± 0.06	1.41 ± 0.07	1.24 ± 0.06	1.26 ± 0.05
LCB	0.59 ± 0.07+	0.85 ± 0.13*+	0.84 ± 0.09*+	0.69 ± 0.11+

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 14. Cambios de **FLUJO PLASMÁTICO RENAL** (ml/min/g) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y con ligadura del conducto biliar.

	BASAL	AG 10	AG 50	AG 100
CONTROL	6.19 ± 0.43	6.14 ± 0.44	5.19 ± 0.22	4.83 ± 0.13
LCB	4.60 ± 0.77	4.93 ± 0.46	4.67 ± 0.26	3.63 ± 0.35*+

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

PROTOCOLO 4.B. Efectos de la AG en la cirrosis inducida por Cl₄C.

Todos los animales de este protocolo y de los dos siguientes (4.C. y 4.D) presentaron ascitis con una cantidad entre 10 y 30 ml. En este apartado, el peso corporal de los cirróticos fue menor que el de los controles, aunque el renal y el del bazo fueron mayores en los cirróticos (tabla 15).

La PAM basal (figura 10 y tabla 16), significativamente menor en las ratas cirróticas, aumentó de forma progresiva desde la dosis más baja de AG, produciendo un incremento global de unos 30 mmHg. En contraste, la PAM de las controles aumentó únicamente tras la administración de la dosis más alta, ocasionando en estos animales un aumento total de 12 mmHg. A pesar de esto, la AG no logró eliminar las diferencias entre las PAM de los dos grupos de animales.

La excreción basal de sodio y agua (figura 11 y tablas 17 y 18), también menores en los animales cirróticos, aumentó con cada dosis de AG hasta igualar los valores de los animales controles con la dosis de 50 mg/kg. Aunque la última dosis superó los valores controles, no lo hizo de forma significativa. Los parámetros no se modificaron en los controles, excepto en las dos últimas dosis de AG.

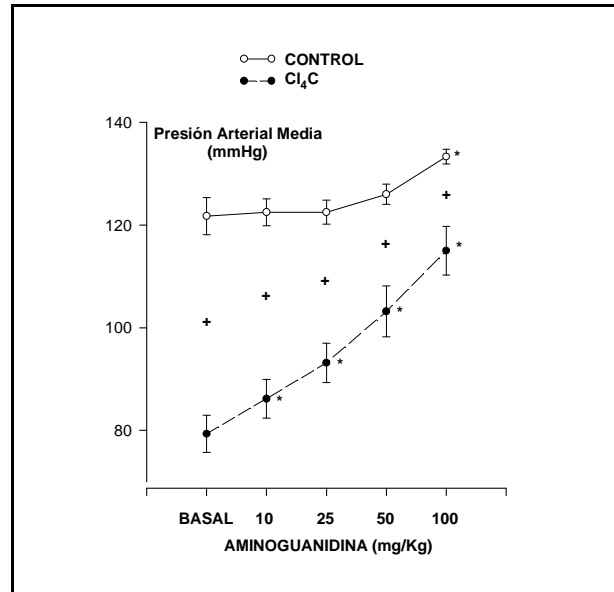


Figura 10. Efectos presores de la AG en ratas controles y cirróticas. *, p<0.05 vs basal; +, p<0.05 vs control.

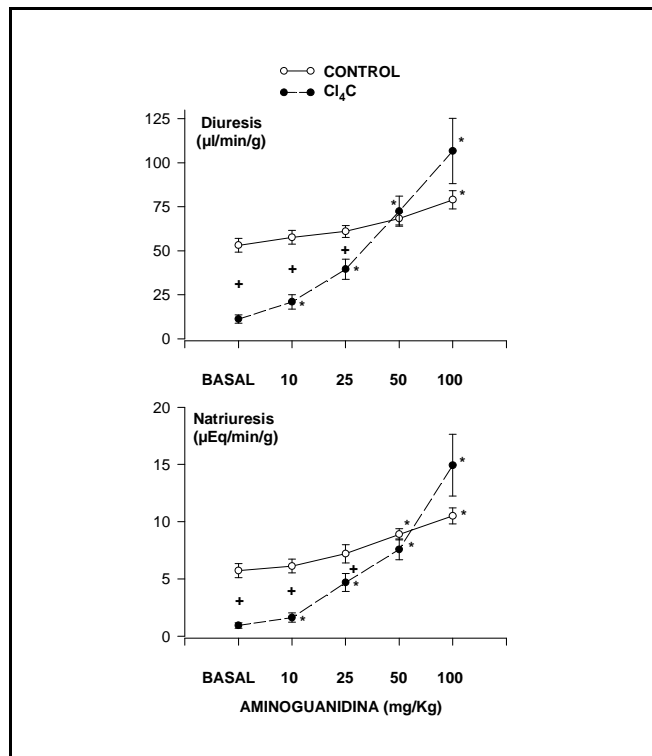


Figura 11. Efectos excretores de la AG en ratas controles y cirróticas. *, p<0.05 vs basal; +, p<0.05 vs control.

La TFG (figura 12 y tabla 19) no se afectó mucho por la administración de AG, aunque basalmente los valores de los cirróticos fueron significativamente más bajos que los controles y hay una tendencia a disminuir ligeramente en ambos grupos.

El hematocrito (figura 12 y tabla 20), que fue significativamente menor en las ratas con cirrosis, se mantuvo sin cambios a lo largo de todo el experimento en los dos grupos experimentales.

En cuanto a los niveles plasmáticos de nitratos+nitritos (figura 13 y tabla 21), estuvieron significativamente elevados en los animales con cirrosis comparados con los controles y la AG los disminuyó de manera dependiente de la dosis, igualándolos con las dos primeras dosis a los niveles mostrados por los animales controles. En este último grupo, los nitritos y nitratos plasmáticos no se alteraron en la mayor parte del experimento, si bien la última dosis de AG los disminuyó significativamente.

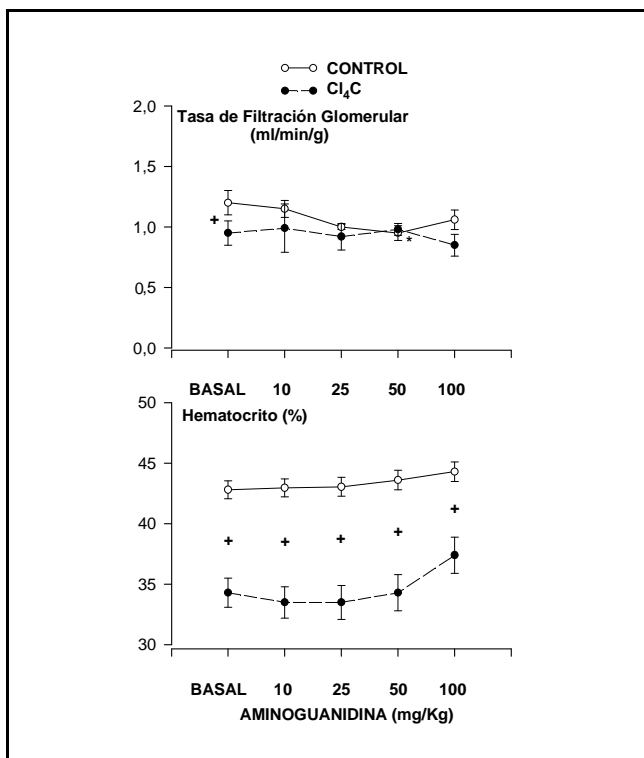


Figura 12. Efectos de la AG sobre la TFG y el hematocrito en ratas controles y cirróticas. *, $p < 0.05$ vs basal; +, $p < 0.05$ vs control.

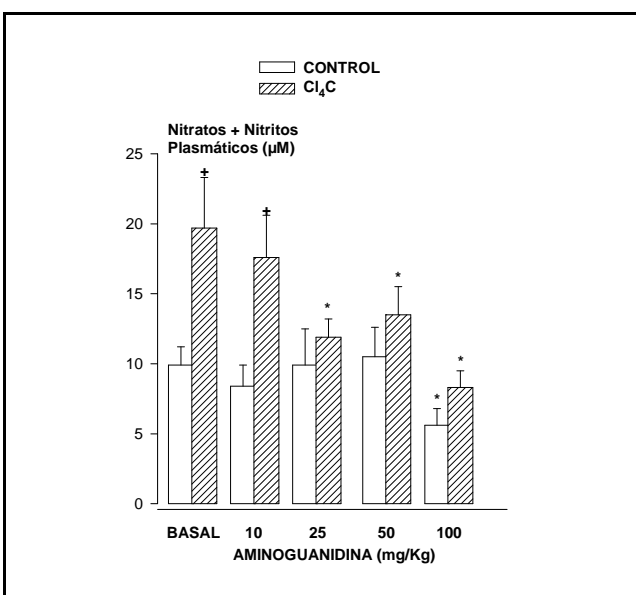


Figura 13. Efectos de la AG sobre la concentración plasmática de nitrato+nitritos en ratas controles y cirróticas. *, $p < 0.05$ vs basal; +, $p < 0.05$ vs control.

Tabla 15. Variables generales de los animales controles y cirróticos (Cl₄C) usados para la administración aguda de aminoguanidina.

	PESO (g)	PESO RENAL (g)	PESO BAZO (g)
CONTROL	479.5 ± 13.8	3.5 ± 0.1	0.83 ± 0.05
Cl ₄ C	446.0 ± 7.5+	4.1 ± 0.1+	2.90 ± 0.35+

+, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 16. Cambios de **PRESIÓN ARTERIAL MEDIA** (mmHg) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	AG 10	AG 25	AG 50	AG 100
CONTROL	121.8 ± 3.6	122.5 ± 2.6	122.5 ± 2.4	126.0 ± 1.9	133.3 ± 1.4*
Cl ₄ C	79.3 ± 3.6+	86.2 ± 3.7*+	93.2 ± 3.9*+	103.2±4.9*+	115.0±4.7*+

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 17. Cambios de **DIURESIS** (μl/min/g) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	AG 10	AG 25	AG 50	AG 100
CONTROL	53.1 ± 3.9	57.6 ± 3.9	60.9 ± 3.4	68.3 ± 3.6	78.9 ± 5.1*
Cl ₄ C	11.2 ± 2.4+	20.9 ± 4.1*+	39.5 ± 5.8*+	72.4 ± 8.5*	106.7±18.5*

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 18. Cambios de **NATRIURESIS** (μEq/min/g) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	AG 10	AG 25	AG 50	AG 100
CONTROL	5.7 ± 0.6	6.1 ± 0.6	7.2 ± 0.8	8.9 ± 0.5*	10.5 ± 0.7*
Cl ₄ C	0.9 ± 0.2+	1.6 ± 0.4*+	4.7 ± 0.8*+	7.6 ± 0.9*	14.9 ± 2.7*

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 19. Cambios de la **TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR** (ml/min/g) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	AG 10	AG 25	AG 50	AG 100
CONTROL	1.20 ± 0.10	1.15 ± 0.07	1.00 ± 0.02	0.95 ± 0.06*	1.06 ± 0.08
Cl ₄ C	0.95 ± 0.10+	0.99 ± 0.18	0.92 ± 0.11	0.98 ± 0.05	0.85 ± 0.09*

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 20. Cambios de **HEMATOCRITO** (%) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	AG 10	AG 25	AG 50	AG 100
CONTROL	42.8 ± 0.7	42.9 ± 0.7	43.0 ± 0.8	43.6 ± 0.8	44.3 ± 0.8*
Cl ₄ C	34.3 ± 1.2+	33.5 ± 1.3+	33.5 ± 1.4+	34.3 ± 1.5+	37.4 ± 1.5+

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 21. Cambios de **NITRATOS+NITRITOS PLASMÁTICOS** (µM) tras la administración aguda de aminoguanidina (AG, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	AG 10	AG 25	AG 50	AG 100
CONTROL	9.9 ± 1.3	8.4 ± 1.5	9.9 ± 2.6	10.5 ± 2.1	5.6 ± 1.2*
Cl ₄ C	19.7 ± 3.6+	17.6 ± 3.0+	11.9 ± 1.3*	13.5 ± 2.0*	8.3 ± 1.2*

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL.

PROTOCOLO 4.C. Efectos del L-NNA en la cirrosis inducida por Cl₄C.

En este caso, los animales cirróticos y controles pesaron de forma similar, si bien el peso renal fue mayor en los primeros que en los segundos, al igual que el del bazo (tabla 22).

En las ratas cirróticas, la PAM (figura 14 y tabla 23) basal fue significativamente menor que en las controles, y la administración de L-NNA elevó sus valores desde la primera dosis. Por el contrario, en las controles sólo se observó un aumento con la dosis más alta de L-NNA, de forma que al final del experimento la PAM fue similar en ambos grupos.

La diuresis y natriuresis (figura 14 y tablas 24 y 25), también disminuidas en las cirróticas, sufrieron elevaciones significativas y dependientes de la dosis. En los animales controles hubo una respuesta bifásica de estos parámetros al L-NNA, con disminución en las dosis más bajas y aumento en las más altas. De cualquier forma la respuesta fue significativamente mayor en los animales con cirrosis, superando la diuresis y natriuresis de los controles.

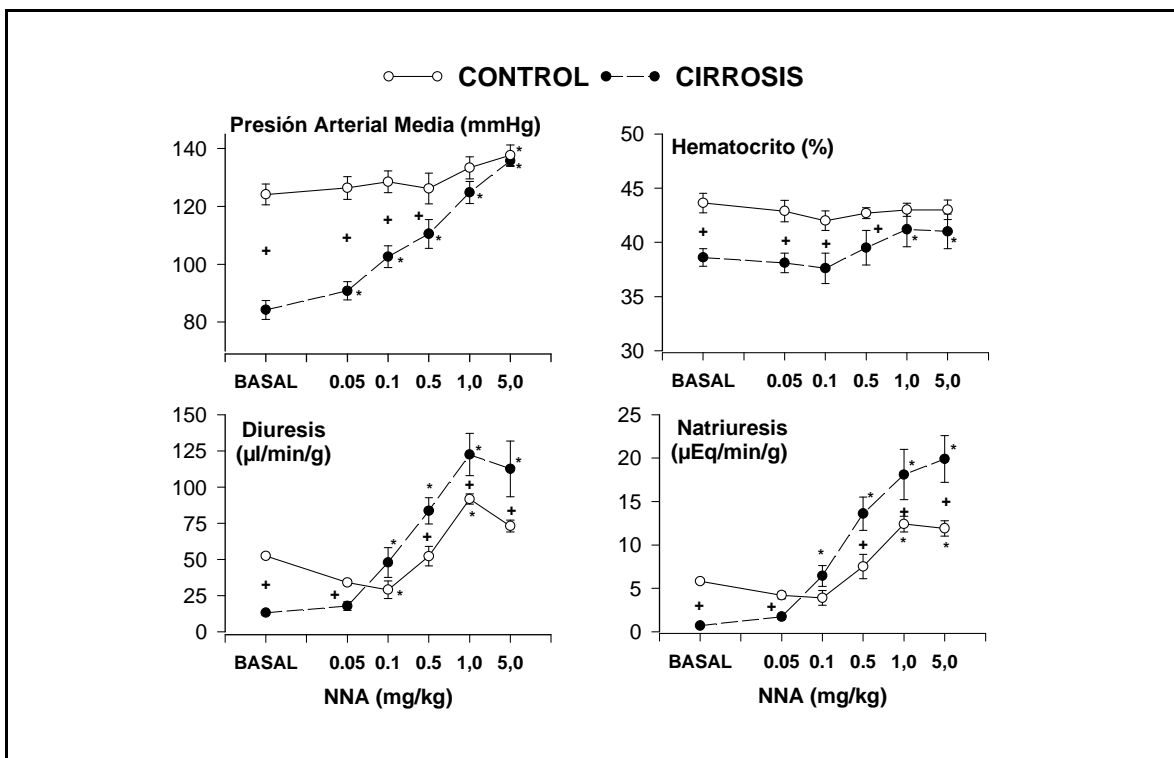


Figura 14. Efectos del NNA en ratas controles y cirróticas. *, p<0.05 vs basal; +, p<0.05 vs control.

La TFG (figura 14 y tabla 26) basal también fue más baja en las ratas con cirrosis respecto a las controles manteniéndose así todo el experimento, aunque disminuyó en el último periodo en los animales controles.

El hematocrito (tabla 27) fue menor en el grupo cirrótico y aumentó con las dos últimas dosis, mientras que en el control no se apreció ningún cambio a lo largo del experimento.

PROTOCOLO 4.D. Efectos del vehículo en la cirrosis inducida por Cl_4C .

