

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**" LOS AUMENTOS EN LA PRESION DEL PULSO OBTENIDOS
POR EL ÉSTER METILO DE N^G-NITRO-L-ARGININA DEPENDEN
DE LA INHIBICION DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL
ENDOTELIO DE LA GRANDES ARTERIAS."**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN
INVESTIGACION EN MEDICINA PRESENTA:**

ANTONIO RUIZ RIVERA

MEXICO, D.F., ENERO DE 2008



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 11 de enero de 2008, el que suscribe **ANTONIO RUIZ RIVERA** alumno del Programa de Doctorado en Investigación en Medicina con número de registro **A030500**, adscrito a la Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **DR. ENRIQUE FERNANDO CASTILLO HENKEL** y de la **DRA. RUTH MERY LÓPEZ MAYORGA**, cede los derechos del trabajo intitulado “**LOS AUMENTOS DE LA PRESIÓN DEL PULSO OBTENIDOS POR EL ÉSTER METILO DE N^o-NITRO-L-ARGININA DEPENDEN DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL ENDOTELIO DE LAS GRANDES ARTERIAS**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección arr_doc66@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. en C. Antonio Ruiz Rivera



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 14:30 horas del día 11 del mes de ENERO del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis de grado titulada:

“LOS AUMENTOS DE LA PRESIÓN DEL PULSO OBTENIDOS POR EL ÉSTER METILO DE N^o-NITRO- L-ARGININA DEPENDEN DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL ENDOTELIO DE LAS GRANDES ARTERIAS”

Presentada por el alumno:

 RUIZ

Apellido paterno

 RIVERA

 ANTONIO

nombre(s)

Con registro:

A	0	3	0	5	0	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

 DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DR. CARLOS CASTILLO HENKEL

PRESIDENTE DEL JURADO

DR. GUILLERMO MANUEL CEBALLOS REYES

SECRETARIO DEL JURADO

DR. ENRIQUE FERNANDO CASTILLO HENKEL

1ER. VOCAL DEL JURADO

DRA. RUTH MERY LÓPEZ MAYORGA

2DO. VOCAL DEL JURADO

DRA. GUADALUPE CLEVA VILLANUEVA LÓPEZ

3ER. VOCAL DEL JURADO

DRA. ROSA AMALIA BOBADILLA LUGO

VOCAL SUPLENTE

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

 M. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
IPN
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO MULTIDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN DE LA SECCIÓN DE POSGRADO DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, BAJO LA DIRECCION DEL DR: ENRIQUE F. CASTILLO HENKEL Y LA DRA. RUTH MERY LOPEZ MAYORGA.

Indice:	pagina.
Glosario.....	.1
Resumen.....	.3
Abstract.....	.5
Introducción.....	.7
El óxido nítrico.....	.7
El óxido nítrico y el tono vascular.....	.9
Las sintasas de óxido nítrico en el tejido vascular.....	.11
La estimulación de la síntesis de óxido nítrico por la sintasa endotelial.....	.12
La activación de la guanilil ciclasa soluble por el óxido nítrico.....	.13
El ON participa en la regulación coordinada del flujo sanguíneo.....	.15
Dilatación por metabolitos.....	.16
Dilatación conducida y dilatación dependiente de flujo.....	.17
Mecanismos constrictores y liberación de óxido nítrico.20
Hiperemia reactiva.....	.21
Hiperemia activa.25
Autorregulación de los vasos sanguíneos de resistencia.....	.27
El óxido nítrico en relación con la hipertensión arterial.....	.31
Justificación... ..	.36
Hipótesis.....	.39
Objetivo General.40
Objetivos particulares.....	.40
Material y Métodos.....	.41
Preparación de las ratas descerebradas y desmeduladas.....	.41
Protocolo experimental.42
Presentación y análisis de datos.42
Drogas:.....	.43
Resultados.....	.44
Discusión.....	.63
Conclusión.....	.69
Referencias.....	.70

Glosario:

AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Acido ribonucleíco mensajero
AR- α_1	Receptores adrenérgicos α_1
AR- β	Receptores adrenérgicos β
ATP	Adenosín trifosfato
BH4	5,6,7,8-Tetrahidrobiopterina
BK	Canales de K ⁺ de alta conductancia activados por Ca ²⁺
CaM	Calmodulina
[Ca ²⁺] _i	Concentración del Ca ²⁺ libre intracelular para su activación
DAG	Diacilglicerol
FAD	Flavin adenosín dinucleótido
FHDE	Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio
FMN	Flavín mononucleótido
GDP	Guanosín difosfato
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GCs	Guanilil ciclasa soluble
GTP	Guanosín trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HSP90	Proteína de choque por calor de 90-kDa
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
L-NAME	éster metilo de la N ^G -nitro-L-arginina
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina (L-NMMA)
L-NNA	N ^G -nitro-L-arginina
L-NA	N ^G -nitro-L-arginina
MLCK	Cinasa de las cadenas ligeras de miosina
MLCP	Fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina
MLV	Músculo liso vascular
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
ON	Oxido nítrico
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Anión superóxido

PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa G
PL A2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
STOC	Corrientes salientes espontáneas transitorias
SR	Retículo sarcoplásmico
RyR	Receptores a ryanodina
SON	Sintasa del óxido nítrico
SONi	Sintasa inducible del ON
SONe	Sintasa endotelial del ON
SONn	Sintasa neuronal del ON

Resumen.

El objetivo de este estudio fue examinar si el efecto del inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, éster metilo de N^G-nitro-L-arginina (L-NAME), en la presión sanguínea depende del tono vascular periférico. Los efectos del L-NAME (10 mg.kg⁻¹, i.v.) sobre la presión arterial diastólica (PAD), presión arterial sistólica (PAS), presión del pulso (PP), y frecuencia cardíaca (FC) fueron estudiados en ratas descerebradas y desmeduladas (des). Las ratas SAL-des recibieron 0.9 % NaCl, 10 µl.kg⁻¹.min⁻¹. El tono vascular fue incrementado de forma escalonada con fenilefrina instilada por vía intravenosa 3, 10 y 30 µg.kg⁻¹.min⁻¹ (grupos de ratas: BFEN-des, MFEN-des, y AFEN-des, respectivamente). El L-NAME ocasionó respuestas vasopresoras en todos los animales estudiados. Los incrementos en la PAD y la PAS producidos por el L-NAME en las ratas SAL-des, fueron significativamente menores que aquellos obtenidos en las ratas instiladas con fenilefrina. Los aumentos en la PAD inducidos por el L-NAME fueron más grandes en las ratas BFEN-des comparados con los obtenidos en las ratas MFEN-des y AFEN-des (es decir, los incrementos escalonados de la PAD obtenidos con la fenilefrina, se relacionaron de manera inversa con los aumentos en la PAD ocasionados por el L-NAME); sin embargo, los incrementos en la PAS fueron similares entre estos tres grupos experimentales. La PP aumentó durante las respuestas presoras inducidas por el L-NAME en las ratas instiladas con fenilefrina. Los incrementos producidos por el L-NAME en la PP mostraron el siguiente orden en los grupos de ratas: SAL-des < BFEN-des < MFEN-des ≤ AFEN-des. La FC no fue modificada por el L-NAME. En conclusión, las respuestas vasopresoras producidas por el L-NAME en las ratas desmeduladas son influenciadas por el tono vasomotor preexistente de manera compleja. No se encontró una simple correlación positiva entre el tono vascular o el nivel de presión arterial, y la magnitud de respuestas presoras diastólicas y sistólicas inducidas por el L-NAME. Interesantemente, el incremento en la PP ocasionado por el L-NAME fue mayor en concordancia con el valor incrementado de la presión arterial de

base. La inhibición de la síntesis de ON en el endotelio arterial puede explicar el incremento de la PP causado por el L-NAME, como el resultado de la reducción de la distensibilidad de las arterias proximales de conducción.