El peso de los animales controles y cirróticos que recibieron solamente bolos de solución salina, así como del bazo y riñón (3.02 ± 0.04 ; 4.29 ± 0.55), fueron similares a los utilizados en los dos protocolos anteriores. En los animales controles, la PAM (121.8 ± 8.5 mmHg), diuresis (50.6 ± 3.2 μ l/min/g), natriuresis (5.6 ± 0.8 μ Eq/min/g), TFG (1.6 ± 0.1 ml/min/g) y hematocrito (42.0 ± 0.9 %) permanecieron estables a lo largo del experimento al igual que en los animales con cirrosis y ascitis (PAM: 88.2 ± 4.0 ; diuresis: 17.9 ± 5.4 ; natriuresis: 1.9 ± 0.8 , TFG: 1.2 ± 0.3 ; hematocrito: 39.0 ± 0.4).

Tabla 22. Variables generales de los animales controles y cirróticos (Cl₄C) usados para la administración aguda de N^w-nitro-L-arginina (NNA).

	PESO (g)	PESO RENAL (g)	PESO BAZO (g)
CONTROL	459.8 ± 11.1	3.14 ± 0.09	0.85 ± 0.02
Cl ₄ C	476.2 ± 22.2	4.79 ± 0.28+	2.26 ± 0.22

+, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 23. Cambios de **PRESIÓN ARTERIAL MEDIA** (mmHg) tras la administración aguda de N^w-nitro-L-arginina (NNA, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	NNA 0.05	NNA 0.1	NNA 0.5	NNA 1	NNA 5
CTRL	119.3±3.0	120.8±3.7	122.3±3.5	123.0±5.1	127.5±5.4	130.3±3.8
Cl ₄ C	79.4 ± 3.4+	85.6±3.0*+	97.0±3.4*+	106.5±4.9*+	119.8±2.9*	130.5±1.1*

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL (CTRL).

Tabla 24. Cambios de **DIURESIS** (μl/min/g) tras la administración aguda de N^w-nitro-L-arginina (NNA, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	NNA 0.05	NNA 0.1	NNA 0.5	NNA 1	NNA 5
CTRL	52.2 ± 1.8	33.9 ± 1.7	28.9 ± 6.1*	52.2 ± 16.8	91.7 ± 3.5*	73.0 ± 4.1
Cl ₄ C	13.1 ± 1.5+	17.7 ± 2.9+	47.9±10.3*	83.6±9.1*+	122.4±14.6*	112.5±19.3*+

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL (CTRL).

Tabla 25. Cambios de **NATRIURESIS** (μEq/min/g) tras la administración aguda de N^w-nitro-L-arginina (NNA, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	NNA 0.05	NNA 0.1	NNA 0.5	NNA 1	NNA 5
CTRL	5.8 ± 0.3	4.2 ± 0.4	3.9 ± 0.9	7.5 ± 3.4	12.4 ± 0.9*	11.9 ± 0.9
Cl ₄ C	0.7 ± 0.2+	1.7 ± 0.3+	6.4 ± 1.2*	13.6 ± 1.9*+	18.1 ± 2.9*+	19.9 ± 2.7*+

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL (CTRL).

Tabla 26. Cambios de la **TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR** (ml/min/g) tras la administración aguda de N^w-nitro-L-arginina (NNA, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	NNA 0.05	NNA 0.1	NNA 0.5	NNA 1	NNA 5
CTRL	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.1*
Cl ₄ C	0.8 ± 0.1+	0.8 ± 0.1+	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1

*, p < 0.05 vs BASAL; +, p < 0.05 vs CONTROL (CTRL).

Tabla 27. Cambios de **HEMATOCRITO** (%) tras la administración aguda de N^w-nitro-L-arginina (NNA, mg/kg) en ratas controles y cirróticas.

	BASAL	NNA 0.05	NNA 0.1	NNA 0.5	NNA 1	NNA 5
CTRL	43.6 ± 1.0	42.9 ± 1.1	42.0 ± 0.9	42.7 ± 0.5	43.0 ± 0.6	43.0 ± 1.3
Cl ₄ C	38.6 ± 0.8+	38.1 ± 0.9+	37.6 ± 1.4+	39.5 ± 1.6+	41.2 ± 2.2*	41.0 ± 2.8*

PROTOCOLO 5. EFECTOS PRESORES Y RENALES DE LA INHIBICIÓN CRÓNICA DE LA SÍNTESIS DE NO EN RATAS CIRRÓTICAS CON ASCITIS.

En este protocolo (tabla 28) los pesos de los animales fueron similares en todos los grupos, excepto en el tratado crónicamente con L-NAME en el agua de bebida, en el que el peso de las ratas con cirrosis fue menor. Tanto el peso renal como el esplénico fueron superiores en los animales cirróticos que en los controles. Tras el tratamiento, en todas las ratas cirróticas se detectó ascitis (10-30 ml) el día del experimento.

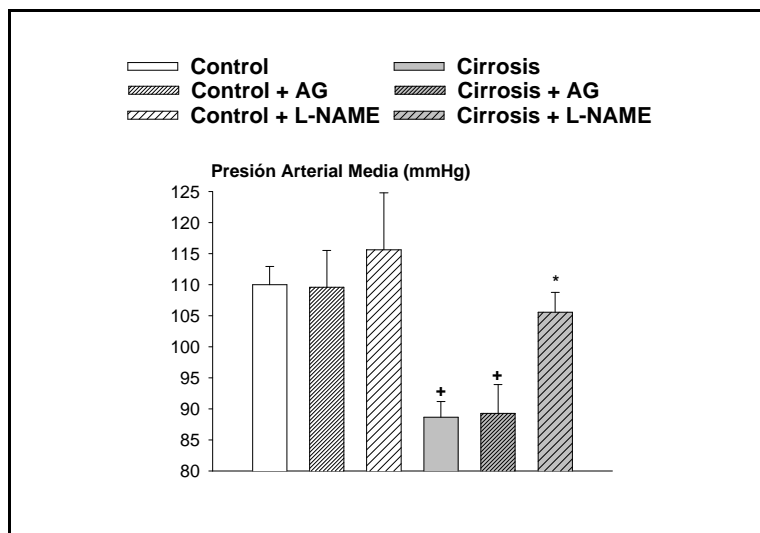


Figura 15. Presión arterial media de los animales tratados crónicamente con AG o L-NAME. +, $p < 0.05$ vs control; *, $p < 0.05$ vs cirrosis.

Por lo que hace a la PAM (figura 15 y tabla 29), los animales cirróticos sin tratar mostraron hipotensión, que no mejoró en el grupo tratado crónicamente con AG. Sin embargo, el tratamiento crónico con L-NAME sí produjo un aumento significativo de tal manera que la PAM fue similar a la del grupo control sin tratar. En los animales controles, ninguno de los dos tratamientos produjo efectos significativos aunque el tratamiento con L-NAME aumentó ligeramente la PAM.

La figura 16 y la tabla 30 muestran la diuresis y natriuresis de estos grupos experimentales. Los animales cirróticos sin tratar tienen menor excreción basal de sodio y agua y el tratamiento crónico con AG no la aumentó, cosa que sí ocurrió en el grupo que recibió L-NAME aunque sin alcanzar los valores del grupo control sin tratar. En los animales controles, no hubo cambios significativos.

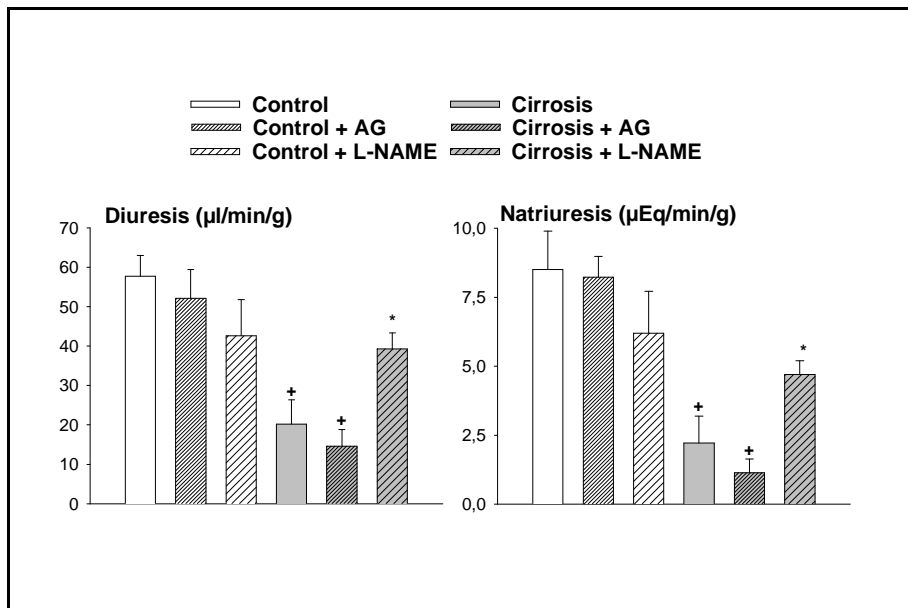


Figura 16. Diuresis y natriuresis de los animales tratados crónicamente con AG o L-NAME. +, $p < 0.05$ vs control; *, $p < 0.05$ vs cirrosis.

La hemodinámica renal se puede observar en la figura 17 y en la tabla 31. La tasa de filtración glomerular es menor en los cirróticos y ninguno de los tratamientos consigue aumentarla. En los controles, el tratamiento crónico produce un descenso del filtrado glomerular. Por lo que hace al flujo sanguíneo renal, no hay diferencias entre los grupos y reseñar que sólo el tratamiento con L-NAME produjo un descenso en ambos grupos control y cirrótico.

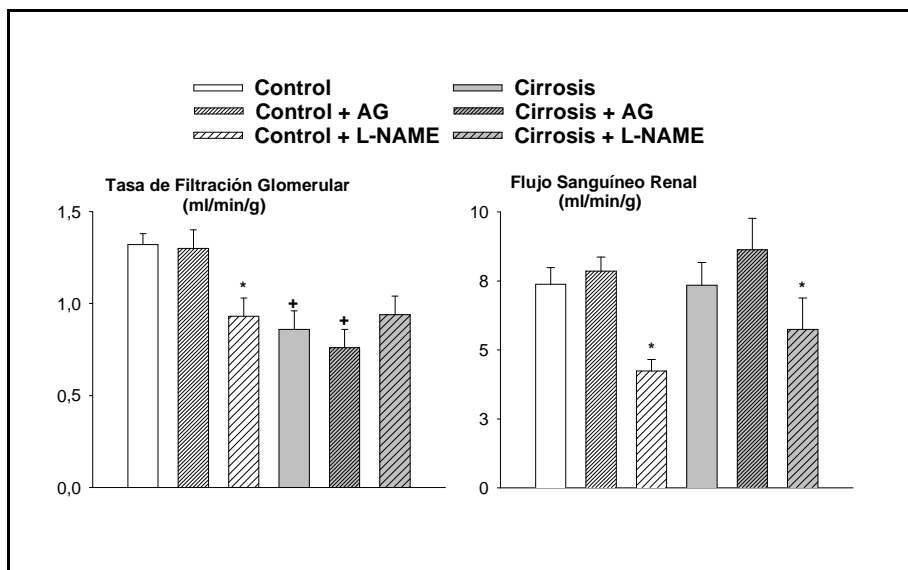


Figura 17. Hemodinámica renal de los animales tratados crónicamente con AG o L-NAME. +, $p < 0.05$ vs control; *, $p < 0.05$ vs cirrosis.

Respecto a los niveles de nitratos+nitritos plasmáticos (tabla 32), estuvieron significativamente elevados en los animales con cirrosis comparados con los controles (7.4 ± 1.2 vs 1.6 ± 0.7 $\mu\text{g/ml}$) y el tratamiento con AG los disminuyó sin llegar a igualar los valores mostrados por los animales controles (4.3 ± 0.4 vs 2.8 ± 0.4 $\mu\text{g/ml}$). Sin embargo, los animales cirróticos a los que se les administró L-NAME mostraron una tendencia a la disminución que no fue significativa respecto al grupo cirrótico que no recibió ningún tratamiento, aunque sí suficiente para igualar los valores a los de los controles tratados (5.0 ± 0.7 ; 3.1 ± 0.7 $\mu\text{g/ml}$). Todos los grupos controles tratados o no, con AG o L-NAME, presentaron valores similares de nitratos y nitritos plasmáticos.

Tabla 28. Variables generales de los animales controles y cirróticos (Cl₄C) usados para la administración crónica de aminoguanidina y L-NAME.

	PESO (g)	PESO RENAL (g)	PESO BAZO (g)	HEMATOCRITO (%)
CONTROL	450.0 ± 9.4	2.79 ± 0.06	0.75 ± 0.06	44.2 ± 0.8
CONTROL + AG	453.6 ± 18.5	2.87 ± 0.11	0.70 ± 0.04	43.7 ± 0.8
CONTROL + L-NAME	489.6 ± 11.1	2.94 ± 0.15	0.86 ± 0.07	43.2 ± 0.8
Cl ₄ C	435.0 ± 16.5	3.42 ± 0.35+	1.70 ± 0.18+	29.5 ± 1.9+
Cl ₄ C + AG	453.0 ± 22.2	3.58 ± 0.21+	1.92 ± 0.22+	33.9 ± 2.1+
Cl ₄ C + L-NAME	427.1 ± 16.4+	3.39 ± 0.16+	1.70 ± 0.09+	36.9 ± 0.96+

+, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 29. PRESIÓN ARTERIAL MEDIA (mmHg) en los animales que recibieron de forma crónica aminoguanidina y L-NAME.

	PAM
CONTROL	110.0 ± 2.9
CONTROL + AG	109.6 ± 5.9
CONTROL + L-NAME	115.6 ± 9.2
Cl ₄ C	88.7 ± 2.5+
Cl ₄ C + AG	89.3 ± 4.6+
Cl ₄ C + L-NAME	105.6 ± 3.2*

*, p < 0.05 vs Cl₄C; +, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 30. DIURESIS ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$) y NATRIURESIS ($\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{g}$) en los animales que recibieron de forma crónica aminoguanidina y L-NAME.

	DIURESIS	NATRIURESIS
CONTROL	57.7 ± 5.3	8.5 ± 1.4
CONTROL + AG	52.1 ± 7.3	8.2 ± 0.8
CONTROL + L-NAME	42.6 ± 9.2	$6.2 \pm 1.5^*$
Cl ₄ C	$20.2 \pm 6.1^+$	$2.2 \pm 0.9^+$
Cl ₄ C + AG	$14.6 \pm 4.2^+$	$1.1 \pm 0.5^{*+}$
Cl ₄ C + L-NAME	$39.3 \pm 4.1^*$	$4.7 \pm 0.5^*$

*, $p < 0.05$ vs Cl₄C; +, $p < 0.05$ vs CONTROL.

Tabla 31. TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR ($\text{ml}/\text{min}/\text{g}$) y FLUJO SANGUÍNEO RENAL ($\text{ml}/\text{min}/\text{g}$) en los animales que recibieron de forma crónica aminoguanidina y L-NAME.

	TFG	FSR
CONTROL	1.32 ± 0.06	7.38 ± 0.60
CONTROL + AG	1.30 ± 0.10	7.86 ± 0.56
CONTROL + L-NAME	$0.93 \pm 0.10^*$	$4.23 \pm 0.42^*$
Cl ₄ C	$0.86 \pm 0.10^+$	7.34 ± 0.83
Cl ₄ C + AG	$0.76 \pm 0.10^+$	8.63 ± 1.14
Cl ₄ C + L-NAME	$0.94 \pm 0.10^+$	$5.74 \pm 1.14^*$

*, $p < 0.05$ vs Cl₄C; +, $p < 0.05$ vs CONTROL.

Tabla 32. Niveles plasmáticos de NITRATOS+NITRITOS ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en los animales que recibieron de forma crónica aminoguanidina (AG) y L-NAME.

	CONTROL	Cl ₄ C
Sin tratamiento	1.6 ± 0.7	$7.4 \pm 1.2^*$
AG	2.8 ± 0.4	$4.3 \pm 0.4^{*+}$
L-NAME	3.1 ± 0.7	5.0 ± 0.7

*, $p < 0.05$ vs CONTROL; +, $p < 0.05$ vs sin tratamiento.

PROTOCOLO 6. ESTUDIO MICROCOMPUTERIZADO DE LA MORFOLOGÍA RENAL EN RATAS CON LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR.

La imagen tridimensional se obtiene mediante cubos (*voxels*) con una opacidad que representa la cantidad de microfilm en el interior de los vasos sanguíneos. En las secciones escogidas para las medidas, se identificaron fácilmente las distintas regiones del riñón, por sus peculiares características vasculares. En la corteza, se visualizaron glomérulos y en médula externa e interna, haces de vasos rectos con diferentes intensidades (figura 18).

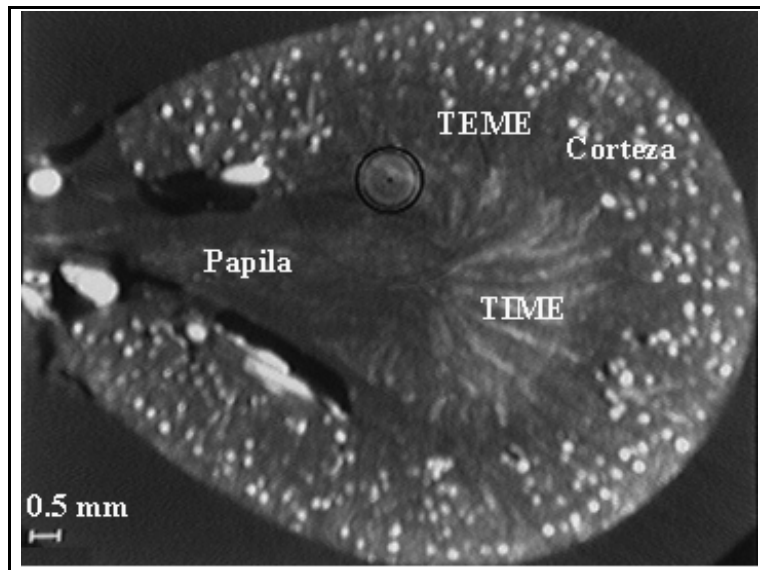
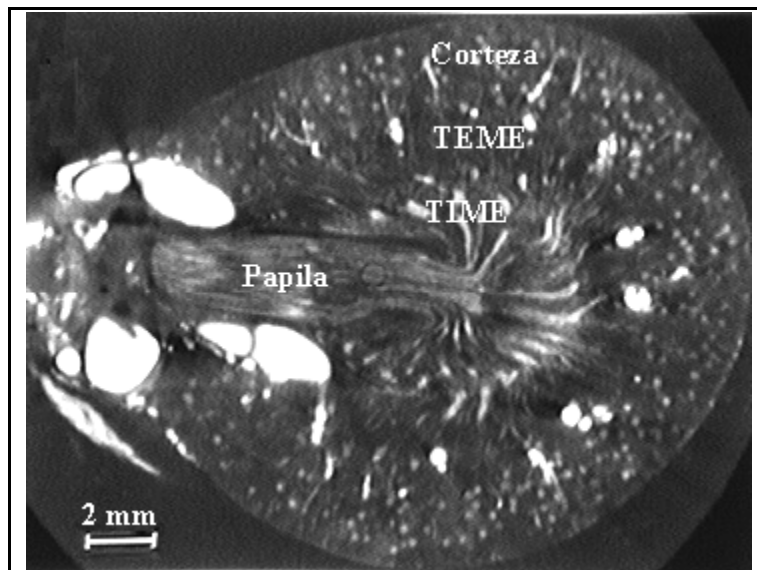


Figura 18. Corte transversal medio de un riñón control (arriba) y un cirrótico (abajo). TEME, tira externa de la médula externa; TIME, tira interna de la médula externa.



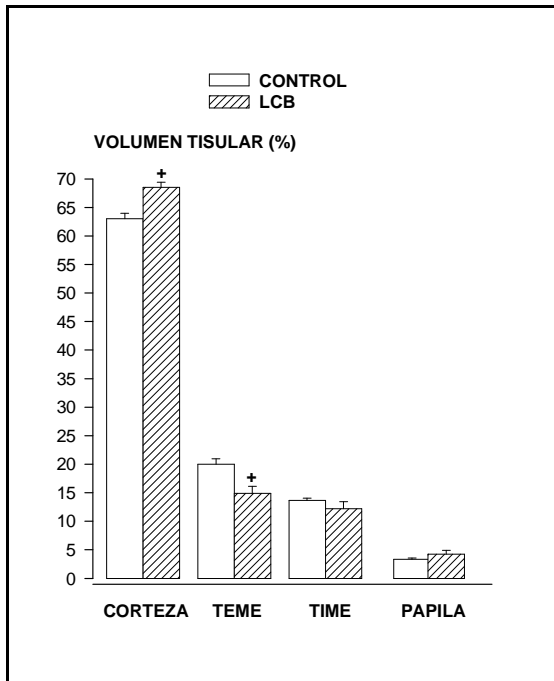


Figura 19. Porcentajes de volumen tisular en riñones de ratas controles y con LCB. +, $p < 0.05$ vs control.

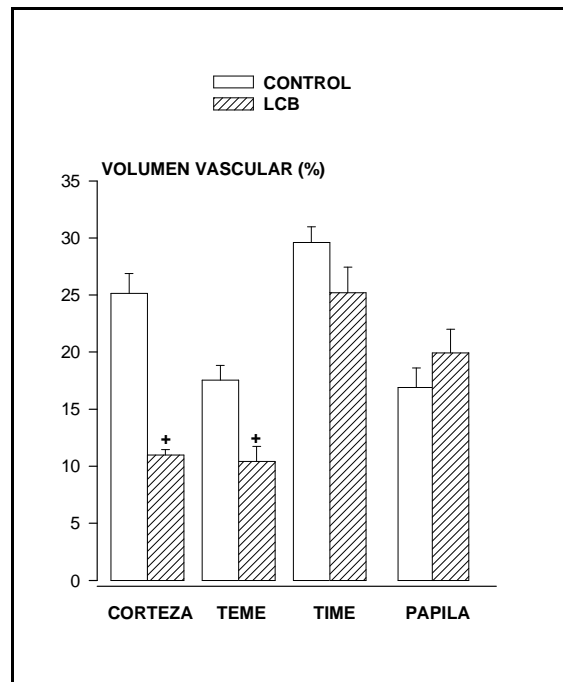


Figura 20. Volumen vascular en riñones de ratas controles y con LCB. +, $p < 0.05$ vs control.

La fracción de volumen cortical renal está aumentada significativamente en los cirróticos respecto a los controles, aparentemente a expensas de una disminución de la TEME. En la TIME y papila, estas proporciones son similares en ambos grupos (figura 19 y tabla 33).

Respecto a la fracción de volumen vascular (figura 20 y tabla 34), se aprecia una disminución significativa en corteza y TEME en los riñones cirróticos respecto a los controles. En la TIME y papila, este valor es similar en ambos grupos.

El diámetro de las arterias (A) interlobares y arqueadas y el de las venas arqueadas fue significativamente menor en los riñones LCB que en los controles. De este modo, la relación A/V en los vasos interlobares está alterada en los animales cirróticos (1/2) respecto a los controles (2/3) (figura 21 y tabla 35).

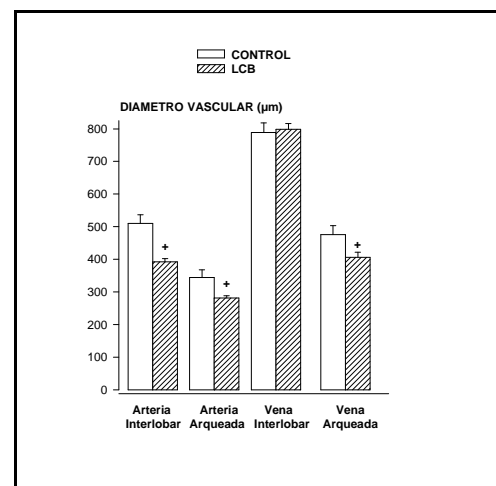


Figura 21. Diámetros vasculares en riñones de ratas controles y con LCB. +, $p < 0.05$ vs control.

Tabla 33. VOLUMEN TISULAR (%) de los riñones de ratas controles y con ligadura del conducto biliar.

	CONTROL	LCB
CORTEZA	63.01 ± 0.98	68.51 ± 0.89+
TEME	20.01 ± 0.94	14.88 ± 1.26+
TIME	13.66 ± 0.39	12.20 ± 1.20
PAPILA	3.31 ± 0.24	4.21 ± 0.67

+, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 34. VOLUMEN VASCULAR (%) de los riñones de ratas controles y con ligadura del conducto biliar.

	CONTROL	LCB
CORTEZA	25.15 ± 1.74	10.97 ± 0.48+
TEME	17.55 ± 1.30	10.41 ± 1.32+
TIME	29.62 ± 1.36	25.20 ± 2.26
PAPILA	16.90 ± 1.71	19.94 ± 2.06

+, p < 0.05 vs CONTROL.

Tabla 35. DIÁMETROS VASCULARES (µm) de los riñones de ratas controles y con ligadura del conducto biliar.

	CONTROL	LCB
Arteria Interlobar	510 ± 26	392 ± 10+
Arteria Arqueada	344 ± 24	281 ± 7+
Vena Interlobar	789 ± 29	799 ± 17
Vena Arqueada	476 ± 27	406 ± 16

+, p < 0.05 vs CONTROL.

DISCUSIÓN

Podemos considerar a la cirrosis como la alteración final y común producida por diferentes etiologías. Las consecuencias fisiopatológicas como el desarrollo de hipertensión portal y sus manifestaciones, hemodinámicas y renales, una vez desarrollada la cirrosis serían similares independientemente de la causa que la originó. En experimentación animal, también existen diversas formas de inducir una cirrosis hepática y que tendrían su equivalencia con algunas de las etiologías que producen cirrosis en humanos.

Los modelos experimentales de cirrosis utilizados en este estudio, por ligadura crónica del conducto biliar (LCB) y por inhalación crónica de Cl_4C han sido caracterizados por diversos autores (Sikuler y cols, 1991; López-Novoa, 1988) y ambos se aplican de forma habitual, desde hace algunos años, en nuestro laboratorio (Úbeda y cols, 1994; Atucha y cols, 1993a y b; García-Estañ y cols, 1994; Ramírez, 1995). Estos modelos han sido y son ampliamente utilizados por su fácil disponibilidad y fiel reproducibilidad de las alteraciones que presenta la cirrosis hepática humana. La obstrucción crónica de la vía biliar provoca una cirrosis biliar secundaria y la inhalación crónica de Cl_4C induce una cirrosis de características similares a la cirrosis alcohólica en humanos.

Aunque en este trabajo no se han realizado estudios hemodinámicos, existen datos previos de nuestro laboratorio que han demostrado, en ambos modelos y estadios de cirrosis, la existencia de hipertensión portal y de las alteraciones hemodinámicas típicas de la circulación hiperdinámica, como son resistencias vasculares disminuidas, gasto cardíaco elevado e hipervolemia (Ramírez, 1995; Inglés y cols, 1991a y b). Además, tanto el examen macroscópico como el microscópico que hemos descrito en los resultados, revelan un cuadro típico de cirrosis en las ratas que siguieron el protocolo de inhalación del Cl_4C . A pesar de esto, existen estudios contradictorios en la bibliografía en cuanto a la caracterización del modelo de LCB, como el de Keeler en 1981 que describe un bajo gasto cardíaco en ratas con este modelo de cirrosis, con una presión arterial media y resistencias periféricas iguales a las de animales controles. Estas contradicciones han sido atribuidas por diversos autores a la diferente metodología utilizada. Así, las ratas cirróticas pueden responder de forma diferente a las controles con determinados anestésicos y esto alteraría las características hemodinámicas en estudio (Lee y cols, 1986). Ésto, unido a la sensibilidad individual ante la enfermedad y a la posibilidad de recuperación por recanalización del conducto biliar (Kountouras y cols, 1984),

podría explicar la variabilidad entre los resultados de los estudios realizados en este modelo de cirrosis.

Respecto a la cirrosis por Cl_4C podría existir alguna objeción metodológica respecto al daño que el tóxico podría producir en órganos como el riñón y supondría un factor de confusión a la hora de evaluar las alteraciones renales producidas por la enfermedad. Sin embargo, el examen microscópico de los riñones expuestos al Cl_4C es normal (López-Novoa y cols, 1976) y la excreción urinaria de N-acetil- β -glucosaminidasa, un marcador específico de necrosis tubular, no aumenta durante la inducción de la cirrosis (Camps y cols, 1988).

En nuestro primer objetivo nos planteamos demostrar la existencia de un aumento en la producción vascular de óxido nítrico (NO) a nivel sistémico. Para este estudio elegimos una preparación *in vitro* de anillos de aorta torácica, en los que se evaluó la reactividad vascular. La ventaja del sistema *in vitro* es la ausencia de factores circulantes, que además permite estudiar separadamente preparaciones con endotelio intacto o sin endotelio. Por otra parte, hemos utilizado un gran vaso de conducción como es la aorta, para evaluar el alcance sistémico de las alteraciones vasculares y si en ellas participa un aumento de la síntesis de NO.

Una vasodilatación activa, debida a un exceso de vasodilatadores locales o sistémicos, es uno de los mecanismos que han sido implicados en la menor respuesta vascular a vasoconstrictores endógenos o exógenos que caracteriza a la cirrosis hepática. Estudios *in vivo* han encontrado una disminución de las resistencias vasculares periféricas en presencia de concentraciones elevadas de NA, ADH y AII (Niederberger y cols, 1995a) y una menor respuesta a la administración exógena de diferentes sustancias vasopresoras en ratas con hipertensión portal crónica (Pizcueta y cols, 1990; Sieber y Grozmann, 1992) y en distintos modelos de cirrosis animal experimental (Castro y cols, 1993). De cualquier manera, hay resultados contradictorios en cuanto a la respuesta vascular *in vitro* dependiendo de los lechos vasculares utilizados y, especialmente, en el modelo de cirrosis que hemos empleado en este estudio (Bomzon y cols, 1991; Lee y cols, 1995a). En este trabajo demostramos la existencia de hiporrespuesta vascular a fenilefrina (FE), un vasoconstrictor que actúa a nivel de receptor, en anillos aórticos de ratas cirróticas por LCB. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios realizados por otros autores en el mismo tipo de vaso y en el mismo (Obbergh y cols, 1995; Lee y cols, 1995a; Sogni y cols, 1997) o en diferente modelo de cirrosis experimental (Clària y cols, 1994; Weigert y cols, 1997).

Esta alteración no parece ser debida a un problema de afinidad ni de número de adrenorreceptores (Liao y cols, 1994; Karatapanis y cols, 1994), ni tampoco a una sensibilidad diferente del músculo liso de los animales cirróticos a la FE, ya que ambos grupos de anillos, cirróticos y controles, presentaron un valor similar de la DE₅₀ (tabla 10).

Entre todas las sustancias vasodilatadoras endógenas, se ha sugerido que un aumento de la producción de NO podría ser el principal responsable de la hiporrespuesta vascular a vasoconstrictores que tiene lugar en los animales con cirrosis. Este factor es un potente vasodilatador local sintetizado por la sintasa de NO (NOS) de la que existen al menos dos formas distintas a nivel vascular: la constitutiva, localizada en el endotelio, y la inducible, principalmente en el músculo liso vascular. Como propusieron Vallance y Moncada en 1991, si es cierto que el NO está implicado y su síntesis y liberación aumentadas, la inhibición de la NOS restauraría la respuesta a vasoconstrictores y revertiría las anomalías hemodinámicas de la cirrosis. Así, Sieber y Groszmann (1992) revierten la hiporrespuesta a NA, ADH y KCl, con el análogo de la arginina NNA, en vasos mesentéricos de ratas con hipertensión portal por ligadura parcial de la vena porta (LVP). Karatapanis y cols (1994), utilizando L-NAME como inhibidor, obtienen un aumento significativo en la contracción con FE que fue mayor en anillos aórticos de ratas con LVP que en controles. En esta misma línea, nuestro trabajo demuestra que los niveles de NO se hallan aumentados en anillos de ratas cirróticas por LCB, ya que la inhibición de su síntesis con L-NAME corrigió su hiporrespuesta a FE. Aunque los anillos controles preincubados con L-NAME también mostraron un aumento significativo en la contracción, el incremento sufrido por los anillos de ratas cirróticas fue muy superior al de aquéllos.

Si esta alteración en la vasoconstricción representa la confirmación de la influencia vasodilatadora activa del exceso de NO en las ratas cirróticas, no está del todo aclarado. En este sentido, algunos autores (Clària y cols, 1994; Ros y cols, 1995a) apoyan la existencia de una contribución del NO a esta alteración vascular, al demostrar un aumento de la respuesta vascular y de los niveles de GMPc intracelular a vasodilatadores que actúan a través del NO (ACH, ADP y bradiquinina) en anillos aórticos de animales cirróticos por Cl₄C respecto a sus controles. Nuestros resultados difieren de los anteriores, ya que los anillos cirróticos respondieron de modo similar a la ACH que los controles y están de acuerdo con estudios recientes en el mismo modelo de cirrosis que el empleado por nosotros (Lee y cols, 1995a), si

bien su interpretación no coincide con la nuestra. Completando el abanico de resultados en cuanto a la respuesta vasodilatadora a ACH, Karatapanis y cols (1994), encontraron una relajación significativamente menor en anillos aórticos de ratas sometidas a LVP. Apreciamos cómo la hiporrespuesta a vasoconstrictores parece ser unánime en los distintos modelos de cirrosis y, por el contrario, la respuesta vasodilatadora presenta una mayor variabilidad dependiendo del modelo utilizado en el estudio. Estas diferencias no pueden ser atribuidas a una sensibilidad distinta del músculo liso al NO, ya que en todos los casos citados la respuesta a la relajación con donantes de NO (nitroprusiato sódico o gliceril-trinitrato) fue similar entre los animales cirróticos o con hipertensión portal y sus respectivos controles.