Abstract

The objective of this study was to re-examine whether the effect of the nitric oxide synthesis inhibitor, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), on blood pressure depends on peripheral vascular tone. The effects of L-NAME (10 mg.kg⁻¹, i.v.) on diastolic blood pressure (DBP), systolic blood pressure (SBP), pulse pressure (PP), and heart rate (HR) were studied in pithed rats. Sal-pithed rats received 0.9 % NaCl, 10 μl.kg⁻¹.min⁻¹. Vascular tone was step-wise increased with 3, 10 and 30 μg.kg⁻¹.min⁻¹ intravenous phenylephrine infusion (LPhe-pithed, MPhe-pithed, and HPhe-pithed rats, respectively). L-NAME elicited vasopressor responses in all the studied animals. L-NAME increases in SBP and DBP in Sal-pithed rats, were significantly smaller than the ones obtained in phenylephrine infused rats. The increases in DBP elicited by L-NAME were greater in LPhe-pithed rats compared with those of MPhe-pithed and HPhe-pithed rats (i.e., the step-wise raises of DBP obtained with phenylephrine were inversely related to the increases in DBP produced by L-NAME); however, the increases of SBP were similar between these experimental groups. The PP increased during L-NAME-induced pressor responses in phenylephrine infused rats. L-NAME increases of PP showed the following order: Sal-pithed < LPhe-pithed < MPhe-pithed ≤ HPhe-pithed rats. HR was not modified by L-NAME. In conclusion, the vasopressor responses produced by L-NAME in pithed rats are influenced by the preexisting vasomotor tone in complex form. We did not find a simple positive correlation between the vascular tone or level of arterial pressure, and the magnitude of the diastolic and systolic pressor responses elicited by L-NAME. Interestingly, the increase

in PP induced by L-NAME was greater in accordance with the increasing value of baseline arterial pressure. NO synthesis inhibition in the arterial endothelium may possibly explain the increase of PP caused by L-NAME, as resulting from the reduction of proximal conduit artery compliance.

Introducción.

El descubrimiento de la importancia del endotelio en la regulación del tono vascular ha sido la clave para entender como las fuerzas hemodinámicas influyen la resistencia vascular local y, consecuentemente, la perfusión tisular. Las fuerzas hemodinámicas regulan activamente el tono del músculo liso vascular mediante diferentes mecanismos. Fundamental entre ellos, es la dilatación dependiente del flujo mediada principalmente por el óxido nítrico (ON) liberado por el endotelio. La liberación de ON dependiente del estrés por fricción del flujo contribuye a la eficiencia hidráulica de la circulación y, factiblemente, optimiza la perfusión de los tejidos al interactuar coordinadamente con los mecanismos de control miogénico y metabólico.

El óxido nítrico.

Desde el reporte inicial del factor relajante derivado de endotelio por Furchgott y Zawadski (1980) y su ulterior identificación como ON (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987), se han obtenido notables avances en el entendimiento de la síntesis, liberación, acciones moleculares y efectos biológicos de este extraordinario radical. El gas ON, o monóxido de oxígeno, tiene una vida media muy breve (menor que 6 segundos); se oxida espontáneamente dando como productos terminales nitrito y nitrato (Ignarro, 1990). Es inactivado por el anión superóxido (O_2^-) (Gryglewski et al., 1986) y por la hemoglobina (Martin et al., 1986). (Un producto normal del metabolismo aeróbico es la generación de intermediarios reactivos por la reducción de oxígeno molecular. Estos incluyen al anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.)

Las enzimas que sintetizan óxido nítrico (sintasas de óxido nítrico, SON) son un mínimo de tres isoformas, dos constitutivas y una inducible. Las primeras, isoforma I o neuronal (SONn) e isoforma III o endotelial (SONe), son reguladas por el complejo formado por Ca^{2+} y calmodulina

(CaM) y expresadas de forma cardinal en el sistema nervioso (Bredt et al., 1990, 1991; Lowenstein y Snyder, 1992) y en las células del endotelio vascular, respectivamente (Sessa et al., 1992; Nishida et al., 1992). La isoforma II o sintasa inducible (SONi) es independiente de Ca^{2+} y ha sido aislada de una gran variedad de células después de su inducción con mediadores inflamatorios (Lyons et al., 1992; Busse y Mulsch, 1990; Charles et al., 1993). Las tres isoformas tienen un sitio de enlazamiento para la proteína fijadora de calcio, calmodulina (CaM), el cual permite regular el flujo electrónico a través de la enzima (Abu-Soud y Stuehr, 1993). Las enzimas constitutivas no contienen CaM enlazada, pero en presencia de Ca^{2+} la asociación ocurre con alta afinidad, resultando en la activación de la enzima. De esta manera, *in vivo*, las formas constitutivas de la SON requieren del incremento en la concentración del Ca^{2+} libre intracelular para su activación ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). En cambio, la actividad de SONi es independiente de calcio, probablemente porque tiene a la CaM estrechamente enlazada (Katusic y Cosentino, 1994). En su proceso enzimático, las tres isoformas favorecen la oxidación de un nitrógeno guanidino de la L-arginina para producir ON y citrulina; utilizan O_2 y NADPH como cosustratos, y requieren de los cofactores FAD, FMN, y tetrahidrobiopterina (BH_4) para transferir electrones (Bredt et al., 1991; Dinermann et al., 1993; Marletta, 1993; Djordjevic et al., 1995; Forstermann et al., 1995; Scott-Burden et al., 1994).

Cada isoforma de la SON es codificada por un gen distinto que comprende ya sea 26 exones para la SONi y la SONE, y 29 exones para la SONn (Nathan, 1992; Knowles y Moncada, 1994). La evidencia reciente sugiere que la expresión de la SONn es regulada por ensamblaje alternativo, lo cual permite varias transcripciones del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y de proteínas con diferentes características enzimáticas (Brenman et al., 1997); sin embargo, el significado funcional de estas proteínas tiene todavía que ser elucidado.

Poco tiempo después del descubrimiento del ON como una molécula reguladora de la actividad del músculo liso vascular, se desarrollaron fármacos análogos estructurales de la L-arginina que son inhibidores de la SON (Palmer et al., 1988). El extensivo uso experimental de estos análogos, ha permitido establecer la participación del ON en una variedad de efectos biológicos específicos. Los fármacos análogos estructurales de la L-arginina, en particular aquellos en los cuales ha sido substituido uno de los nitrógenos terminales del grupo guanidino de la L-arginina, como la N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), la N^G-nitro-L-arginina (L-NNA) y el éster metilo de la N^G-nitro-L-arginina (L-NAME), se comportan como inhibidores selectivos de la SON (Rees et al., 1990). Estos fármacos han sido usados para identificar las acciones fisiológicas del ON y para investigar su papel en procesos fisiopatológicos (Moncada et al., 1989).

El óxido nítrico y el tono vascular.

La producción basal de ON es importante en la regulación del tono vasomotor y la presión arterial. El ON de origen endotelial difunde hasta las células del músculo liso vascular y las relaja, principalmente por estimular la enzima citosólica, guanilil ciclase soluble, la cual produce a partir de GTP al segundo mensajero 3'-5'-guanosín monofosfato cíclico (GMPc) (Schmidt et al., 1993). La inhibición de la producción de ON por el tratamiento con un inhibidor de la SON, por ejemplo, la N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), causa vasoconstricción (Vallance et al., 1989) y una respuesta presora (Johnson y Freeman, 1992). Esta observación indica que los vasos de resistencia están fisiológicamente en un estado de tono vasodilatador activo, por el cual el ON es responsable. Además, en el músculo liso vascular el ON inhibe la mitogénesis y la proliferación celular (Garg y Hassid, 1989). Por otra parte, el ON no solamente es liberado hacia el músculo liso que subyace al endotelio, también es vertido en la luz del vaso sanguíneo. Así, en la interfaz entre la sangre y la pared vascular, el ON inhibe la adhesión de plaquetas y leucocitos al endotelio (Cooke y Tsao, 1994; Vanhoutte, 2003).

Un estímulo fisiológico para la producción de ON es el estrés por fricción de la sangre que fluye por las células endoteliales. Schretzenmayr (1933) fue el primero en describir aumentos en el diámetro dependientes del flujo en la arteria femoral del perro. El aporte revolucionario fue, sin embargo, el de Furchgott y Zawadski (1980), quienes descubrieron la importancia del endotelio en la regulación del tono vascular. A partir de este hallazgo, se ha hecho mucho énfasis en el estudio de la influencia de las fuerzas hemodinámicas sobre la resistencia vascular. Al respecto, algunos datos relevantes son los siguientes. Rubanyi et al. (1986) observaron que la concentración de ON liberado por el endotelio en la arteria femoral canina perfundida, aumenta con la velocidad del flujo de la solución fisiológica. El mismo mecanismo fue considerado responsable de la dilatación de la arteria coronaria del conejo, que ocurre en respuesta al aumento del flujo (Lamontagne et al., 1992). Por otra parte, el ON liberado por las células endoteliales cultivadas refleja la tasa de fricción del líquido fluyendo por ellas (Bugá et al., 1991; Cooke et al., 1990). El ejercicio, con su prolongado aumento en el estrés por fricción, conduce al acrecentamiento en la liberación de ON. Así, la liberación de ON producida por la acetilcolina aumentó en las arterias coronarias grandes y en los microvasos de los corazones de los perros ejercitados, comparados con los valores correspondientes de los perros controles (Sessa et al., 1994). Además, los niveles estables del ARNm de la SONE se encontraron elevados en los perros ejercitados (Sessa et al., 1994). Los datos sugieren que por incrementar el estrés por fricción endotelial durante un período de ejercicio, la expresión aumentada del gen de la SON puede contribuir a los efectos benéficos (i.e., antihipertensivos) del ejercicio en el sistema cardiovascular. En el terreno fisiopatológico, recientemente fue reportado que el ejercicio atenúa el deterioro de la relajación dependiente del endotelio ocasionado por la hipercolesterolemia en arterias coronarias porcinas; la preservación de la relajación dependiente del endotelio durante el desarrollo de hipercolesterolemia, fue atribuida al aumento de la expresión de la SON y, en concordancia, a un aumento en la liberación y actividad del ON (Woodman et al., 2004).

Las sintasas de óxido nítrico en el tejido vascular.

Las isoformas de la SON pueden encontrarse expresadas en tres diferentes tipos celulares de la pared arterial. En el endotelio, la función de la SON es considerada primordial en la regulación del tono arterial. En consecuencia, en experimentos *in vivo*, la desactivación de la SONE por los análogos de la L-arginina, produce un potente efecto vasopresor, y la remoción de las células endoteliales vasculares, en experimentos *in vitro*, inhibe la producción basal de ON (Moncada et al.;1991). La medición de los niveles de ON mediante un sensible microsensor porfirínico, ha permitido establecer que las células endoteliales producen ON en respuesta a agonistas endógenos, a lo cual sigue una elevación de los niveles de ON en el músculo liso vascular subyacente (Malinski y Taha, 1992; Malinski et al., 1993). La SONE libera picomoles de ON en respuesta a la estimulación de las células endoteliales con agonistas como la bradicinina, la acetilcolina, el ionóforo de calcio A23187, y el ATP (Moncada et al., 1991; Malinski y Taha, 1992; Toda y Okamura, 1989, 1991; Ignarro et al., 1990; Nozaki et al., 1993). La resultante relajación dependiente del endotelio vascular, ha sido mostrada en tejidos arteriales y venosos de diversos animales, incluyendo a los humanos (Furchgott y Zawadzki, 1980; Thom et al., 1985; Lüscher et al., 1988). La relajación parece ser mayor en las arterias que en las venas, y esta diferencia puede explicarse por una mayor eficiencia de la vía L-arginina/ON en las primeras (Lüscher et al., 1988).

Hay evidencia de que la SONn (isoforma I), influencia el tono vascular por su presencia en los nervios perivascuales (Toda y Okamura, 1989, 1991; Ignarro et al., 1990). La SONn ha sido encontrada en las fibras nerviosas autónomas de la capa adventicia de los grandes vasos (Toda y Okamura, 1991). La isoforma neuronal también está expresada en el ganglio esfenoopalatino. Las proyecciones de este ganglio a las grandes arterias cerebrales proporcionan inervación nitridérgica perivascular (Nozaki et al., 1993). La activación de estos nervios causa liberación del ON y relajación

de las células musculares arteriales, indicando que la SONn desempeña un papel en la neurotransmisión inhibitoria de las arterias cerebrales (Toda y Okamura, 1991).

Es poco probable que la isoforma inducible (isoforma II) participe en la regulación fisiológica del tono vascular, pero desempeña un papel en el menoscabo de la reactividad vascular durante el choque séptico (Buga et al., 1993; Moncada et al., 1991).

La estimulación de la síntesis de óxido nítrico por la sintasa endotelial.

En el sistema vascular, la síntesis de ON por la SONE es estimulada por el enlazamiento de autacoides (agonistas endógenos, como la bradicinina y la adenosina) a receptores de la membrana de las células del endotelio, así como por fuerzas de fricción por flujo actuando en el endotelio (Moncada et al., 1991; Stauss y Persson, 2000). Las respuestas estimuladas por agonistas son reguladas por la asociación de la SONE con el complejo Ca^{2+}/CaM ; en cambio, el estrés por fricción de flujo puede activar a la SONE de manera dependiente e independiente del complejo Ca^{2+}/CaM . En este último caso, están implicadas varias proteínas cinasas. La producción de ON independiente de Ca^{2+} requiere la fosforilación de residuos tirosina en la SONE o en una proteína reguladora asociada, y puede por tanto ser atenuada por inhibidores de cinasas de tirosina (García-Cardena et al., 1996; Flemming et al., 1996, 1998). También, ha sido reportado que el estrés por fricción de flujo aumenta la actividad catalítica de la SONE de manera independiente del Ca^{2+} , después de su fosforilación en serina por la proteína cinasa B (PKB/Akt) (Fulton et al., 1999; Dimmler et al., 1999). Interesantemente, con estudios *in vitro*, en ausencia de estrés por fricción de flujo, han podido evidenciarse dos factores adicionales determinantes de la formación de ON (ésta, inducida química y mecánicamente) en relación con la contracción del tejido vascular. Un incremento en el estrés por fricción en el endotelio durante la

contracción isométrica – sin flujo luminal – puede ocurrir debido a cambios en la orientación de las células endoteliales en relación al músculo liso y la lámina elástica (Fleming et al., 1999). En vasos de conductancia (aorta de conejo) y resistencia (ramas II y III de las arterias mesentéricas de la rata), este mecanismo ha sido relacionado con la síntesis de ON independiente de Ca^{2+} , sensible a inhibidores de cinasas de tirosina (Fleming et al., 1999) y de la PKB/Akt, respectivamente (Rezende et al., 2006). De otra forma, en las células endoteliales de arteriolas mesentéricas aisladas de la rata, se ha evidenciado un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de la administración del vasoconstrictor agonista de receptores adrenérgicos α_1 , fenilefrina, que estimula solamente las células musculares lisas (Dora et al., 1997). Este aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células endoteliales, fue atribuido a la difusión de un factor no conocido desde el músculo liso al endotelio, o al paso del propio Ca^{2+} a través de uniones comunicantes mioendoteliales (Dora et al., 1997). Una consecuencia funcional de este aumento indirecto de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células endoteliales, fue el incremento en la liberación de ON (Dora et al., 1997). Por tanto, la activación de la SONE puede no estar confinada exclusivamente a los vasodiladores específicos endoteliales o al estrés por fricción dependiente de flujo. Las funciones del músculo liso y de las células endoteliales en la pared de los vasos, están unificadas por complejos procesos mecánicos y químicos de señalización intercelular (Takano et al., 2005).