Nuestros datos indican que la respuesta vascular reducida a FE exhibida por los anillos aórticos de ratas sometidas a LCB es debida a un aumento de la influencia vasodilatadora del NO. Aunque, como hemos visto, son numerosos los estudios que demuestran este hecho, existen otros cuyos resultados no sostienen esta hipótesis (Sogni y cols, 1992; Cawley y cols, 1995; Heinemann y Stauber, 1996a), argumentando en contra de un papel principal del NO en estas alteraciones de la cirrosis.

Dado que, en condiciones normales, el NO es un modulador importante en el mantenimiento del tono vascular y que endotelio es la fuente principal de NO al que sintetiza junto a otros agentes vasoactivos, se ha sugerido la participación del endotelio en esta patología. De hecho, la inhibición de la síntesis de uno de éstos factores endoteliales, el NO, corrige la hiporrespuesta vasoconstrictora de las ratas cirróticas. Algunos estudios, en diferentes lechos vasculares, han propuesto la existencia de una activación sistémica de la sintasa constitutiva (NOS_c) endotelial como la principal responsable de la actividad aumentada del NO en la cirrosis (Lee y cols, 1992; Castro y cols, 1993; Atucha y cols, 1996b). Aunque nuestros resultados apoyan la participación de esta isoforma, la eliminación del endotelio no rectificó completamente la hiporrespuesta a FE de los animales con LCB. Este hallazgo podría ser indicativo de la existencia de algún mecanismo muscular vasodilatador que contribuya a esta alteración. Como la presencia de L-NAME corrigió la hiporrespuesta de los anillos con endotelio intacto en los animales sometidos a LCB, hipotetizamos una colaboración de la NOS muscular en el aumento de NO causante de la hiporrespuesta.

La isoenzima inducible ha sido hallada tanto en las células musculares lisas como en las endoteliales (Morris y Billiar, 1994; Forstemann y cols, 1994), y además en la cirrosis se

han descrito niveles elevados de endotoxinas y citoquinas, ambos estímulos conocidos para la NOS inducible, NOSi (Green y Better, 1995; Laffi y cols, 1995). Para valorar su participación hemos utilizado la aminoguanidina (AG) que ha sido identificada como un inhibidor preferencial de esta isoenzima a la dosis utilizada en este protocolo (Griffiths y cols, 1993; Hasan y cols, 1993; Misko y cols, 1993; Joly y cols, 1994; Wolff y Lubeskie, 1995). Así, su administración no afectó a la respuesta a ACH, indicando que a esta dosis no se altera la NOS_e endotelial y, aunque aumentó la respuesta de contracción a FE en ambos grupos de anillos, los animales cirróticos todavía mostraron una hiporrespuesta vascular significativa frente a los controles. Estos datos, a diferencia de otros (Smith y cols, 1993; Obbergh y cols, 1995), no apoyan una contribución de la NOSi en la menor respuesta vasoconstrictora de los anillos LCB.

Como hemos comentado previamente, la respuesta a ACH en condiciones basales de los anillos de las ratas sometidas a LCB no está alterada, aunque en este caso la DE₅₀ fue más baja que en sus controles, indicando una mayor sensibilidad en las primeras. Además, la preincubación con L-NAME o la eliminación del endotelio disminuyó los valores de la DE₅₀ a FE en ambos grupos de anillos, lo que señala el importante papel del NO y en particular el de origen endotelial, como mecanismo que contrarresta la acción de los vasoconstrictores en distintos tipos de vaso (Carrier y cols, 1985; Demirel y cols, 1989).

Otros factores que podrían contribuir a la hiporrespuesta residual mostrada por los anillos desendotelizados, son los productos derivados de la cicloxigenasa o alteraciones del músculo liso vascular. Aunque las prostaglandinas (PGs) pueden jugar un papel en las anomalías vasculares de la cirrosis (Bruix y cols, 1985; Guarner y cols, 1986), la fuente principal de su producción no parece ser la aorta (ni probablemente ninguno de los otros grandes vasos), ya que la inhibición de la cicloxigenasa no mejoró la contracción de los anillos cirróticos (Obbergh y cols, 1995). Nosotros no podemos excluir su participación ya que los experimentos se realizaron en ausencia de inhibidores de la cicloxigenasa.

En cuanto a la participación del EDHF en la relajación dependiente de endotelio en grandes arterias de conducción como son la aorta, pulmonar e ilíaca, los resultados disponibles indican que es casi insignificante comparada con la observada en arterias periféricas de menor calibre, como la mesentérica y la renal. Esta distribución heterogénea del EDHF ha sido demostrada por Nagao y cols (1992) y también por Wu y cols (1993), aunque estos últimos

sugieren la existencia de otro factor relajante endotelial diferente del NO, PGI₂ o EDHF en arterias mesentéricas. Nuestros resultados apoyan que en anillos de aorta la relajación dependiente de endotelio es en definitiva dependiente de NO, tanto en controles como en cirróticos y son contrarios a los expuestos por Clària y cols (1994) en los que la relajación de los anillos aórticos persiste a dosis altas de ACH a pesar de la preincubación con L-NNA, argumentando la posibilidad de que la ACH siguiera un camino independiente de NO, como es el de la hiperpolarización de las células del músculo liso vascular, pero que requiere la presencia del endotelio intacto para su actuación.

Actualmente se conocen varios mecanismos de liberación de NO (Busse y cols, 1993b). Uno de ellos es el seguido por la ACH que aumenta la producción de NO como resultado de la elevación intracelular de calcio mediada por una activación de una proteína G acoplada al receptor. Esta vía, como ya hemos mencionado antes no está alterada en este modelo de cirrosis. Otro de los mecanismos es secundario a la unión del vasoconstrictor, como la FE, a su receptor específico (alfa-adrenérgico) en el músculo liso. En este caso hay, al menos, dos mecanismos, el estrechamiento de la pared del vaso inducido por la contracción o un mecanismo relacionado con el estrés de rozamiento, que podrían activar la liberación de NO endotelial. Éste último es el que nuestros datos identifican como defectuoso en la cirrosis.

En conjunto, los anillos aórticos de ratas cirróticas por LCB presentan una reducida respuesta presora a FE que se corrige tras la inhibición de la síntesis de NO. Además, apuntan que la isoforma de la NOS implicada en esta alteración es de origen endotelial y está expresada de forma constitutiva. Finalmente, no todos los mecanismos de liberación del NO están alterados en este modelo de cirrosis y otros factores, además del NO, también podrían colaborar en la hiporrespuesta vascular que aparece en esta enfermedad

Dado que los resultados del estudio de la reactividad vascular no demostraron una participación del enzima inducible en el aumento de NO de las ratas cirróticas, decidimos en el siguiente protocolo determinar la actividad de las sintasas de NO en aorta y riñón en dos modelos de cirrosis experimental. Por un lado, es posible que en la preparación *in vitro* se elimine o atenúe la influencia que el ambiente endotoxémico ejerce sobre la muestra vascular una vez ha sido aislada. También sería posible que dependiendo de la intensidad del estímulo, mayor en algunos territorios, por ejemplo en el esplácnico y menor en aorta, la expresión de la NOSi fuera diferente. Además, según Wolff y Lubeskie (1995) el mecanismo de inhibición de

la NOSi es selectivo para la inducción por citoquinas y no para el lipopolisacárido. Por otra parte, la expresión de la NOSi puede variar temporal y espacialmente en el hígado dependiendo de la causa que originó el daño hepático, Cl₄C o LCB (Rockey y Chung, 1997), lo que también podría ocurrir en otros órganos y tejidos afectados durante la enfermedad hepática y variar así el grado de participación de la NOSi en el aumento de NO característico de esta patología.

Nuestros datos indican que existe un aumento de la actividad de la NOS constitutiva en la aorta de los animales cirróticos por LCB y por inhalación de Cl₄C, lo que concuerda con la mejoría de la hiporrespuesta vascular tras la inhibición de la síntesis de NO en los primeros. Esta tendencia también existió para la NOSi sólo en animales cirróticos por LCB lo que indicaría que la contribución de ambas isoenzimas es diferente según el modelo de cirrosis experimental. Además, los animales sometidos a LCB presentan una hiperbilirrubinemia y unos niveles circulantes muy elevados de sales biliares que pueden desempeñar un papel importante en algunas alteraciones de esta enfermedad. En este sentido, algunos estudios han demostrado que la anastomosis bilioentérica revierte total o parcialmente las características hemodinámicas e histológicas de este modelo de cirrosis (Zimmermann y cols, 1992; Jalink y cols, 1996). La acción tóxica de los ácidos biliares podría ser realizada directa o indirectamente, favoreciendo la endotoxemia, a través del NO (Green y Better, 1995). Por tanto, la contribución del NO en las alteraciones vasculares de este modelo de cirrosis se asociaría a las acciones de otras sustancias.

De forma opuesta a lo que ocurre en la aorta, el aumento de la actividad de la NOS en el riñón es fundamentalmente a expensas de la isoforma inducible, sobre todo en la cirrosis por LCB. En los animales tratados con el Cl₄C sin embargo, el aumento no fue significativo. Curiosamente, en ninguno de los dos modelos de cirrosis se demuestran cambios en la actividad constitutiva de la NOS, lo que contrasta con resultados previos de nuestro grupo que demostraron una mayor respuesta vasodilatadora renal a la ACH, dependiente de NO, aunque también de PGs (García-Estañ y cols, 1994). Es posible que en este territorio, al igual que ocurre en el lecho mesentérico, la ACH actúe por otra vía endotelial independiente del NO como puede ser el EDHF.

Si tenemos en cuenta la amplia distribución de las tres isoenzimas de NO en el riñón, junto con los datos procedentes de otros estudios, estos resultados nos sugieren que el

aumento del NO renal procedería principalmente de la inducción de la NOS en glomérulos y células mesangiales (Criado y cols, 1997) y, adicionalmente, de células linfocíticas mononucleares y macrófagos que puedan infiltrar esas estructuras (Laffi y cols, 1995; Morales-Ruiz y cols, 1997).

Una vez comprobada la existencia de un aumento del NO renal, fundamentalmente inducible, y principalmente de origen endotelial a nivel sistémico, nos planteamos estudiar las repercusiones que ésto tendría sobre la hemodinámica renal de los animales con cirrosis. En este sentido, los estudios antes citados de nuestro laboratorio han demostrado una vasodilatación renal aumentada en ratas cirróticas (García-Estañ y cols, 1994), así como un aumento de la sensibilidad renal (Atucha y cols, 1994b) e intrarrenal a la inhibición de la síntesis de NO (Ramírez, 1995). Esto pone de manifiesto que un aumento de la actividad de NO podría contribuir a las alteraciones hemodinámicas renales de la cirrosis que a la vez repercutirían sobre su función excretora. De hecho, se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de NO tiene un efecto beneficioso sobre la función excretora renal, en ausencia de cambios de la presión arterial y de la hemodinámica renal (Atucha y cols, 1994b). En esta situación de inhibición de NO, además, otros autores han demostrado que las PGs están implicadas (Clària y cols, 1992b; Ros y cols, 1995b), posiblemente como mantenedoras de la hemodinámica renal en ausencia del NO.

En condiciones normales, el NO y las PGs son las sustancias vasodilatadoras más importantes en el control de la función renal, y sus efectos incluyen acciones hemodinámicas y tubulares renales (Romero y cols, 1996). Algunos estudios agudos han sugerido que bajo determinadas circunstancias, como la administración de ACH o bradiquinina, el NO y las PGs podrían compensarse mutuamente (Lahera y cols, 1991b; Salom y cols, 1991). Esto también parece ocurrir en la cirrosis, como ya hemos comentado arriba, en la que las PGs vasodilatadoras renales desempeñan un papel primordial en el mantenimiento de la perfusión renal (Ros y cols, 1995b; Saló y cols, 1996). Estas dos sustancias, NO y PGs, son producidas en grandes cantidades por la médula renal y es bien conocida la importancia de la circulación medular en el control de la excreción de sodio, el volumen sanguíneo y la presión arterial, todos alterados en la cirrosis hepática (Atucha y García-Estañ, 1996).

Así pues, con este procolo hemos evaluado el papel relativo del NO y de las PGs en el control agudo del flujo sanguíneo renal (FSR) y flujo sanguíneo papilar (FSP) en animales con

cirrosis y ascitis. Los datos indican que hay una menor capacidad vasodilatadora global en la papila de los animales cirróticos. Es decir, la suma de los efectos provocados por los inhibidores de las PGs y del NO es menor en los cirróticos que en los controles. Esto concuerda con resultados previos de nuestro laboratorio (Atucha y García-Estañ, 1996) que demostraron una deficiente respuesta del FSP al aumento de la presión arterial. Puesto que esta relación depende fundamentalmente de la acción del NO y de las PGs sobre la función medular, la menor capacidad vasodilatadora papilar de los cirróticos bien podría ser la causa de su menor FSP. Esta menor capacidad vasodilatadora global de la médula interna de los cirróticos no se debe al descenso de ambos componentes, NO y PGs, sino fundamentalmente a la disminución del efecto debido a PGs. En los animales controles, tanto el NO como las PGs contribuyen en igual proporción, aproximadamente de un 35 a un 40% cada uno. Sin embargo, en los animales cirróticos, el porcentaje debido a PGs es claramente menor, lo que sugiere una producción reducida de PGs vasodilatadoras en la médula interna de estos animales. Esto contrasta con los resultados obtenidos en los experimentos de balance, en los que encontramos un aumento de la excreción urinaria de PGI₂, fundamentalmente vasodilatadora, y de PGE₂, fundamentalmente de efectos tubulares. Es posible que estos niveles elevados de PGI₂ no estén disponibles para la vasodilatación de las estructuras vasculares de la médula interna, como indican los resultados obtenidos con la indometacina.

Por otro lado, es importante reseñar aquí que la cepa de ratas empleadas en este protocolo, Munich-Wistar, mostró una mayor sensibilidad al uso del Cl₄C que las Sprague-Dawley. En este sentido, no descartamos que algunos animales se encuentren en un estadio muy avanzado de la cirrosis, como lo sugiere el menor FSR de estos animales, y que pequeñas variaciones en el tiempo tras el cual fueron sometidas las ratas al estudio hayan sido suficientes para explicar el contraste entre el estudio hemodinámico agudo y el metabólico.

De cualquier forma, está claro que el componente vasodilatador papilar debido a NO es mayor en los cirróticos que en los controles, sin embargo insuficiente para compensar el gran descenso del porcentaje debido a PGs. Por lo tanto, la médula interna de los animales cirróticos es una de las zonas renales donde se demuestra la mayor producción de NO renal y estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en el modelo de cirrosis por LCB (Ramírez, 1995).

Una vez comprobada la existencia de una mayor producción de NO en las ratas cirróticas, tanto sistémico como renal, nos propusimos estudiar los efectos presores y renales que se producen tras la inhibición de su producción. Durante estos últimos años, muchos estudios han demostrado que la inhibición de la síntesis de NO en animales con hipertensión portal crónica o con cirrosis experimental, reduce la circulación hiperdinámica (Pizcueta y cols, 1992a; Lee y cols, 1993; Niederberger y cols, 1995a) y mejora la función excretora renal (Atucha y cols, 1994b). De cualquier manera, todos ellos se han llevado a cabo con inhibidores no selectivos de la NOS, que afectan a ambas isoformas, constitutiva e inducible. Una inhibición de este tipo, mediante estas sustancias, podría ser perjudicial por las numerosas y relevantes funciones que ejerce el NO (Romero y cols, 1992), por lo que el estudio de nuevos agentes farmacológicos que inhiben selectivamente a cada enzima por separado sería muy interesante con vistas a su utilidad terapéutica. En este sentido, la AG se está usando, como veíamos anteriormente, como un inhibidor preferencial del enzima inducible.