La activación de la guanilil ciclasa soluble por el óxido nítrico.

El ON es una molécula de señalamiento con múltiples funciones en varios tejidos. En el sistema vascular, la activación de la guanilil ciclasa soluble por el ON, es el evento fundamental intracelular que ocasiona relajación (Eigenthaler et al., 1999; Hofmann et al., 2000; Lincoln et al., 2001). El GMPc producido por esta enzima activa en las células del músculo liso, una familia de proteínas cinasas de residuos serina y treonina, las proteínas cinasas dependientes de GMPc (PKG). Han sido descritos al

menos dos tipos de PKG, las PKG I y PKG II (Lohmann et al., 1997), pero es la PKG tipo I la que media los efectos del ON en las células vasculares (Francis y Corbin, 1994; Lohmann et al., 1997). La importancia de la vía ON/GMPc/PKG en la regulación del tono del músculo liso puede ser atisbada en los estudios de supresión génica en ratones; aquellos que carecen de la SONE o la PKG I han mostrado moderada hipertensión, indicativa de un incremento en el tono vascular (Huang et al., 1995; Pfeifer et al., 1998).

El objetivo primario de la vía de transducción ON/GMPc/PKG en la relajación del músculo liso, es la reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ (Johnson y Lincoln, 1985). Así, es probable que diferentes procesos de fosforilación ocurran en respuesta a la activación de la PKG y conduzcan a relajación. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la regulación del Ca^{2+} en el músculo liso por la vía de transducción mencionada (Hofmann et al., 2000; Lincoln et al., 2001); entre los más fundamentados se encuentran los siguientes: (i) el aumento de la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA), (ii) la inhibición de canales de Ca^{2+} regulados por voltaje en el sarcolema, (iii) la interrupción del acoplamiento de los receptores serpentina, activados por ligandos constrictores endógenos, a las proteína Gq, (iv) la apertura de canales de K^+ de alta conductancia activados por Ca^{2+} (canales BK) y , por último, la disminución de la sensibilidad del aparato contráctil al Ca^{2+} (regulación de la sensibilización al Ca^{2+}). Adicionalmente, las concentraciones altas de ON pueden de forma directa activar canales de potasio, produciendo la hiperpolarización y la subsecuente reducción del flujo de calcio a las células del músculo liso vascular. Todos estos eventos, solos o en combinación, conducen a la relajación del músculo liso vascular y, eventualmente, a dilatación máxima por aplicación fisiológica de estímulos endoteliales.

El incremento en la actividad de los canales BK, hiperpolariza la membrana y reduce la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los

canales de Ca^{2+} activados por voltaje. Varios trabajos sugieren que la PKG activa la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina reduciendo, por ello, la fosforilación de las cadenas e inhibiendo la contracción (Lee et al., 1997; Kawada et al., 1997). Un componente importante del mecanismo de sensibilización al Ca^{2+} que sigue a la estimulación de la contracción por agonistas, es la inhibición dependiente de la vía de la guanosín trifosfatasa, Rho, y la proteína cinasa Rho (vía Rho-cinasaRho), de la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina (Gong et al., 1996; Kimura et al., 1996). Aparentemente, la PKG se opone a la inhibición de la fosfatasa inducida por la cinasa Rho, mediante la fosforilación de la subunidad que enlaza miosina (MBS) de la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina, así activando la subunidad catalítica de la fosfatasa (Surks et al., 1999; Torrecillas et al., 2000). Claramente, el control del músculo liso vascular a través de la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina, es un blanco importante del señalamiento de la vía NO/cGMP/PKG.

El ON participa en la regulación coordinada del flujo sanguíneo.

Primeramente, cabe establecer que en la circulación periférica, aún en condiciones de reposo, la más alta resistencia reside en las arteriolas pequeñas (< 50- μm de diámetro); las arteriolas más grandes y aún las pequeñas arterias contribuyen a la resistencia total, especialmente favoreciendo con su dilatación un flujo más alto. Un modelo simple, consistente de dos resistencias en serie, permite inferir que la disminución aislada de la resistencia distal aumenta el flujo en menor grado que la disminución combinada de ambas. La disminución coordinada de ambas resistencias puede ser alcanzada mediante señales generadas en los vasos distales o por efectos directos de aumento de flujo en el endotelio.

En relación con la perfusión tisular, el ON desempeña un papel fundamental como vasodilatador local, debido principalmente a sus efectos en las arteriolas tributarias que controlan la conductancia arterial. Son varios los mecanismos que participan en la regulación del flujo

sanguíneo tisular en interacción coordinada con el propio del ON. La dilatación por metabolitos, la dilatación conducida y la respuesta miogénica se encuentran - junto con la dilatación dependiente de flujo - entre los principales mecanismos intrínsecos de regulación del flujo sanguíneo.

Dilatación por metabolitos.

Los metabolitos tisulares como el CO_2 , la adenosina, y el lactato son eficientes vasodilatadores locales (Berne, 1963, 1964; Duncker et al., 1995; Ishibashi et al., 1998; Clifford y Hellsten, 2004). Además, la acidosis tisular, la hipercaliemia moderada, y la baja PO_2 actúan como relajantes que están vinculados a las condiciones metabólicas de los tejidos (Berne, 1964; Kerkhof et al., 2002; Clifford y Hellsten, 2004; Brzezinska et al., 2005). La mayoría de los metabolitos son capaces de relajar al músculo liso vascular directamente; además, algunos de ellos inhiben la liberación de neurotransmisores de las terminaciones nerviosas simpáticas, induciendo así mayor vasodilatación (Berne, 1964). Ninguno de los metabolitos previamente mencionados es considerado el mediador principal de la vasodilatación; ellos actúan preferentemente en conjunto de forma cooperativa, y en su mayoría pueden ser reemplazados por otros (Berne, 1964; Pohl y de Wit, 1999). Debido a este control redundante del tono vascular por factores metabólicos, la ausencia de un único vasodilatador, el ON, debería ser fácilmente compensada. Esta suposición es apoyada por el hecho de que virtualmente todos los efectos del ON en el músculo liso vascular pueden ser imitados por metabolitos o compuestos como las prostaglandinas, cuya liberación está vinculada con procesos dependientes de la PO_2 (Pohl y de Wit, 1999). Debido a que el flujo sanguíneo está estrechamente enlazado con el metabolismo tisular, la vasoconstricción continua después de la administración de inhibidores de la SON podría resultar de una disminución del metabolismo por estos compuestos. Sin embargo, parece ser el caso contrario, varios estudios han reportado que el ON reduce el metabolismo tisular (Giulivi, 1998;

Clementi et al., 1999). Así, cabría esperar que los inhibidores de la SON aumenten la perfusión tisular enlazada al metabolismo (Pohl y de Wit, 1999).

Dilatación conducida y dilatación dependiente de flujo.

La conductancia coordinada de las arteriolas pequeñas y grandes es fundamental para obtener una adecuada perfusión tisular. Resulta interesante que el papel del ON en el control del flujo sanguíneo, ha sido relacionado con diferencias principales entre su sitio de acción y el de los metabolitos reguladores del flujo (Pohl y de Wit, 1999; Clifford y Hellsten, 2004). En los vasos periféricos de resistencia: las pequeñas arteriolas, las arteriolas más grandes y las arterias pequeñas de alimentación (flujo arriba) deben dilatarse simultáneamente para alcanzar una conductancia vascular óptima. Los metabolitos que podrían controlar estos vasos flujo arriba todavía no han sido identificados - vasos que tienen función de vasos nutricios y de resistencia (Chilian et al., 1986). Aún cuando los metabolitos son muy efectivos en las pequeñas arteriolas terminales, la acumulación de estos por sí sola no puede reducir suficientemente la resistencia de los vasos tributarios de mayor calibre (Pohl y de Wit, 1999). Para dilatar estos vasos adecuadamente, los metabolitos tiene que difundir sobre distancias relativamente largas, debido a que las venas que drenan los tejidos y que podrían transportar los metabolitos, raramente corren en la vecindad de los vasos arteriales (Pohl y de Wit, 1999). De esta forma, para coordinar la conductancia de los vasos flujo arriba y flujo abajo, se necesitan mecanismos adicionales para alcanzar una adecuada perfusión sanguínea hacia el tejido irrigado por determinados capilares.

Uno de estos mecanismos es la dilatación conducida, la cual probablemente tiene su base en la propagación electrotonica de cambios locales en el potencial de membrana; el resultado es que las respuestas dilatadoras locales pueden propagar a largo de la pared arterial (Segal et al., 1989; Frame y Sarelius, 1995). La vasodilatación conducida fue

primero demostrada por la aplicación tópica de acetilcolina a las arteriolas del hámster (Segal et al., 1987). La acetilcolina administrada iontoforéticamente en los microvasos distales, indujo dilatación que ascendió hacia las arterias de alimentación que no tuvieron contacto directo con la acetilcolina (Segal et al., 1987). Actualmente se acepta que la respuesta conducida viaja a lo largo de la pared vascular por acoplamiento directo entre las células endoteliales y las células del músculo liso (Segal, 2000). La conducción de tales señales de los capilares a los vasos de resistencia flujo arriba, y entre arteriolas flujo abajo y vasos flujo arriba tiene, como ha sido reportado, constantes mecánicas de espacio considerablemente grandes.

A la par que la dilatación conducida, la dilatación dependiente de flujo es uno de los principales mecanismos coordinadores de la perfusión tisular (Griffith et al., 1987; Duling et al., 1987; Melkumyants et al., 1995; Pohl et al., 1991). Este mecanismo tiene su base en la liberación de ON inducida por estrés por fricción de flujo en la pared vascular (Griffith et al., 1987, 1990; Pohl et al., 1991; Kuo et al., 1990, 1991). Cualquier dilatación de las arteriolas flujo abajo (de menor calibre) incrementa en cierto grado el flujo, y por el subsiguiente aumento en el estrés por fricción en los vasos flujo arriba (de mayor calibre; tributarios), se induce dilatación mediada por ON. El efecto final es la dilatación coordinada a lo largo del árbol vascular que resulta en la adaptación de la conductancia vascular total a la nueva carga de flujo. Puesto que este es un mecanismo de retroalimentación positiva, es posible que canales preferenciales de flujo puedan ser establecidos mientras que otros vasos que corren en paralelo resulten perfundidos deficientemente (fenómeno de robo).

Siendo el incremento del estrés por fricción en la pared del vaso un estímulo adecuado para la mayor liberación de ON endotelial (Melkumyants et al., 1995; Pohl et al., 1991), resulta entonces que la dilatación así obtenida, tiende a reducir el estrés por fricción en la pared a los valores iniciales. Hay evidencia de que el estrés por fricción aumenta

el Ca^{2+} libre intracelular por varios mecanismos; lo cual, como ha sido previamente mencionado, conduce al aumento de la síntesis de ON porque la SONE es una enzima dependiente del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. El enlazamiento de este complejo a la sintasa es central para su actividad catalítica. Esta interacción probablemente subyace a la respuesta endotelial a los incrementos agudos del estrés por fricción (Kanai et al., 1995). El estrés por fricción también puede aumentar la actividad catalítica de la SONE por un mecanismo independiente de Ca^{2+} . Durante la fase inicial de exposición de las células endoteliales al flujo, la producción de ON es dependiente e independiente del calcio, pero con el tiempo la actividad de la enzima se torna independiente del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ y, no obstante, permite la producción continua de ON (Kuchan y Frangos, 1994; O'Neill, 1995). La producción de ON endotelial independiente de Ca^{2+} requiere la fosforilación en residuos de tirosina (Fleming et al., 1996, 1998) o serina de la SONE (Fulton et al., 1999; Dimmeler et al., 1999). El estrés por fricción también ocasiona la asociación de la SONE con la proteína chaperona de choque de calor 90 (Hsp 90). Esta proteína regula de forma alostérica la conformación de la sintasa, activándola de forma independiente del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (García-Cerdeña et al., 1998).

Con respecto a las respuestas vasomotoras conducidas, un hallazgo reciente merece especial consideración. El ON inhibe la conducción de vasoconstricciones a lo largo de las arteriolas en la microcirculación (Rodenwaldt et al., 2007). La coordinación vascular en la micro-circulación depende de comunicaciones intercelulares (uniones comunicantes o nexos), que permiten la conducción de respuestas vasomotoras iniciadas localmente. El ON atenúa la conducción de vasoconstricciones probablemente por modulación de la conductividad de los nexos. Parece ser que el efecto es específico para las células de músculo liso, las cuales probablemente transmiten señales de constricción que involucran conexinas. Este mecanismo puede dar apoyo a la potencia vasodilatadora del ON para prevenir la conducción de respuestas vasoconstrictoras

remotas (distales) hacia áreas con liberación basal o activada de ON (Rodenwaldt et al., 2007).

Mecanismos constrictores y liberación de óxido nítrico.

El diámetro vascular es un factor determinante del estrés por fricción. Para una tasa de flujo dada, las fuerzas de fricción son necesariamente mayores cuando el diámetro se reduce, de manera que los mecanismos constrictores locales pueden ejercer una importante influencia en la liberación del ON. De esta forma, el estrés por fricción en la superficie del endotelio aumenta cuando la presión de perfusión es elevada, debido por una parte al consecuente incremento del flujo y por otra, a la vasoconstricción miogénica que resulta, a su vez, del previo aumento de la presión transmural (Davis y Hill, 1999). Por lo tanto, el incremento de la liberación de ON inducido por fricción representa también un importante mecanismo de oposición a las constricciones miogénicas inducidas por presión (Pohl et al., 1991), las cuales, de otra forma, tenderían a reducir la perfusión tisular en un asa de retroacción positiva, auto-incrementada. De hecho, se ha demostrado que la liberación de ON dependiente del estrés por fricción puede completamente inhibir las constricciones miogénicas en los microvasos mesentéricos aislados (Pohl et al., 1991). Por otra parte, es relevante mencionar que la elevación crónica del estrés por fricción también aumenta la expresión de la SONE, lo cual es la razón más probable para que mejore la dilatación dependiente del flujo después del entrenamiento físico prolongado.