Hasta la fecha, los mecanismos responsables del aumento de NO en la cirrosis hepática no han sido completamente establecidos (Vallance y Moncada, 1991; Romero y cols, 1996), y aunque parece clara la implicación del endotelio en esta elevación, la participación de la isoenzima inducible es todavía muy debatida. Por una parte, la presencia de flujos sanguíneos elevados en las circulaciones esplácnica y renal, activarían a la NOS constitutiva; y por otra, la endotoxemia y los niveles aumentados de citoquinas, que aparecen en las enfermedades hepáticas humanas y experimentales (Guarner y cols, 1993; Sugano, 1992; Lee y cols, 1995b), son potentes estímulos de la NOSi (Morris y Billiar, 1994).

Así pues, nuestro siguiente objetivo fue comparar los efectos del tratamiento agudo y crónico con un inhibidor preferencial de la NOSi (AG), sobre la PAM y la función excretora renal, respecto a un inhibidor inespecífico de la NOS (L-NAME).

Nuestros resultados demuestran que, de forma aguda, la AG aumenta la PAM en las ratas con cirrosis, tanto por LCB como por administración de Cl₄C a dosis en las que no produce ningún efecto presor en las controles. Aunque las dosis más altas de AG aumentaron la PAM en los animales controles, el efecto presor total fue significativamente mayor en los cirróticos, lo que sugiere una sensibilidad aumentada de los cirróticos a esta sustancia. Estos hallazgos apoyan la existencia de una activación de la NOSi en ambos modelos de cirrosis, si bien han

de ser tomados con precaución ya que la administración de AG en animales normales dió lugar a incrementos moderados de la presión. Así, según la bibliografía consultada (Hasan y cols, 1993; Misko y cols, 1993), la AG debería inhibir totalmente a la NOSi con todas las dosis utilizadas excepto la última (100 mg/kg) que también inhibiría, al menos parcialmente, al enzima constitutivo. Según esto, nuestros datos indican que el importante efecto presor obtenido hasta la dosis de 50 mg/kg de AG, aproximadamente 15 mmHg en BDL y 23 en Cl₄C puede ser consecuencia de la inhibición completa de la NOSi. Además con estas dosis, los niveles elevados de nitratos y nitritos plasmáticos, un índice de producción de NO, de los animales cirróticos (Cl₄C) disminuyeron tras la administración de AG hasta igualarse a los controles, lo que indica que su efecto presor está relacionado con la inhibición de la síntesis de NO y, muy posiblemente, con la de la NOSi.

La evaluación de nitritos y nitratos también confirma que los aumentos de la PAM producidos por la AG en controles pueden ser debidos a cierto grado de inhibición del enzima constitutivo, aunque sólo disminuyeron con la última dosis que fue la única que indujo un efecto presor significativo en estos animales. Al mismo tiempo, este razonamiento asume que que la enzima inducible no está presente, a niveles fisiológicos, en los animales controles. De todas formas, es interesante anotar que está descrita la presencia de esta isoforma en el riñón de animales normales (Tojo y cols, 1994; Morrissey y cols, 1994; Mohaupt y cols, 1994), además de su conocida representación en músculo liso (Imai y cols, 1994) y células endoteliales (Lamas y cols, 1991). Si este NO inducido en condiciones normales juega algún papel en el mantenimiento del tono vascular sistémico y renal, no se conoce todavía, aunque probablemente podría modular la reabsorción tubular en muchos segmentos de la nefrona (Morrissey y cols, 1994) y ser un mediador local participando en los mecanismos de citotoxicidad (Morris y Billiar, 1994).

Hemos de destacar que, a pesar del importante efecto presor, la menor presión arterial de las ratas cirróticas no se normalizó completamente, lo que señala que otros factores participan en la hipotensión arterial de esta enfermedad. Entre ellos, es muy probable que un aumento de la actividad de la NOSc esté envuelta en esta alteración (Niederberger y cols, 1996). En este sentido, la administración de un bolo final de L-NAME fue capaz de incrementar sustancialmente la PAM en las ratas cirróticas sometidas a LCB, aunque en menor medida que en los animales controles, lo que sugeriría que todavía existe mucha más actividad de NO que

no ha sido inhibida con la AG. De hecho, nuestros experimentos usando N^w-Nitro-L-arginina (L-NNA), indican que este inhibidor corrige completamente la hipotensión arterial de las ratas cirróticas con ascitis. Además, dado que el L-NNA es un inhibidor inespecífico de la NOS, los resultados sugieren claramente que el NO es el principal mediador de la hipotensión arterial de estos animales, corroborando a otros estudios realizados en el mismo modelo de cirrosis (Clària y cols, 1992b). Por su falta de selectividad, ni el L-NAME ni el L-NNA pueden ser utilizados para valorar el grado de participación de cada isoenzima de la NOS, pero en conjunto, todos estos datos indican que la hipotensión arterial de las ratas cirróticas se corrige mediante la inhibición completa del NO. Claramente, parte de este NO es endotelial o constitutivo y parte es de origen inducible, aunque, desafortunadamente, nuestros resultados no permiten una cuantificación de la participación de cada isoforma en el efecto hipotensor.

Respecto a la función renal, la administración de AG a los animales cirróticos tuvo un efecto claramente beneficioso, aumentando la excreción de agua y sodio en forma dependiente de la dosis. Esta mejoría puede estar relacionada con la acción presora provocada por la inhibición de la NOS, que por sí misma puede elevar la excreción de sodio y agua a través del mecanismo de la natriuresis y diuresis de presión (Atucha y cols, 1993a). En este estudio no podemos excluir la existencia de otros efectos renales directos de los inhibidores de la síntesis de NO, que deberían ser estudiados en una situación en la que la perfusión renal no esté comprometida (Atucha y cols, 1994b).

Por otra parte, la AG tiene algunos efectos adicionales a la inhibición de la NOS, como son la inhibición de la diamino-oxidasa (Griffiths y cols, 1993) y la disminución de la formación del producto final de la glicosilación, inducido en las situaciones de hiperglucemia avanzada asociadas a la diabetes (Eldestein y Brownlee, 1992). Es poco probable que estas acciones intervengan en los efectos presores y renales presentados en este trabajo, ya que ninguna de ellas desempeña un papel conocido en la patogénesis de la cirrosis.

Los animales tratados con Cl₄C mostraron una sensibilidad excretora más alta a todas las dosis de AG que los sometidos a LCB. Este hecho puede ser debido a que los animales del primer grupo se encuentran en un estadio más avanzado de la enfermedad, como lo indica la presencia de ascitis, a diferencia de los cirróticos por LCB, lo que supondría la existencia de una mayor actividad sintética de NO en las ratas cirróticas con ascitis (Niederberger y cols, 1996). Nuestros resultados sugieren que la actuación específica sobre una de las isoenzimas

podría aportar unos efectos beneficiosos sobre la función renal sin necesidad de comprometer otras acciones fisiológicas del NO, cuya inhibición podría acarrear consecuencias no deseadas, como ya comentamos. También se observó una sensibilidad presora aumentada con las dos dosis más altas en las ratas con ascitis, de lo que se deduce que en fases más avanzadas existiría una mayor intensidad y/o cantidad de estímulos para la NOS_i, como ocurre con la expresión del enzima constitutivo (Niederberger y cols, 1996), o bien que a estas dosis la inhibición del enzima constitutivo ya participa en la reducción de los niveles aumentados de NO de estos animales, como citabamos anteriormente. Por otra parte, la administración de L-NNA, que corrige completamente la hipotensión arterial, da lugar a una respuesta diurética y natriurética en los animales cirróticos con ascitis mayor que la exhibida por sus controles. Esto, además de demostrar la participación de la NOS constitutiva en el aumento de NO que existe en los animales con cirrosis, puede indicar que este grado de inhibición puede ser exagerado y producir efectos que a largo plazo serían contraproducentes.

Esta discordancia sobre los efectos presores y renales de la AG y el L-NAME puede explicarse por las diferentes actividades de la NOS en las distintas localizaciones. En los animales cirróticos, la AG podría ejercer una acción fundamentalmente renal fruto de la preferente localización de la NOS_i en riñón, de forma distinta al L-NNA que ejercería una acción inespecífica sobre las dos isoformas de la NOS y por tanto sus efectos serán derivados de la inhibición tanto a nivel sistémico como renal. De todas formas, parece probable que el efecto presor de la AG sea también debido a una acción sistémica.

Respecto a la hemodinámica renal, el FSR sólo se afectó con la dosis más alta de AG en ambos grupos de animales, cirróticos y controles. Esto, adicionalmente, sustenta la idea de que esta dosis tiene un efecto sobre la NOS constitutiva y que la hemodinámica renal tiene una especial sensibilidad a la inhibición de esta isoforma. Algunos autores han demostrado que incluso el uso de dosis no presoras de inhibidores inespecíficos de la NOS produce una disminución del FSR sobre los animales cirróticos (Atucha y cols, 1994b). También es posible que la elevada expresión del enzima constitutivo limite la expresión de la NOS_i, por medio de una regulación pretransduccional (Martin y cols, 1996a), por lo que la inhibición inespecífica de la NOS, actuando sobre una exagerada expresión del enzima constitutivo daría una respuesta tan potenciada como la mostrada tras la administración del L-NNA.

Teniendo en cuenta los efectos beneficiosos aportados por la administración de AG aguda, nuestro siguiente paso fue evaluar si de forma crónica se repetían estos resultados y compararlos con el uso de los inhibidores inespecíficos de la NOS, como una alternativa potencial del tratamiento de la cirrosis. Por este motivo, sometimos a dos grupos de animales cirróticos (Cl₄C) con ascitis a un tratamiento con AG y L-NAME, respectivamente, durante 10 días en el agua de bebida y a sus correspondientes controles. Elegimos una dosis que al igual que en los experimentos agudos no modificara la PAM en exceso en los animales controles y comprobar el efecto, en este caso crónico, que este grado de inhibición tendría en los animales cirróticos.

Al contrario de lo esperable después de lo observado en los experimentos agudos, el tratamiento crónico con AG no mejoró ninguno de los parámetros sobre los que la administración aguda sí actuó de forma beneficiosa. Estos resultados contrastan enormemente con los obtenidos tras la administración de L-NAME crónico, que de forma similar a la administración aguda de L-NNA, consiguió corregir la hipotensión arterial en los animales cirróticos y reestablecer la diuresis y la natriuresis a unos valores similares a los de los animales controles. Estos efectos parecen ser debidos a la inhibición de la síntesis de NO ya que los niveles de nitratos y nitritos plasmáticos fueron similares entre los animales cirróticos y controles tratados con L-NAME, a diferencia de los animales tratados con AG y de los no tratados. Según estudios previos, esta dosis de L-NAME (0.5 mg/kg/día) normaliza la concentración de los niveles aórticos de GMPc (reflejo de los niveles de NO), produciendo además una corrección de la vasodilatación arterial y de la circulación hiperdinámica en ratas cirróticas con ascitis (Niederberger y cols, 1995a). Nuestros resultados aportan además que esta dosis normaliza la función excretora renal de los animales cirróticos, sin que se produzcan cambios significativos de la tasa de filtración glomerular. Resultados similares han sido comunicados también recientemente (Martin y cols, 1996b), demostrando que la normalización de la producción de NO se acompaña de un aumento marcado de la excreción de sodio en las ratas cirróticas con ascitis.

La ausencia de algún efecto de la AG no pensamos que sea debida a un problema de la dosis empleada (100 mg/kg/día), ya que esta misma ha sido utilizada por otros autores (Cross y cols, 1994) en el tratamiento de enfermedades diferentes a la cirrosis, pero en las que está implicada la NOSi en su patogenia. Además, los animales cirróticos tratados con AG

mostraron una disminución significativa de los niveles plasmáticos de nitratos+nitritos, si bien continuaron elevados con respecto a sus controles. Tampoco podemos atribuirlo a un problema de biodisponibilidad oral, ya que otros autores han demostrado que esta vía es efectiva para su administración (Preedy y Hammond, 1991; Tsukahara y cols, 1996). Además, en un trabajo recientemente publicado por Lee y cols (1997), la administración subcutánea de AG a la misma dosis empleada por nosotros corrigió la circulación hiperdinámica en ratas con hipertensión portal, si bien el tratamiento se inició dos días antes de someter al animal a la ligadura parcial de la vena porta y se continuó durante 14 días después de la misma. Esta forma de administrar la AG, más enfocada a prevenir que a tratar la enfermedad, es frecuente en la literatura revisada (Cross y cols, 1994; Connor y cols, 1995) y ha sido aplicada en el estudio de la participación de la NOSi en diferentes enfermedades en las que el aumento de NO de este origen desempeña un papel principal en sus respectivas patogenias. Aunque la mayoría de estos estudios consiguen una respuesta positiva en cuanto a los efectos beneficiosos de este inhibidor, administrar AG antes de la inducción de la cirrosis se aleja de nuestro propósito, y probablemente de lo posible en la clínica o en el laboratorio experimental, que es el tratamiento de la enfermedad una vez desarrollada.

Además de la posible regulación pretransduccional del enzima constitutivo sobre la expresión del inducible (Martin y cols, 1996a), en un estudio in vitro se ha demostrado que la AG a dosis bajas aumenta la producción de GMPc de origen constitutivo y este efecto no parece ser debido a que esta sustancia sirva como sustrato para el enzima, por lo que sugirieron un efecto sobre la conformación del enzima para explicar este fenómeno (Misko y cols, 1993). De ser ésto cierto, se potenciarían más tanto el efecto regulador que la NOSc ejerce sobre la inducible como los derivados de su inhibición. El tiempo de administración es otro factor a tener en cuenta ya que se ha descrito que la actividad de la AG sobre la NOSi requiere de más tiempo que los análogos de la L-Arginina para alcanzar el efecto máximo (Wu y cols, 1995). En este sentido, no podemos asegurar que los 10 días de tratamiento hayan sido suficientes para ver un cambio evidente sobre la presión arterial y la función renal o que el efecto haya sido de escasa magnitud y enmascarado con los efectos del anestésico. De cualquier manera, objetivamente nuestros datos no apoyan a la AG como una buena elección para tratar crónicamente a los animales con cirrosis por Cl₄C.

Es necesario hacer una consideración final respecto al uso crónico *in vivo* de inhibidores de la NOS y es su toxicidad. El uso de algunos análogos de la L-Arginina, como los empleados aquí, se acompañan de varios problemas tóxicos como son la elevación de la presión sanguínea y de las resistencias vasculares periféricas en pacientes con *shock* endotóxico. También se ha descrito que el L-NAME produce un daño hepático en ratones y la N^G-Amino-L-Arginina, rigidez neuromuscular y convulsiones en perros. La AG, administrada en dosis de 1.2 g/día a humanos disminuye la glicosilación de la hemoglobina pero no se ha informado de ninguna otra toxicidad aguda (Wolff y Lubeskie, 1995). Por tanto, a pesar de nuestros resultados, esta sustancia puede constituir un inhibidor efectivo y no tóxico de la NOSi, para lo que se requerirían más estudios tanto en animales de experimentación como estudios clínicos en humanos.

Respecto al último protocolo, como ya hemos indicado, hemos empleado ratas después de 15 días desde la LCB. Está descrito que tras 14 días de la obstrucción biliar existe un patrón hemodinámico de hipertensión portal, aunque todavía no existe una cirrosis establecida (Franco y cols, 1979; Sikuler y cols, 1991) y, a partir de los 15 días, esta obstrucción crónica, conduce a cirrosis (Kountouras y cols, 1984). Teniendo en cuenta que este es un estudio preliminar consideramos que este punto (15 días) sería el más crítico a la hora de establecer si hay una alteración anatómica. Por un lado, es lo suficientemente crónico para encontrar un reflejo estructural de las alteraciones funcionales o viceversa, y tratándose de una enfermedad crónica nos invita al estudio de fases más tardías. Por otro lado, es relativamente inicial para poder establecer posibles relaciones temporales entre los cambios estructurales y los funcionales y si éstos están implicados con la progresiva alteración renal. Hemos de destacar que los riñones controles utilizados, son de un peso superior y no fueron sometidos a operación simulada, si bien su preparación fue estrictamente idéntica a la efectuada posteriormente por los riñones de animales con LCB.