El papel coordinador vascular de la dilatación dependiente del flujo en las arteriolas grandes y los efectos inhibidores del ON sobre la constricción miogénica, permiten considerar que el ON desempeña una función reguladora muy importante que predomina en las arteriolas de mayor calibre (Pohl y de Wit, 1999; Rodenwaldt et al., 2007). La evidencia experimental directa que apoya este concepto, viene de estudios de microscopía intravital con pequeñas arteriolas aisladas. Estos vasos

muestran que el control metabólico de las arterias aumenta desde los vasos distales a los proximales de los tejidos, mientras que los efectos del ON disminuyen en el mismo orden (Kuo et al., 1995). De hecho, experimentos recientes indican que el control por el ON de la constricción miogénica es más pronunciado en las arteriolas grandes que en las pequeñas (de Wit et al., 1997). Debido a que las arteriolas grandes están también más densamente inervadas por fibras nerviosas simpáticas, el efecto inhibitorio de ON en la constricción simpática es también funcionalmente más importante en esta sección vascular. En la sinápsis neuroefectora, el ON ejerce un efecto inhibitorio sobre la liberación de noradrenalina en la terminación simpática (Teschfamiar y Cohen, 1988). Es posible, por lo tanto, predecir que la inhibición de la liberación de ON por un inhibidor de la sintasa, debe dar como resultado no solamente una reducción del flujo basal sino también una adaptación inadecuada del flujo sanguíneo a las variadas demandas tisulares. En consecuencia, la inhibición de la SON puede ocasionar una ineficiente coordinación del flujo sanguíneo durante la hiperemia activa, la autorregulación, o bien en el caso de la hiperemia reactiva.

Hiperemia reactiva.

La hiperemia reactiva es la respuesta vasodilatadora a una oclusión vascular transitoria (Duling et al., 1987). Es más pronunciada en órganos con altas demandas metabólicas, como el miocardio y el músculo esquelético. Debido a que la respuesta es modificada por la duración de la oclusión, la temperatura y la presión de perfusión, se ha propuesto que los metabolitos tisulares en combinación con las respuestas miogénicas median la dilatación. Los productos metabólicos lactato, CO₂ y adenosina, entre otros, han sido considerados responsables de la dilatación de las arteriolas por demanda tisular de oxígeno (Duling et al., 1987; Berne, 1964). Experimentalmente, la hiperemia reactiva es caracterizada por tres parámetros: el flujo máximo (pico) alcanzado después de la liberación de la oclusión, la duración del incremento en el flujo, y el exceso de flujo

(esto es, el producto de flujo basal por el tiempo de oclusión sustraído del flujo hiperémico total). En un inicio, la dilatación dependiente de flujo de las arterias proximales de conducción se manifestó evidente con la restauración del flujo en las arterias coronarias epicárdicas del perro y en el antebrazo humano (Hintze y Vatner, 1984; Hayashi et al., 1988; Celermajer et al., 1994). Prácticamente todos los estudios que han investigado el papel del ON en la hiperemia reactiva reportan una disminución en la duración de la respuesta hiperémica después del tratamiento con inhibidores de la SON, aunque el flujo pico y el exceso de flujo pudieron no verse afectados (Yamabe et al., 1992; Altaman et al., 1994; O'Leary et al., 1994; Engelke et al., 1996; Puybasset et al., 1996; Dakak et al., 1998). Algunos autores consideran que esto debe esperarse, ya que la dilatación reactiva dependiente del flujo es máxima después de 1 a 2 minutos, mientras que el flujo pico hiperémico ocurre dentro de aproximadamente 15 segundos (Hintze y Vatner, 1984). Otros investigadores consideran que el hecho de que la hiperemia reactiva este todavía presente después de la inhibición de la SON y que el incremento relativo del flujo permanezca el mismo, excluye al ON como el principal mediador de la hiperemia reactiva (Pohl y de Wit, 1999).

Como fue previamente mencionado, la duración de la respuesta hiperémica puede estar disminuida después de la inhibición de la SON. Una reducción de la hiperemia reactiva por los inhibidores de la SON, especialmente en su duración, podría en principio producirse si el ON aumentara la respiración celular, porque un metabolismo reducido (producto de la inhibición de la síntesis de ON) atenuaría la necesidad de una compensación hiperémica por la carencia transitoria de O_2 . Sin embargo, el caso contrario es el que se presenta: la liberación de ON del endotelio de las arteriolas puede deprimir la respiración mitocondrial en las células del parénquima adyacente, explicando así los aumentos en el consumo de O_2 por el músculo cardiaco y esquelético que siguen a la administración de inhibidores de la SON (Shen et al., 1995; Xie et al., 1996). Esta acción del ON puede involucrar la inhibición directa de la

citocromo C oxidasa, la enzima final de la cadena respiratoria en la mitocondria (Clementi et al., 1999). La disminución de la hiperemia reactiva por la inhibición de la SON, resultaría también si el ON mediara los efectos vasodilatadores de metabolitos o aumentara la sensibilidad del músculo liso para estos compuestos. A la fecha, no hay indicación de tales fenómenos. Hay evidencia, sin embargo, de que un bloqueo combinado de la SON y otros dilatadores como prostaglandinas y adenosina, logra un efecto inhibitorio mucho mayor sobre la hiperemia reactiva que el predicho por el efecto individual de cada inhibidor. En algunas especies, los prostanoides de origen endotelial contribuyen a la hiperemia reactiva en el músculo esquelético (Koller y Kaley, 1990). En el antebrazo humano, el exceso total de flujo es mucho menor después de la inhibición combinada de la SONE y la ciclooxigenasa (COX) que después de la inhibición particular de la SONE (Engelke et al., 1996). También, los prostanoides pueden actuar de forma compensatoria. En los perros conscientes, ellos no contribuyen normalmente a la hiperemia reactiva, pero la inhibición prolongada de la SONE conduce a la regulación ascendente de mecanismos dilatadores dependientes de prostanoides, de forma que los inhibidores de la COX entonces reducen significativamente el exceso de flujo después de la oclusión coronaria (Puybasset et al., 1996). El reembolso de flujo después de la oclusión coronaria en el perro involucra al ON y a la adenosina, cada mediador separadamente explica hasta el 30% de la hiperemia reactiva resultante (Yamabe et al., 1992). En el corazón aislado del cobayo, la disminución del flujo causada por la inhibición de la SONE puede de hecho aumentar la formación de adenosina, la cual compensa parcialmente por la pérdida de la actividad de ON (Kostic y Schrader, 1992).

Recientemente, ha sido propuesto que el ON aumenta la respuesta hiperémica de manera particular, porque influencia convenientemente la conductancia vascular a nivel de las pequeñas arterias y arteriolas tributarias de mayor calibre (Pohl y de Wit, 1999). Algunos antecedentes importantes son los siguientes. Se ha podido mostrar que la hiperemia

reactiva está asociada con la liberación aumentada de ON (Kostic y Schrader, 1992). De forma semejante, los estudios de microscopia intravital en las arteriolas del cremaster de rata, revelaron una dilatación post-oclusiva dependiente del endotelio que contribuyó significativamente a la duración de la respuesta hiperémica (Koller y Kaley, 1990). Otros estudios con microscopia intravital, demostraron claramente una dilatación retardada en arteriolas coronarias de tamaño grande y mediano durante la hiperemia reactiva. La dilatación dependiente de endotelio, especialmente de las arteriolas más grandes, puede ser esencial para una respuesta coordinada en la regulación del flujo porque, aún cuando la concentración de metabolitos aumente en su vecindad, estos vasos son menos sensitivos a ellos que las arteriolas más pequeñas (Anderson y Faber, 1991), debido en parte a su característica activación adrenérgica (Pohl y de Wit, 1999). Además, el ON puede ser necesario para atenuar la constricción miogénica que ocurre debido al aumento rápido de la presión de perfusión poco después del término de la oclusión vascular, la cual acortaría la duración de la respuesta hiperémica y reduciría también el flujo máximo. Este enfoque es apoyado por los experimentos que muestran un rápido y fuerte aumento de la resistencia coronaria en corazones aislados de conejo, después de súbitos incrementos de la presión cuando es inhibida la SON (Pohl et al., 1994). Esto ocurre a pesar del aumento de la liberación de lactato y posiblemente de otros metabolitos (Pohl et al., 1994). En concordancia, un estudio reciente ha mostrado, por medio de microscopía intravital, que después de la inhibición de la SON, ocurre una constricción miogénica importante de las arteriolas grandes, aunque estos vasos no se contraen normalmente con el incremento en la presión (de Wit et al., 1997). Es decir, el control miogénico es desplazado a vasos en donde no es antagonizado directamente por el aumento de los metabolitos. Estudios basados en medidas de las resistencias segmentarias también revelan una respuesta miogénica aumentada de las arteriolas más grandes ($> 25 \mu\text{m}$) después de la inhibición de la SON. Por tanto, la constricción miogénica aumentada después de la inhibición de la SON, podría bien contribuir a la

reducción de la respuesta hiperémica a pesar de los niveles altos de metabolitos.

Por tanto, puede sugerirse que el ON no es el determinante primario sino un modulador importante de la hiperemia reactiva. Este efecto modulador del ON es debido principalmente a la atenuación de las respuestas miogénicas en la fase inicial, después de la liberación de la oclusión, por el efecto aumentado de la conductancia vascular ejercido por la liberación de ON inducida por el estrés por fricción. Un efecto adicional puede ser el aumento sinérgico de los efectos de compuesto que aumentan el AMPc como las prostaglandinas. .

Hiperemia activa.

La hiperemia activa es el aumento de flujo hacia los órganos o tejidos en proporción a su actividad metabólica. La hiperemia funcional o activa es dominada por los efectos dilatadores de los metabolitos en las arteriolas distales (Segal, 2005). Los estudios con animales incluyendo humanos, sobre el papel del ON en la hiperemia activa han sido realizados principalmente en el músculo esquelético y el miocardio. Los resultados son contradictorios. Aunque algunos estudios demuestran una disminución significativa de la respuesta hiperémica después de la inhibición de la SON, otros reportan la ausencia de efecto aparente.

En algunos lechos vasculares, el ON puede aumentar la respuesta hiperémica funcional hasta un 50%; por ejemplo, con el marcapaso cardiaco (en función de la frecuencia) en el miocardio canino y humano (Jones et al., 1995; Quyyumi et al., 1995), durante la estimulación directa de campo o del nervio motor del músculo esquelético (Hussain et al., 1992; Hester et al., 1993), y durante el ejercicio en las extremidades posteriores de la rata (Hirai et al., 1994). De hecho, en humanos, el ON es en gran medida responsable de la dilatación coronaria epicárdica observada con el marcapaso de frecuencia variada (Quyyumi et al.,

1995). Los estudios de microscopia intravital han permitido demostrar la existencia de substanciales gradientes longitudinales en el mismo lecho vascular, en relación con la contribución relativa del ON y de factores metabólicos a la conductancia total. En el músculo cremáster del hámster, los inhibidores de la SONE constriñen arteriolas grandes y previenen su dilatación durante la hiperemia funcional, mientras que las respuestas de las arteriolas más pequeñas no son importantemente afectadas (Hester et al., 1993). En el corazón del perro, las pequeñas arteriolas de alimentación se contraen después de la administración de inhibidores de la SONE, mientras que las arteriolas distales pueden dilatarse secundariamente por mecanismos autorreguladores (Jones et al., 1995). Los estudios de perfusión con micro-esferas, han mostrado que la atenuación de la hiperemia funcional por los inhibidores de la SONE es más pronunciada en los músculos con alta capacidad oxidativa durante el ejercicio, sugiriendo que la coordinación dependiente del flujo de las respuestas flujo arriba y flujo abajo a través de un mecanismo dependiente de ON es particularmente importante en lechos con requerimientos altos de perfusión (Hirai et al., 1994). En otros lechos vasculares, la aumentada dilatación metabólica de las pequeñas arteriolas compensa por la deteriorada dilatación flujo arriba (es decir, la dilatación que depende del flujo). De esta manera, múltiples estudios han fallado en demostrar un papel del ON en el hiperemia funcional durante el ejercicio; por ejemplo, en el antebrazo humano (Endo et al., 1994; Wilson y Kappor, 1993) y en los músculos esquelético (O'Leary et al., 1994; Shen et al., 1994) y miocárdico caninos (Altman et al., 1994).

Una vez más, varios mecanismos de acción se deben considerar para explicar el papel del ON en el aumento de la hiperemia activa. Según lo antes discutido, los efectos directos de los metabolitos deben ser considerados. Con el aumento del flujo de la sangre y la demanda de oxígeno, el papel de la dilatación dependiente de flujo en coordinar la respuesta de las arteriolas grandes y pequeñas (por la carga más alta del flujo) puede llegar a ser cada vez más importante. Particularmente, en los

músculos esquelético y cardíaco, la contribución total de ON a la dilatación debe aumentar adicionalmente por la expresión rítmica de los vasos sanguíneos. Se ha demostrado que la distensión rítmica o la expresión rítmica de los vasos (es decir, contracción del músculo) aumenta la síntesis de ON y el flujo sanguíneo (Lamontagne et al., 1992). Aparte de estos efectos que amplifican la conductancia vascular, en la hiperemia activa tiene el ON al parecer funciones similares a aquellas de los metabolitos. Las condiciones anatómicas en músculo esquelético sugieren que un derramamiento del estimulador endotelial, acetilcolina, desde la unión neuromuscular, podría inducir la dilatación dependiente de ON bajo ejercicio del músculo (Pierzga y Segal, 1994). No ha sido elucidado si el ON producido por la SONn localizada en miocitos o terminaciones nerviosas, contribuye también a la respuesta hiperémica. Este último puede ser el caso en la fase inicial de la hiperemia activa en los vasos del músculo esquelético que poseen actividad de los nervios colinérgicos simpáticos. El ON liberado neuralmente también actúa como mediador de la hiperemia activa en vasos cerebrales.

Autorregulación de los vasos sanguíneos de resistencia.

La autorregulación vascular esta basada en dos mecanismos fundamentales, a saber, las respuestas miogénicas a cambios en la presión transmural y el control metabólico del tono del músculo liso. En muchos órganos el flujo sanguíneo es regulado tan estrechamente que permanece virtualmente constante cuando la presión suministrada varía en el rango aproximado de 50 a 150 mm Hg. Este fenómeno es explicado por la autorregulación y, en principio, depende de las interacciones de retroacción negativa entre los mecanismos de control miogénico y metabólico. Inicialmente, el incremento en la presión de suministro aumenta el flujo, pero este es rápidamente restaurado a su valor basal por medio de la constricción miogénica (ocasionada por el incremento de la presión transmural) y por la constricción secundaria al lavado (por el aumento inicial del flujo) de los metabolitos vasodilatadores. Los estudios

que muestran constricción de las arteriolas ocasionada por incrementos de la presión arterial o elevación de la presión venosa - lo cual tiene efectos opuestos en el aporte sanguíneo tisular; es decir, aumento y reducción, respectivamente - apoyan la idea del control miogénico. Sin embargo, la variación en el nivel de los metabolitos tisulares modifica en cierto grado esta conducta miogénica autorreguladora. Por tanto, un incremento sostenido de la actividad tisular producirá niveles aumentados de metabolitos y ajustará el flujo autorregulado a un nuevo nivel, más alto. Sucintamente, en acuerdo con la teoría de la autorregulación metabólica, un aumento en la presión arterial debe ocasionar un incremento inicial en el flujo sanguíneo que produce disminución de la concentración de los metabolitos tisulares vasodilatadores: la vasoconstricción resultante normaliza, así, el flujo sanguíneo al nivel preexistente.