La determinación del volumen tisular se realizó para comprobar si las partes del riñón conservaban su volumen, o había existido algún cambio adaptativo tras los 15 días de LCB. Justificamos la realización de estas medidas en primer lugar por observaciones macroscópicas de cortes transversales que sugerían una disminución de la corteza a costa de un aumento del volumen medular en los animales sometidos a LCB. Sin embargo, a la hora de estimar el volumen por medio del sistema de escaner microcomputerizado encontramos un aumento de

la corteza a expensas de una disminución de la tira externa de la médula externa (TEME) por lo que consideramos que lo observado a nivel macroscópico podía deberse a un efecto óptico debido al escaso llenado de los vasos por el contraste a nivel cortical. Estos resultados son diferentes a los determinados por Jonassen y cols (1997) que sólo encuentran cambios en la tira externa de la médula interna (TIME), estando su volumen aumentado en los animales cirróticos respecto a los controles. Estas diferencias pueden ser atribuidas a las metodologías utilizadas tanto en el análisis de las imágenes como en el cálculo de las medidas del volumen. Nuestros resultados sugieren un aumento del volumen de tejido no vascular en corteza, ya que el porcentaje de volumen ocupado por los vasos en ella está significativamente disminuido. Dado que el intersticio ocupa un espacio relativamente pequeño, aproximadamente un 13% del volumen renal (Larson y cols, 1984; Pinter y Gartner, 1984) y que en la corteza tiene lugar el mayor porcentaje de la reabsorción de agua y solutos, probablemente exista un aumento en el tamaño de los segmentos tubulares situados en esta zona del riñón aunque tampoco podemos descartar un aumento de la zona intersticial. Por el contrario, la TEME vería disminuidas todas sus estructuras en conjunto, puesto que ambos volúmenes tisular y vascular, están disminuídos, como desplazados por la corteza. Según esto, podríamos pensar que diferentes estados en la reabsorción de sodio pueden acarrear importantes cambios adaptativos tubulares, tanto funcionales como estructurales, mediados o no por una redistribución del flujo sanguíneo vascular.

Las medidas de volumen vascular realizadas en este estudio son estáticas y no pueden ser consideradas un reflejo directo del flujo a través de los vasos. Esta medida está relacionada con la cantidad de contraste en los vasos y por tanto dependerá del número y del tamaño de los vasos en el momento de la perfusión, por lo que nos daría una idea de la distribución más que del flujo en sí. En este sentido encontramos una disminución de la perfusión vascular en corteza, manteniéndose en la parte medular interna, TIME y papila. Estos hallazgos ya han sido encontrados por otros autores (Kew y cols, 1971; Sacerdoti y cols, 1986) y, junto a nuestros datos, son compatibles con la existencia de una redistribución del flujo renal lejos de la corteza. Esta misma distribución ha sido descrita en otras patologías como la hipertensión renovascular en la que la presión de perfusión renal está crónicamente disminuída (Lerman y cols, 1996). En el estadio de la cirrosis estudiado aquí, en el que los animales cirróticos serían todavía normotensos, cabría esperar una perfusión renal adecuada y por tanto la redistribución

se derivaría de cambios a nivel intrarrenal. Estos cambios ocurrirían como consecuencia de un balance inadecuado entre los sistemas vasoconstrictores y vasodilatadores y, en cualquier caso, supondrían un mecanismo adicional que facilitaría la retención de sodio. En este sentido, Saló y cols (1993) ya señalaron que una alteración capilar peritubular podría influir de forma importante en la retención de sodio de los pacientes cirróticos.

Por último, el estudio de los vasos intrarrenales reveló una disminución de los diámetros arteriales de los vasos interlobares y arqueados respecto a los controles. Esto significaría la existencia de una vasoconstricción arterial que podría justificar la baja vascularización en corteza, pero que podría no tener una repercusión en la resistencia vascular renal, puesto que el principal elemento de resistencia en el riñón es la arteriola aferente. No descartamos que la arteriola aferente se encuentre vasodilatada en un intento de conservar la filtración glomerular y asegurar la vascularización de las estructuras postglomerulares, si bien no disponemos de estas medidas porque a estos niveles se necesita una mayor resolución en el escáner, que esperamos obtener en un futuro.

Con los datos que tenemos no podemos discriminar si son los trastornos de los sistemas neurohormonales los que provovan inicialmente la redistribución del flujo sanguíneo renal y esto desencadena la retención inicial de sodio y agua, o los primeros son una consecuencia adaptativa de esta última debido a las alteraciones sistémicas que estimulan al riñón hacia la retención.

SUMARIO DE RESULTADOS

1. Los anillos de aorta de ratas con ligadura crónica del conducto biliar (LCB) exhiben una hiporrespuesta a fenilefrina debida a un aumento de óxido nítrico (NO), fundamentalmente de origen constitutivo y endotelial.
2. La respuesta vasodilatadora a acetilcolina, dependiente de endotelio, no está alterada en los anillos aórticos de ratas con LCB.
3. La actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) constitutiva está elevada en la aorta de animales cirróticos por Cl₄C y por LCB. La actividad de la NOS inducible sólo está elevada significativamente en el riñón de las ratas con LCB.
4. La capacidad vasodilatadora intrarrenal global, debida a NO y a prostaglandinas (PGs), es menor en animales cirróticos por Cl₄C. Este descenso es achacable a la disminución del componente vasodilatador dependiente de PGs, ya que el componente debido a NO está significativamente aumentado.
5. La administración aguda del inhibidor preferencial de la síntesis de NO de origen inducible, aminoguanidina (AG), aumenta la presión arterial y la excreción de sodio y agua en animales con LCB, mientras que los efectos en los animales controles son de escasa magnitud. Sin embargo, estos cambios no consiguen normalizar esos parámetros de los animales con LCB.
6. La administración aguda del inhibidor preferencial de la síntesis de NO de origen inducible, aminoguanidina (AG), en animales con cirrosis y ascitis por Cl₄C aumenta la presión arterial y la excreción de sodio y agua, sin llegar a su normalización. Por el contrario, el efecto en los animales controles es de pequeña magnitud. Estos efectos se acompañan de la disminución de los niveles de nitritos+nitratos plasmáticos.
7. La administración aguda del inhibidor inespecífico de la síntesis de NO, N^w-nitro-L-arginina (NNA) en animales con cirrosis y ascitis por Cl₄C aumenta la presión arterial y la excreción de sodio y agua, consiguiendo la completa normalización de estos parámetros.

8. La administración crónica de AG y L-NAME produce efectos diferentes en animales con cirrosis y ascitis por Cl_4C . Mientras que el tratamiento crónico con L-NAME aumentó la presión arterial y la excreción de agua y sodio, el tratamiento con AG no produjo ningún efecto beneficioso en los animales cirróticos.

9. La evaluación morfológica de riñones de ratas con LCB mediante la aplicación de un sistema de escáner microcomputarizado revela la existencia de una hipoperfusión cortical con mantenimiento de la perfusión medular, un aumento de la fracción de volumen tisular cortical y un menor diámetro de arterias interlobares y arqueadas y de las venas arqueadas.

CONCLUSIONES

1. La hiporrespuesta vascular sistémica a vasoconstrictores es debida a una mayor producción de óxido nítrico constitutivo de origen endotelial. El mantenimiento de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio sugiere que no todos los mecanismos de liberación de óxido nítrico están alterados en el modelo de ligadura crónica del conducto biliar.
2. El riñón cirrótico muestra una menor capacidad vasodilatadora intrarrenal global, debida a la disminución del componente dependiente de prostaglandinas que no es compensado por la mayor producción de óxido nítrico.
3. Los efectos beneficiosos sobre presión arterial y excreción de agua y sodio de la aminoguanidina sugieren la participación de la isoforma inducible de la sintasa de óxido nítrico en las alteraciones sistémicas y renales de los animales con cirrosis por Cl_4C y por ligadura del conducto biliar.
4. La falta de normalización de los parámetros estudiados tras la administración de aminoguanidina indica la presencia de otros mecanismos, dependientes de óxido nítrico de origen constitutivo, que también contribuyen a la hipotensión y retención de sodio de los animales con cirrosis experimental.
5. La administración de aminoguanidina no es una buena elección para el tratamiento a largo plazo de la hipotensión arterial y retención de sodio de los animales cirróticos con ascitis. Por el contrario, el efecto beneficioso crónico se consigue con el inhibidor inespecífico de la síntesis de óxido nítrico, L-NAME.
6. Las alteraciones morfológicas del riñón de ratas con ligadura del conducto biliar detectadas con el sistema de escáner microcomputerizado, son compatibles con la retención de sodio y sugieren la existencia de una interrelación anatomofuncional alterada entre la distribución del flujo sanguíneo intrarrenal y la función excretora.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham WT, Lauwaars ME, Kim JK, Pena RL, Schrier RW. Reversal of atrial natriuretic peptide resistance by increasing distal tubular sodium delivery in patients with decompensated cirrhosis. Hepatology 1995; 22: 737-743.
- Albillos A. Fisiopatología del síndrome de hipertensión portal: patogénesis del estado de circulación hiperdinámica. Gastroenterol Hepatol 1993; 16: 505-513.
- Albillos A, Rossi I, Cacho G y cols. Enhanced endothelium-dependent vasodilation in patients with cirrhosis. Am J Physiol 1995; 268: G459-G464.
- Anderson RJ, Cronin RE, McDonald KM, Schrier RW. Mechanisms of portal hypertension-induced alterations in renal hemodynamics, renal water excretion, and renin secretion. J Clin Invest 1976; 58: 964-970.
- Angeli P, De Bei E, Dalla M. Effects of amiloride on renal handling in non-azotemic ascitic cirrhotics. Hepatology 1992; 15: 651-654.
- Angeli P, Jiménez W, Arroyo V, Mackenzie HS, Zhang PL, Clària J, Rivera F, Brenner BM, Rodés J. Renal effects of natriuretic peptide receptor blockade in cirrhotic rats with ascites. Hepatology 1994; 20: 948-954.
- Arroyo V, Planas R, Gaya J, Deulofeu R, Rimola A, Pérez-Ayuso RM, Rivera F, Rodés J. Sympathetic nervous activity, renin-angiotensin system and renal excretion of prostaglandin E₂ in cirrhosis. Relationship to functional renal failure and sodium and water excretion. Eur J Clin Invest 1983; 13, 271-278.
- Arroyo V, Ginès P. Arteriolar vasodilation and the pathogenesis of the hyperdynamic circulation and renal sodium and water retention in cirrhosis. Gastroenterology 1992; 102: 1077-1079.
- Arroyo V, Clària J, Saló J, Jiménez W. Antidiuretic hormone and the pathogenesis of water retention in cirrhosis with ascites. Semin Liver Dis 1994; 14: 59-70.
- Arroyo V, Ginès P, Gerbes AL, Dupley FJ, Gentilini P, Laffi G, Reynolds TB, Ring-Larsen H, Shölmerich. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. Hepatology 1996; 23: 164-176.
- Asbert M, Ginès A, Ginès P, Jiménez W, Clària J, Saló J, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Circulating levels of endothelin in cirrhosis. Gastroenterology 1993; 104: 1485-1491.
- Atucha NM, Cegarra M, Ramírez A, Quesada T, García-Estañ J. Pressure diuresis and natriuresis in cirrhotic rats. Am J Physiol 1993a; 265: G1045-G1049.
- Atucha NM, Quesada T, García-Estañ J. Reduced renal papillary plasma flow in non-ascitic cirrhotic rats. Clin Sci 1993b; 85: 139-145.

- Atucha NM, Ramírez A, Quesada T, García-Estañ J. Effects of nitric oxide inhibition on the renal papillary plasma flow response to saline-induced volume expansion in the rat. Clin Sci 1994a; 86: 405-409.
- Atucha NM, García-Estañ J, Ramírez A, Pérez MC, Quesada T, Romero JC. Renal effects of nitric oxide synthesis inhibition in cirrhotic rats. Am J Physiol 1994b; 267: R1454-R1460.
- Atucha NM, García-Estañ J. Intrarenal alterations in experimental liver cirrhosis. News Physiol Sci 1996; 11: 48-52.
- Atucha NM, Ortiz MC, Martínez C, Quesada T, García-Estañ J. Role of protein kinase C in mesenteric pressor responses of rats with portal hypertension. Br J Pharmacol 1996a; 118: 277-282.
- Atucha NM, Shah V, García-Cardena G, Sessa WE, Groszmann RJ. Role of endothelium in the abnormal response of mesenteric vessels in rats with portal hypertension an liver cirrhosis. Gastroenterology 1996b; 111: 1627-1632.
- Atucha NM, Ortiz MC, Fortepiani LA, Ruiz FM, Martínez C, García-Estañ J. Role of cGMP and K⁺ channels as mediators of mesenteric vascular hyporesponsiveness in portal hypertensive rats. Hepatology 1998, en prensa.
- Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localization, and function. Am J Kid Dis. 1994; 24 (1): 112-129.
- Bannikuppe SV, Frey FJ, Escher G, Reichen J, Frey BM. Liver cirrhosis induces renal and liver phospholipase A₂ activity in rats. J Clin Invest 1996; 98: 365-371.
- Battista S, Fabrizio B, Mengozzi G, Zanon E, Grosso M, Molino G. Hyperdynamic circulation in patients with cirrhosis: direct measurement of nitric oxide levels in hepatic and portal veins. J Hepatol 1997; 26: 75-80.
- Bentley MD, Lerman LO, Hoffman EA, Fiksen-Olsen MJ, Ritman EL, Romero JC. Measurement of renal perfusion and blood flow with fast computed tomography. Circ Res 1994; 74: 945-951.
- Bichet DG, Van Putten VJ, Schrier RW. Potential role of increased sympathetic activity in impaired sodium and water excretion in cirrhosis. N Engl J Med 1982; 307: 1552-1557.
- Bomzon A, Jacob G, Lee SS, Meddings J. In vitro vascular responsiveness to norepinephrine in experimental portal hypertension. Clin Invest Med 1991; 14: 63-71.
- Bonkovsky HL, Hartle DK, Mellen BG y cols. Plasma concentrations of immunoreactive atrial natriuretic peptide in hospitalized cirrhotic and non-cirrhotic patients: Evidence of a role of deficient atrial natriuretic peptide in pathogenesis of cirrhotic ascites. Am J Gastroenterol 1988; 83: 531-535.

- Bosch J, Gacía-Pagán JC. Hipertensión portal. Medicine 1992; 6 (7): 271-282.
- Boyer TD, Zia P, Reynolds TB. Effects of indomethacin and Prostaglandin A₁ in renal function and plasma renin activity in alcoholic liver disease. Gastroenterology 1979; 77: 215-222.
- Bomzon A, Jacob G, Lee SS, Meddings J. In vitro vascular responsiveness to norepinephrine in experimental portal hypertension. Clin Invest Med 1991; 14: 63-71.
- Bomzon A, Blendis LM. The nitric oxide hypothesis and the hyperdynamic circulation in cirrhosis. Hepatology 1994; 20: 1343-1350.
- Braillon A, Gaudin C, Poo JL, Moreau R, Debaene B, Lebrec D. Plasma catecholamine concentrations are a reliable index of sympathetic vascular tone in patients with cirrhosis. Hepatology 1992; 15: 58-62.
- Bruix J, Bosch J, Kravetz D, Mastai R, Rodés J. Effects of prostaglandin inhibition on systemic and hepatic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver. Gastroenterology 1985; 88: 430-435.
- Busse R, Fleming I y Hecker M. Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. Eur Heart J 1993a; 14 (Supl. I): 2-9.
- Busse R, Mülsch A, Fleming I, Hecker M. Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. Circulation 1993b; 87 (Supl. V): V18-V25.
- Cahill PA, Foster C, Redmond EM, Gingalewsky C, Wu Y, Sitzmann JV. Enhanced nitric oxide synthase activity in portal hypertensive rabbits. Hepatology 1995; 22: 598-606.
- 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; 25: 370-378.
- Camps J, Sola J, Arroyo V, Pérez-Ayuso RM, Gaya J, Rivera J, Rodés J. Temporal relationships between the impairment of free water excretion and antidiuretic hypersecretion in rats with experimental cirrhosis. Gastroenterology 1987; 93: 498-505.
- Camps J, Sola X, Rimola A y cols. Comparative study of aminoglycoside nephrotoxicity in normal rats and rats with experimental cirrhosis. Hepatology 1988; 4: 837-844.
- Caramelo C, Fernández-Muñoz D, Santos JC, Blanchart A, Rodríguez-Puyol D, López-Novoa JM, Hernando L. Effect of volume expansion on hemodynamics, capillary permeability and renal function in conscious, cirrhotic rats. Hepatology 1986; 6 (1): 129-134.
- Carretero OA, Scicli AG. The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. En "Hypertension: Pathophysiology, diagnosis, and management", JM Laragh, BM Brenner, ed., 2^a ed., Raven Press, New York, 983-999, 1995.

- Carrier GO, White RE. Enhancement of alpha-1 and alpha-2 adrenergic agonist-induced vasoconstriction by removal of endothelium in rat aorta. J Pharmacol Exp Ther 1985; 232: 682-687.
- Castro A, Jiménez W, Clària J, Ros J, Martínez JM, Bosch M, Arroyo V, Piulats J, Rivera F, Rodés J. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: Role of nitric oxide. Hepatology 1993; 18: 367-372.
- Castro A, Ros J, Jiménez W, Clària J, Llibre J, Leivas A, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats with cirrhosis. J Hepatol 1994; 21: 521-526.
- Cawley T, Geraghty J, Osborne H, Docherty JR. Effects of portal hypertension on responsiveness of rat mesenteric artery and aorta. Br J Pharmacol 1995; 114: 791-796.
- Cejalvo D, Cortijo J, Gimeno L, Bolant B, Calvo MA, Lloris JM. El órgano aislado como reactivo experimental. Res Surg 1989; Suppl. 3: 10-17.
- Clària J, Jiménez W, Arroyo V, Guarner F, López C, La Villa G, Asbert M, Rivera F, Rodés J. Blockade of the hydroosmotic effect of vasopresin normalizes water excretion in cirrhotic rats. Gastroenterology. 1989; 97: 1294-1299.
- Clària J, Jiménez W, Arroyo V, Castro A, Asbert M, Ros J, Rivera F, Rodés J. Doses of endothelin have natriuretic effects in conscious rats with cirrhosis and ascites. Kidney Int 1991; 40: 182-187.
- Clària J, Jiménez W. Cirrosis hepática experimental y fisiopatología de la formación de ascitis en la enfermedad hepática crónica. Gastroenterol Hepatol 1992a; 15 (3): 171-182.
- Clària J, Jiménez W, Ros J, Asbert M, Castro A, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Pathogenesis of arterial hypotension in cirrhotic rats with ascites: Role of endogenous nitric oxide. Hepatology 1992b; 15: 343-349.
- Clària J, Jiménez W, Ros J, Rigol M, Angeli P, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Increased nitric oxide-dependent vasorelaxation in aortic rings of cirrhotic rats with ascites. Hepatology 1994; 20: 1615-1621.
- Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. Eur J Pharmacol 1995; 273: 15-24.
- Criado M, Flores O, Ortiz MC, Hidalgo F, Rodríguez-López AM, Eleno N, Atucha NM, Sánchez-Rodríguez A, Arévalo M, García-Estañ J, López-Novoa JM. Elevated glomerular and blood mononuclear lymphocyte nitric oxide production in rats with chronic bile duct ligation: Role of inducible nitric oxide synthase activation. Hepatology 1997; 26: 268-276.

- Cross AH, Misko TP, Lin RF, Hickey WF, Trotter JL, Tilton RG. Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. J Clin Invest 1994; 93: 2684-2690.
- Demirel E, Hindioglu F, Ercan ZS, Turker RK. Endothelium modulates the effects of alpha-adrenoceptor agonist in vascular smooth muscle. Gen Pharmacol 1989; 20: 89-93.
- Dibona GF, Sawin LL. Role of renal nerves in sodium retention of cirrhosis and congestive heart failure. Am J Physiol 1991; 29: R298-R305.
- Eldestein D, Brownlee M. Mechanistic studies of advance glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. Diabetes 1992; 41: 26-29.
- Epstein M. Renal sodium handling in liver disease. En "The kidney in liver disease", M Epstein, ed., 4^a ed., Hanley & Belfus, Inc., Philadelphia, 1-31, 1996a.
- Epstein M. Atrial natriuretic factor and liver disease. En "The kidney in liver disease", M Epstein, ed., 4^a ed., Hanley & Belfus, Inc., Philadelphia, 339-358, 1996b.
- Epstein M. Renin-angiotensin system in liver disease. En "The kidney in liver disease", M Epstein, ed., 4^a ed., Hanley & Belfus, Inc., Philadelphia, 267-289, 1996c.
- Epstein M. Aldosterona and liver disease. En "The kidney in liver disease", M Epstein, ed., 4^a ed., Hanley & Belfus, Inc., Philadelphia, 291-305, 1996d.
- Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone beam algorithm. J Opt Soc Am A 1984; 1: 612-619.
- Fernández M, García-Pagán JC, Casadevall M, Mourekke MI, Piqué JM, Bosch J, Rodés J. Acute and chronic cyclooxygenase blockade in portal-hypertensive rats: Influence on nitric oxide biosynthesis. Gastroenterology 1996; 110: 1529-1535.
- Flannery BP, Deckman HW, Roberge WG, D'Amico KL. Three-dimensional x-ray microtomography. Science 1987; 237: 1439-1444.
- Floras JS, Legault L, Morali GA, Hara K, Blendis LM. Increased sympathetic outflow in cirrhosis and ascites: Direct evidence from intraneural recordings. Ann Int Med 1991; 114: 373-380.
- Förstemann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, y functions. Hypertension 1994; 23 (6): 1121-1131.
- Franco D, Gigou M, Szekely A-M, Bismuth HB. Portal hypertension after bile duct obstruction. Arch Surg 1979; 114: 1064-1067.

- Fujita N, Ishikawa SE, Sasaki S, Fujisawa G, Fushimi K, Marumo F, Saito T. Role of water channel AQP-CD in water retention in SIADH and cirrhotic rats. Am J Physiol 1995; 269: F926-F931.
- Gadano AC, Sogni P, Yang S, Cailmail S, Moreau R, Nepveux P, Couturier D, Lebrec D. Endothelial calcium-calmodulin dependent nitric oxide synthase in th in vitro vascular hyporeactivity of portal hypertensive rats. J Hepatol 1997; 26: 678-686.
- García-Estañ J, Atucha NM, Sabio JM, Vargas F, Quesada T, Romero JC. Increased endothelium-dependent renal vasodilation in cirrhotic rats. Am J Physiol 1994; 267: R549-R553.
- García-Estañ J, Atucha NM, Groszmann RJ. Renal response to methoxamine in portal hypertensive rats: role of prostaglandins and nitric oxide. J Hepatol 1996; 25: 206-211.
- Gentilini P, Romanelli RG, La Villa G, Maggiore Q, Pesciullesi E, Capelli G, Casini Raggi V, Foschi M, Marra F, Pinzani M, Buzzelli G, Laffi G. Effects of low-dose captopril on renal hemodynamics and function in patients with cirrosis of the liver. Gastroenterology 1993; 104: 588-594.
- Ginés A. Ascitis. Medicine 1992; 6 (7): 283-293.
- Goligorsky, MS, Nord EP. Endothelin and renal dysfunction in liver disease. En "The kidney in liver disease", M Epstein, ed., 4ª ed., Hanley & Belfus, Inc., Philadelphia, 387-404, 1996.
- Green, Better OS. Altered systemic hemodynamics in obstructive jaundice. J Am Soc Nephrol 1995; 5: 1855-1871.
- Griffiths MDJ, Messent M, Mcallister RJ y Evans TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. Br J Pharmacol 1993; 110: 963-968.
- Guarner F, Guarner C, Prieto J, Colina I, Quiroga J, Casas J, Freixa R, Rosello J, Gelpi E, Balanzo J. Increased synthesis of systemic prostaglandin in cirrhotic patients. Gastroenterology 1986; 90: 687-694.
- Guarner C, Soriano G, Tomás A y cols. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. Hepatology 1993; 18: 1139-1143.
- Hasan K, Heesen BJ, Cobertt JA y cols. Inhibition of nitric oxide formation by guanidines. Eur J Pharmacol 1993; 249: 101-106.
- Hartleb M, Moreau R, Gaudin C, Lebrec D. Lack of vascular hyporesponsiveness to the L-type calcium channel activator, Bay K 8644, in rats with cirrhosis. J Hepatol 1995; 22: 202-207.
- Henriksen JH, Ring-Larsen H. Hepatorenal disorders: Role of the sympathetic nervous system. Semin Liver Dis 1994; 14: 35-43.

- 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; 278: 87-90.
- Heinemann A, Stauber RE. Effect of terlipressin on *in vitro* vascular hyporeactivity of portal hypertensive rats. J Hepatol 1996a; 24: 739-746.
- Heinemann A, Stauber RE. Vasodilator responses to nitric oxide are enhanced in mesenteric arteries of portal hypertensive rats. Eur J Clin Invest 1996b; 26: 824-826.
- Hillman BJ, Lee SM, Tracey P, Swindell W, Long DM. CT determination of renal and hepatic microvasculature in experimental acute renal failure. Invest Radiol 1982; 17: 41-45.
- Hirokazu T, Miura M, Tsuchida S, Hata I, Hata K, Yamamoto K, Ishii Y, Muramatsu I, Sudo M. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. Am J Physiol 1996; 270: E840-E845.
- Hoher B, Zart R, Diekmann F, Rohmeiss P, Distler A, Neumayer HH, Bauer C, Gross P. Paracrine renal endothelin system in rats with liver cirrhosis. Br J Pharmacol 1996; 118: 220-227.
- Huang Y-T, Chang S-P, Lin H-C, Yang MCM, Hong C-Y. Inositol phosphate responses in portal veins from portal hypertensive rats: receptor- and nonreceptor-mediated responses. J Hepatol 1997; 26: 376-381.
- Imai T, Hirata Y, Kanno K, Marumo F. Induction of nitric oxide synthase by cyclic AMP in rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest 1994; 93: 543-549.
- Inan M, Sayek I, Tel BC, Sahin-Erdemli I. Role of endotoxin and nitric oxide in the pathogenesis of renal failure in obstructive jaundice. Br J Surg 1997; 84: 943-947.
- Inglés AC, Hernández I, García-Estañ J, Quesada T, Carbonell LF. Limited cardiac preload reserve in conscious cirrhotic rats. Am J Physiol 1991a; 260: H1912-H1917.
- Inglés AC, Hernández I, García-Estañ J, Quesada T, Carbonell LF. Increased total vascular capacity in conscious cirrhotic rats. Gastroenterology 1991b; 103: 275-281.
- Jalink D, Urbanski SJ, Lee SS. Bilioenteric anastomosis reverses hyperkinetic circulation in bile duct-ligated cirrhotic rats. J Hepatol 1996; 25: 924-931.
- Jiménez W, Martínez-Pardo A, Arroyo V y cols. Temporal relationship between hyperaldosteronism, sodium retention and ascites formation in rats with experimental cirrhosis. Effect of spironolactone. Hepatology 1985; 5: 245-250.

- Jiménez W, Clària J, Arroyo V, Rodés J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: A useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. J Gastroenterol Hepatol 1991; 6: 000-000.
- Jiménez W, Arroyo V. Pathogenesis of sodium retention in cirrhosis. J Hepatol 1993; 18: 147-150.
- Joly GA, Ayres m, Chell YF y Kilbourn RG. Effects of N^G-methyl-L-arginine, N^G-nitro-L-arginine and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. Biochem Biophys Res Commun 1994; 199: 147-154.
- Jonassen TEN, Marcussen N, Haugan K, Skium H, Christensen S, Andreasen F, Petersen JS. Functional and structural changes in the thick ascending limb of Henle's loop in rats with liver cirrhosis. Am J Physiol 1997; 273: R568-R572.
- Karatapanis S, McCormick PA, Kakad S, Chin JKT, Islam M, Jeremy J, Harry D, McIntyre N, Burroughs AK, Jacobs M. Alteration in vascular reactivity in isolated aortic rings from portal vein-constricted rats. Hepatology 1994; 20: 1516-1521.
- Keeler R. Renal and cardiovascular effects of chronic occlusion of the bile duct in rats. Nephron 1981; 28: 249-254.
- Kew MC, Brunt PW, Varma RR, Hourigan KJ, Williams HS, Sherlock S. Renal and intrarenal blood flow in cirrhosis of the liver. Lancet 1971; 2: 504-509.
- Kiel JW, Pitts V, Benoit JN, Granger DN, Shepherd AP. Reduced vascular sensitivity to norepinephrine in portal-hypertensive rats. Am J Physiol 1985; 248: G192-G195.
- Kim JK, Summer SN, Howard RL, Schrier W. Vasopressin gene expression in rats with experimental cirrhosis. Hepatology 1993; 17:143-147.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J 1994; 298: 249-258.
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. Br J Exp Path 1984 ; 65: 305-311.
- Laffi G, Foschi M, Masini E, Simoni A, Mugnai L, La Villa G, Barletta G, Mannaioni PF, Gentilini. Increased production of nitric oxide by neutrophils and monocytes from cirrhotic patients with ascites and hyperdynamic circulation. Hepatology 1995; 22: 1666-1673.
- Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero JC. Effects of N^G-nitro-L-arginina methylester on renal function and blood pressure. Am J Physiol 1991a; 261: F1033-F1037.

- Lahera V, Salom MG, Filksen-Olsen MJ, Romero JC. Mediatory role of endothelium-derived nitric oxide in renal vasodilatory and excretory effects of bradykinin. Am J Hypertens 1991b; 4: 260-262.
- Lamas S, Michel T, Brenner BM, Marsden PA. Nitric oxide synthesis in endothelial cells: Evidence for a pathway inducible by TNF-alpha. Am J Physiol 1991; 261: C634-C641.
- Larson M, Sjöquist M, Wolgast M. Renal interstitial volume of the rat kidney. Acta Physiol Scand 1984; 120: 297-304.
- 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 ;251: G176-G180.
- Lee FY, Albillos A, Colombato LA, Groszmann RJ. The role of nitric oxide in the vascular hyporesponsiveness to methoxamine in portal hypertensive rats. Hepatology 1992; 16: 1043-1048.
- Lee FY, Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. N^w-nitro-L-arginine administration corrects peripheral vasodilation and systemic capillary hypotension and ameliorates plasma volume expansion and sodium retention in portal hypertensive rats. Hepatology 1993; 17: 84-90.
- Lee S, Pak JM, Medlicott SM, Bomzon A. Vasodilatory responses of isolated arteries of cirrhotic rats. Clin Sci 1995a; 89: 227-232.
- Lee FY, Wang SS, Yang MCM y cols. Peripheral endotoxemia and hyperdynamic circulation of rats with extrahepatic or intrahepatic portal hypertension. Hepatology 1995b; 22: 257A.
- Lee FY, Wang SS, Tsai YT, Lin HJ, Lin HC, Chu CJ, Wu SL, Tai CC, Lee SD. Aminoguanidine corrects hyperdynamic circulation without ameliorating portal hypertension and portal hypertensive gastropathy in anesthetized portal hypertensive rats. J Hepatol 1997; 26: 687-693.
- Leehey DJ, Uckerman MT, Rahman MA. Role of prostaglandins and thromboxane in the control of renal hemodynamics in experimental liver cirrhosis. J Lab Clin Med 1989; 113: 309-315.
- Leehey DJ. Dissociation between pressor sensitivity *in vivo* and contractile reactivity *in vitro* to angiotensin II in rats with experimental cirrhosis. Clin Sci 1993; 84: 525-529.
- Leivas A, Jiménez W, Lamas S, Bosch MM, Oriola J, Clària J, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Endothelin-1 does not play a major role in the homeostasis of arterial pressure in cirrhotic rats with ascites. Gastroenterology 1995; 108 (6): 1842-1848.

- Lerman LO, Taler SJ, Textor SC, Sheedy PF, Stanson AW, Romero JC. Computed tomography-derived intrarenal blood flow in renovascular and essential hypertension. Kidney Int 1996; 49: 846-854.
- Levy M, Allotey JBK. Temporal relationship between urinary salt retention and altered systemic hemodynamics in dogs with experimental cirrhosis. J Lab Clin Med 1978; 92: 560-569.
- Levy M. Pathogenesis of sodium retention in early cirrhosis of the liver: Evidence for vascular overfilling. Semin Liver Dis 1994; 14: 4-13.
- Liao JF, Yu PC, Lin HC, Lee FY, Kuo JS, Yang MCM. Study on the vascular reactivity and α_1 -adrenoceptors of portal hypertensive rats. Br J Pharmacol 1994; 111: 439-444.
- Lieberman FL, Denison EK, Reynolds TB. The relationship of plasma volume, portal hypertension, ascites, and renal sodium and water retention in cirrhosis: the overflow theory of ascites formation. Ann NY Acad Sci 1970; 170: 202-206.
- López C, Jiménez W, Arroyo V, La Villa G, Gaya J, Clària J, Rivera F, Rodés J. Role of altered systemic hemodynamics in the blunted renal response to atrial natriuretic peptide in rats with cirrhosis and ascites. J Hepatol 1989; 9: 217-226.
- López-Novoa JM, Navarro V, Rodicio JL, Hernando L. Cirrosis experimental de instauración rápida. Cronología de lesiones hepáticas. Patología 1976; IX: 233-240.
- López-Novoa JM, Rengel M, Hernando L. Dynamics of ascites formation in rats with experimental cirrhosis. Am J Physiol 1980; 238: 353-357.
- López-Novoa JM, Santos JC, Caramelo C, Fernández-Muñoz D, Blanchart A, Hernando L. Mechanisms of the impaired diuretic and natriuretic responses to a sustained and moderate saline infusion in rats with experimental cirrhosis. Hepatology 1984; 4, 419-423.
- López-Novoa JM. Pathophysiological features of the carbon tetrachloride/phenobarbital model of experimental liver cirrhosis in rats. En "The kidney in liver disease", M Epstein, ed., 3^a ed., Williams & Wilkins, Inc., Baltimore, 309-327, 1988.
- Lüscher TF, Oemar BS, Boulanger CM, Hahn AWA. Molecular and cellular biology of endothelin and its receptor. J Hypertens 1993a; 11: 7-11.
- Martin PY, Xu DL, Niederberger M, Weigert A, Tsai P, John JST, Ginès P, Schrier RW. Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. Am J Physiol 1996a; 39: F494-F499.
- Martin PY, Ohara M, Ginès P, Xu DL, St John J, Schrier RW. Normalization of nitric oxide production increases sodium excretion in cirrhotic rats with ascites. (abstract) J Am Soc Nephrol 1996b; 7: 1568.

- Martin PY, Schrier RW. Pathogenesis of water and sodium retention in cirrhosis. Kidney Int 1997; 51 (Supl. 59): S43-S49.
- Mathie RT, Ravelic M, Moore KP, Burnstock G. Mesenteric vasodilator responses in cirrhotic rats: A role for nitric oxide?. Hepatology 1996; 23: 130-136.
- McLean EK, McLean AEM, Sattton PM. Instant cirrhosis, an improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of CCl₄ and fenobarbitone. Br Exp Path 1969; 50: 502-506.
- Michielsen PP, Boeckxstaens GE, Sys SU, Herman AG, Pelckmans PA. The role of increased nitric oxide in the vascular hyporeactivity to noradrenaline in long-term portal vein ligated rats. J Hepatol 1995; 23: 341-347.
- Misko TP, Moore WM, Kasten TP y cols. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. Eur J Pharmacol 1993; 233: 119-125.
- Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, Kone BC. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. Kidney Int 1994; 46: 653-665.
- Moore K. The hepatorenal syndrome. Clin Sci 1997; 92: 433-443.
- Morales-Ruiz M, Jiménez W, Pérez-Sala D, Ros J, Leivas A, Lamas S, Rivera F, Rodés J. Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. Hepatology 1996; 24: 1481-1486.
- Morales-Ruiz M, Jiménez W, Ros J, Solé M, Leivas A, Bosch-Marcé M, Rivera F, Arroyo V, Rodés J. Nitric oxide production by peritoneal macrophages of cirrhotic rats: A host response against bacterial peritonitis. Gastroenterology 1997; 112: 2056-2064.
- Moreau R, Komeichi H, Cailmail S, Lebrec D. Blockade of ATP-sensitive potassium channels by glibenclamide reduces portal pressure and hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats. J Hepatol 1992; 16: 215-218.
- Moreau R, Komeichi H, Kirstetter P, Ohsuga M, Cailmail S, Lebrec D. Altered control of vascular tone by adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in rats with cirrhosis. Gastroenterology 1994; 106: 1016-1023.
- Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. Am J Physiol 1994; 266: E829-E839.
- Morrisey JJ, McCracken R, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D, Klahr S. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. Kidney Int 1994; 45: 998-1005.
- Murray BM, Paller MS. Decreased pressor reactivity to angiotensin II in cirrhotic rats. Evidence for a post-receptor defect in angiotensin action. Circ Res 1985; 57: 424-431.

- Murray BM, Paller MS. Pressor resistance to vasopressin in sodium repletion, potassium depletion and cirrhosis. Am J Physiol 1986; 251: R525-R530.
- Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to N^G-nitro-L-arginine in rats. Am J Physiol 1992; 263: H1090-H1094.
- Niederberger M, Martin PY, Ginès P, Morris K, Tsai P, Xu DL, Mcmurtry I, Schrier RW. Normalization of nitric oxide production corrects arterial vasodilation and hyperdynamic circulation in cirrhotic rats. Gastroenterology 1995a; 109: 1624-1630.
- Niederberger M, Ginès P, Tsai P, Martin PY, Morris K, Weigert A, Mcmurtry I, Schrier RW. 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 1995b; 21: 1625-1631.
- Niederberger M, Ginès P, Martin PY, Tsai P, Morris K, Mcmurtry I, Schrier RW. Comparison of vascular nitric oxide production and systemic hemodynamics in cirrhosis versus prehepatic portal hypertension in rats. Hepatology 1996; 24: 947-951.
- Obbergh LV, Leonard V, Chen H, Xu D, Blaise G. The endothelial and non-endothelial mechanism responsible for attenuated vasoconstriction in cirrhotic rats. Exp Physiol 1995; 80: 609-617.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987; 327: 524-526.
- Pérez-Ayuso RM, Arroyo V, Camps J, Rimola A, Gaya J, Costa J, Rivera F y cols. Evidence that renal prostaglandins are involved in renal water metabolism in cirrhosis. Kidney Int 1984a; 26: 72-80.
- Pérez-Ayuso RM, Arroyo V, Camps J, Rimola A, Costa J, Gaya J, Rivera F y Rodés J. Renal kallikrein excretion in cirrhotics with ascites: Relationship to renal hemodynamics. Hepatology 1984b; 4 (2): 247-252.
- Pinter CG, Gärtner K. Peritubular capillary, interstitium, and lymph of renal cortex. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1984; 99: 183-202.
- Pizcueta MP, Casamitjana R, Bosch J, Rodés J. Decreased systemic vascular sensitivity to norepinephrine in portal hypertensive rats: role of hyperglucagonism. Am J Physiol 1990; 258: G191-G195.
- Pizcueta MP, Piqué JM, Bosch J, Moncada S. Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. Br J Pharmacol 1992a; 105: 184-190.

- Pizcueta MP, Piqué JM, Fernández M y cols. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. Gastroenterology 1992b; 103: 1909-1915.
- Planas Vilá R, Quer Boniquet JC. Cirrosis hepática, Enfermedad de Wilson y Hemocromatosis. Medicine 1992; 8: 354-363.
- Preedy VR, Hammond B. An investigation into the effects of aminoguanidine treatment on the plasma and blood of free-fed and dietary-restricted rats. J Pharm Pharmacol 1991; 43: 337-341.
- Rabelink AJ, Kaasjager KAH, Boer P y cols. Effects of endothelin-1 on renal function in humans: Implications for physiology and pathophysiology. Kidney Int 1994; 46: 376-381.
- Ralevic V, Mathie RT, Moore KP, Burnstock G. Vasoconstriction responsiveness of the rat mesenteric arterial bed in cirrhosis. Br J Pharmacol 1996; 118: 435-441.
- Raij L. Nitric oxide and the kidney. Circulation 1993; 87 (Supl. V): 26-29.
- Ramírez AM, Atucha NM, Quesada T, Pérez MC, López-Ayera B, Martínez C, Sánchez A, García-Estañ J. Efectos de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico en la hemodinámica y excreción renal de ratas con cirrosis biliar. Nefrología 1994; XV (6): 656-662.
- Ramírez AM. Participación del óxido nítrico en la cirrosis biliar experimental. Tesis doctoral 1995, Universidad de Murcia.
- Rimola A, Gavaler J, Schade RR, Et-Lankary S, Starzl TE, Van Thiel DH. Effects of renal impairment on liver transplantation. Gastroenterology 1987; 93: 148-156.
- Ritman EL, Jorgensen SM, Lund PE, Thomas PJ, Dunszmuir JH, Romero JC, Turner RT, Bolander ME. Synchrotron-based micro-CT of in situ biological basic functional units and their integration. Proc of SPIE, San Diego, CA, 27 de Julio-1 de Agosto, 1997.
- Robb RA, Hanson DP. A software system for interactive and quantitative visualization of multidimensional biomedical images. Aust Phys Ing Sci Med 1991; 14: 9-30.
- Rockey DC, Chung JJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide during hepatic injury and fibrogenesis. Am J Physiol 1997; 273: G124-G130.
- Romero JC, Lahera V, Salom MG, Biondi ML. Role of endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. J Am Soc Nephrol 1992; 2: 1371-1387.
- Romero JC, García-Estañ J, Atucha NM. Nitric Oxide and renal function: The control of blood pressure under normal conditions and during cirrhosis. En "The kidney in liver disease", M Epstein, ed., 4ª ed., Hanley & Belfus, Inc., Philadelphia, 373-385, 1996.
- Ros J, Jimenez W, Lamas S, Clária J, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. Hepatology 1995a; 21: 554-560.

- Ros J, Clària J, Jimenez W, Bosch-Marce M, Angeli P, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Role of nitric oxide and prostacyclin in the control of renal perfusion in experimental cirrhosis. Hepatology 1995b; 22: 915-920.
- Ryan J, Jennings G, Dudley F, Chin-Dusting J. Smooth muscle-derived nitric oxide is elevated in isolated forearm veins in human alcoholic cirrhosis. Clin Sci 1996; 91: 23-28.
- Sacerdoti D, Merlo A, Merkerl C, Zuin R, Gatta A. redistribution of renal blood flow in patients with liver cirrhosis. The role of PGE₂. J Hepatol 1986; 2: 253-261.
- Safka V, Moreau R, Gadano A, Lebrec D. Vascular hyporesponsiveness to vasodilators in rats with cirrhosis. J Hepatol 1997; 26: 382-386.
- Salerno F, Badalamenti S, Incerti P y cols. Renal response to atrial natriuretic peptide in patients with advanced liver cirrhosis. Hepatology 1988; 8: 21-26.
- Saló J, Clària J, Ginès A, Jiménez W, Rivera F y cols. Evidence for an antinatriuretic mechanism(s) other than the renin-aldosterone and the sympathetic nervous system in cirrhosis with ascites (Abstract). J Hepatol 1993; 18: S61.
- Saló J, Ginès A, Anibarro L, Jiménez W, Clària J, Ginès P, Rivera F y cols. Effect of upright posture and physical exercise on endogenous neurohormonal system in cirrhotic patients with sodium retention and normal supine plasma renin, aldosterone and norepinephrine levels. Hepatology 1995; 22: 479-487.
- Saló J, Ginès A, Quer JC, Fernández-Esparrach G, Guevara M, Ginès P, Ballater R, Planas R, Jiménez W, Arroyo V, Rodés J. Renal and neurohormonal changes following simultaneous administration of systemic vasoconstrictor and dopamine or protacyclin patients with hepatorenal syndrome. J Hepatol 1996; 25: 916-923.
- Salom MG, Lahera V, Romero JC. Role of prostaglandins and endothelium-derived relaxing factor on the renal response to acetylcholine. Am J Physiol 1991; 260: F145-F149.
- Saura M, Lamas S. Regulación de la óxido nítrico sintetasa inducible glomerular. Nefrología 1995; XV (5): 411-419.
- Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J. Peripheral arteriolar vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. Hepatology 1988; 8: 1151-1157.
- Schrier RW, Niederberger M, Weigert A y Ginés P. Peripheral arterial vasodilation: Determinant of functional spectrum of cirrhosis. Semin Liver Dis 1994; 14: 14-21.
- Sieber CC y Groszmann RJ. Nitric oxide mediates hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. Gastroenterology 1992;103: 235-239.

- Sieber CC, Lee FY, Groszmann RJ. Long-term octreotide treatment prevents vascular hyporeactivity in portal-hypertensive rats. Hepatology 1996; 23: 1218-1223.
- Sikuler E, Krabetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. Am J Physiol 1985; 248: G618-G625.
- Sikuler E, Buchs AE, Yaari A, Keynan A. Hemodynamic characterization of conscious and ketamine-anesthetized bile duct-ligated rats. Am J Physiol 1991; 260: G161-G166.
- Sitzman JV, Li SS, Adkinson F. Evidence for role of prostacyclin as a systemic hormone in portal hypertension. Surgery 1991; 109: 149-153.
- Smith REA, Mcpeake JR, Gimson AES, Williams R, Martin JF, Moncada S. Nitric oxide and the haemodynamic changes in hepatic failure. Endothelium 1993; Supl. 1: S90, abstract.
- Sogni P, Moreau R, Ohsuga M, Cailmail S, Oberti F, Hadengue A, Pussard E, Lebrec D. Evidence for normal nitric oxide-mediated vasodilator tone in conscious rats with cirrhosis. Hepatology 1992; 16: 980-983.
- Sogni P, Moreau R, Gadano A, Lebrec D. The role of nitric oxide in the hyperdynamic circulatory syndrome associated with portal hypertension. J Hepatol 1995; 23: 218-224.
- Sogni P, Smith APL, Gadano A, Lebrec D, Higenbottam TW. Induction of nitric oxide synthase II does not account for excess vascular nitric oxide production in experimental cirrhosis. J Hepatol 1997; 26: 1120-1127.
- Solomon R, Azar P, Trebbin W, Weinberg MS. The kallikrein-kininogen-kinin system in patients with liver disease and ascites. Nephron. 1988; 50: 39-44.
- Southan GJ, Csaba Szabó. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. Biochem Pharmacol 1996; 51: 383-394.
- Sugano S. Endotoxin levels in cirrhotic rats with sterile and infected ascites. Gastroenterol Jpn 1992; 27: 348-353.
- Tojo A, Gross SS, Zhang L y cols. Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. J Am Soc Nephrol 1994; 4: 1438-1447.
- Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, Hata I, Hata K, Yamamoto K, Ishii Y, Muramatsu I, Sudo M. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. Am J Physiol 1996; 270: E840-E845.
- Ubeda M, Matzilevich MM, Atucha NM, García-Estañ J, Quesada T, Tang S-S, Ingelfinger JR. Renin and angiotensinogen mRNA expression in the kidneys of rats subjected to long-term bile duct ligation. Hepatology 1994; 19: 1431-1436.

- Uchiarra M, Izumi N, Sato C, Marumo F. Clinical significance of elevated plasma endothelin concentration in patients with cirrhosis. Hepatology 1992; 16: 95-99.
- Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander WR, Nerem RM, Harrison DJ. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. Am J Physiol 1995; 269: C1371-C1378.
- Vallance P, Moncada S . Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide?. Lancet 1991; 337: 776-778.
- Villamediana LM, Dieguez G, Santos JC, García-Villalón AL, Caramelo C, López-Novoa JM. Vascular reactivity to norepinephrine in rats with cirrhosis of the liver. Can J Physiol Pharmacol 1988; 66: 567-572.
- Waugh WH, Beall PT. Simplified measurement of p-aminohippurate and another arylamines in plasma and urine. Kidney Int 1974; 5: 429-436.
- Weigert AL, Martin P-Y, Niederberger M, Higa EMS, McMurtry IF, Gines P, Schrier RW. Endothelium-dependent vascular hyporesponsiveness without detection of nitric oxide synthase induction in aortas of cirrhotic rats. Hepatology 1995; 22: 1856-1862.
- Weigert AL, Martin P-Y, Schrier RW. Vascular hyporesponsiveness in cirrhotic rats: Role of different nitric oxide synthase isoforms. Kidney Int 1997; 52 (Supl. 61): S41-S44.
- Witte MH, Witte CL, Dumont AE. Progress in liver disease: Physiological factors involved in the causation of cirrhotic ascites. Gastroenterology 1971; 61: 742-750.
- Witte CL, Witte MH, Dumont AE. Lymph imbalance in the genesis and perpetuation of the ascites syndrome in hepatic cirrhosis. Gastroenterology 1980; 78: 1059-1068.
- Wolff DJ, Lubeskie A. Aminoguanidine is a isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. Arch Biochem Biophys 1995; 316: 290-301.
- Wong F, Blendis L. Pathophysiology of sodium retention and ascites formation in cirrhosis: role of atrial natriuretic factor. Semin Liver Dis 1994; 14 (1): 44-58.
- Wu CC, Chen SJ, Yen MH. Different responses to acetylcholine in the presence of nitric oxide inhibitor in rat aortae and mesenteric arteries. Clin Exp Pharmacol Physiol 1993; 20: 405-412.
- Wu Z, Benoit JN. Nonreceptor-mediated intestinal vasoconstriction in portal hypertensive rats. Am J Physiol 1994; 267: H370-H375.
- Wu CC, Chen SJ, Szabó C, Thiemermann C, Vane JR. Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of endotoxic shock. Br J Pharmacol 1995; 114: 1666-1672.

-Xiping N, Cheng Y, Cao L, Gardner DG, Humphreys MH. Mechanisms contributing to renal resistance to atrial natriuretic peptide in rats with common bile-duct ligation. J Am Soc Nephrol 1996; 7: 2110-2118.

-Zambraski E. Effects of acute renal denervation on sodium excretion in miniature swine with cirrhosis and ascites. Physiologist 1985; 28:268.

-Zimmermann H, Reichen J, Zimmermann A, Sagesser H, Thenisch B, Hoflin F. Reversibility of secondary biliary cirrhosis by biliodigestive anastomosis in the rat. Gastroenterology 1992; 103: 579-589.