En la autorregulación, las influencias relativas de los componentes miogénico y metabólico pueden variar en los diferentes lechos vasculares. Por otra parte, las diferencias de la capacidad autorreguladora vascular en diferentes órganos pueden estar relacionadas con la situación hemodinámica, particularmente en relación con la liberación de ON de origen endotelial (Griffith y Edwards, 1990). De esta forma puede explicarse porqué en la vasculatura de tejidos con baja actividad metabólica que normalmente no muestra autorregulación, esta se manifiesta después de la inhibición de la SONE. Por ejemplo, en los vasos de la oreja del conejo - un lecho vascular que manifiesta normalmente una débil autorregulación - la capacidad para la autorregulación se hace evidente después de la inhibición de la SON o el secuestro de ON con hemoglobina (Griffith y Edwards, 1990). Similarmente, la inhibición de la SON amplía el débil rango autorregulador de los vasos coronarios de los corazones aislados de cobayo y conejo (Ueeda et al., 1992; Pohl et al., 1994). En estos lechos, la disminución de la actividad del ON desenmascara o aumenta la constricción miogénica que atenúa los aumentos en el flujo inducidos por los incrementos en la presión de perfusión. En general, la disminución de la actividad del ON aumenta la

autorregulación en los lechos vasculares en donde la habilidad intrínseca para controlar el flujo es relativamente débil.

La actividad metabólica en la oreja del conejo es tan baja, que se puede descontar la contribución de los metabolitos en la autorregulación; es decir, la constricción miogénica por sí sola parece responsable del fenómeno (Griffith y Edwards, 1990). La aumentada constricción miogénica después de la disminución de la actividad del ON, puede anular a los factores metabólicos, como en el corazón aislado de conejo en que la autorregulación ocurre frente a la liberación aumentada de lactato y la captación disminuida de O_2 (indicando isquemia miocárdica) (Pohl et al., 1994). De otra forma, el ON atenúa las respuestas autorreguladoras miogénicas, las cuales sin oposición pueden comprometer la adecuada perfusión del miocardio. Estos cambios se manifiestan en presencia de isquemia miocárdica, lo cual indica que el mecanismo metabólico no fue suficiente para compensar por la ausencia del ON. Aunque se piensa que el control de la resistencia local por el lavado del metabolito dilatador, adenosina, contribuye a la habilidad de la circulación mesentérica para autorregular su flujo, la inhibición de la SON todavía aumenta la autorregulación normalmente débil encontrada en este lecho (Macedo y Lautt, 1996). Los datos son consistentes con la hipótesis de que el ON es capaz de oponerse completamente a las respuestas miogénicas predominantes en la conducta autorreguladora. En contraste, la vasculatura de órganos con alta actividad metabólica como el corazón, muestra una autorregulación distinta en la presencia de ON. La inhibición de la SON aumentó la autorregulación en ciertos estudios. No obstante, un número significativo de estudios ha reportado la ausencia de cambios en el rango o capacidad autorreguladores, lo cual sería consistente con una autorregulación predominantemente metabólica. En todos los casos, sin embargo, la inhibición de la SON redujo la meseta de flujo absoluto, lo cual enfatiza nuevamente que la conductancia de la vasculatura es generalmente reducida después de la inhibición de la SON.

El ON desempeña un papel menos importante en las circulaciones coronaria, cerebral y renal in vivo, en donde hay normalmente una alta ganancia autorreguladora intrínseca. Entonces, los efectos dominantes de la inhibición de la sintasa endotelial son un aumento en la resistencia vascular y una asociada reducción en el flujo sanguíneo, de forma tal que la autorregulación es reajustada con la meseta del flujo - en la relación presión-flujo - deprimida hasta por un 30%. Aunque puede no haber cambio en la presión con la cual la autorregulación primero se torna evidente o en su eficacia fisiológica (Wang et al., 1992; Beierwaltes et al., 1992; Baumann et al., 1992; Thompson et al., 1996), puede haber un aumento de 10 a 20 mm Hg en la presión que define el punto bajo de interrupción de la autorregulación; por ejemplo, en miocardio y riñón de perro (Smith y Canty, 1993; Majid y Navar, 1992) y cerebro de rata (Jones et al., 1999). Algunos reportes sugieren también que la terminación superior del rango autorregulado puede extenderse a presiones más altas (Wang et al., 1992; Talman y Dragon, 1995). Este desplazamiento hacia la derecha en la posición de rango autorregulador a lo largo del eje de presión, puede simplemente reflejar una atenuada dilatación miogénica con bajas presiones de perfusión y una distensión pasiva atenuada con presiones altas como resultado del tono constrictor exagerado que sigue a la pérdida de la actividad del ON. En lechos con alta ganancia autorreguladora tal como el riñón, la aumentada dilatación dependiente de endotelio por agonistas, tal como la acetilcolina, abole la autorregulación, de manera que las relaciones presión-flujo exhiben características puramente pasivas (Gross et al., 1976).

Un esquema general emerge en el cual las diferencias aparentes en los efectos de la inhibición de la SONE pueden ser explicadas por diferencias en la contribución del control miogénico o metabólico relativas al nivel ambiental de la producción de ON. Las interacciones entre estos mecanismos podían también ser la base de variaciones regionales en la autorregulación dentro del mismo órgano. En la rata, por ejemplo, la inhibición de la SONE abole la autorregulación en las cortezas cerebral y

cerebelar, pero no en todas las estructuras profundas del encéfalo (Wang et al., 1992; Tanaka et al., 1993). La síntesis de ON por neuronas y otros tipos de células podría contribuir a la autorregulación en la circulación cerebral además de la producción endotelial (Jones et al., 1999).

Los datos disponibles sugieren que la inhibición de la SON reduce la respuesta hiperémica y aumenta la autorregulación del flujo sanguíneo a expensas de la oxigenación tisular. Los datos son mejor explicados por una pérdida de las funciones de coordinación y vasodilatación del ON en las arteriolas grandes, lo cual conduce a una reducida conductancia y aumentada actividad miogénica. Estos datos son consistentes con un papel estratégico de ON en los vasos grandes de resistencia que no puede ser reemplazado por otros vasodilatadores y concede al ON un papel único en el control local del flujo sanguíneo.

El óxido nítrico en relación con la hipertensión arterial.

Varias líneas de evidencia sugieren la existencia de un sistema vascular intrínseco de amortiguación a corto plazo de la presión arterial. El sistema se fundamenta en la producción de ON endotelial en respuesta al estrés por fricción del flujo sanguíneo en la íntima de los vasos (Stauss y Persson, 2000). Sucintamente, el aumento en la presión sanguínea aumenta el estrés por fricción endotelial y la liberación de ON. La dilatación resultante de los vasos de resistencia, se opone al incremento inicial en la presión sanguínea. Así, el sistema del ON ha sido firmemente establecido como un importante regulador fisiológico de la presión arterial. En humanos, no obstante, las publicaciones que evalúan su papel en la hipertensión arterial son frecuentemente inconsistentes. Los reportes que indican que en la hipertensión arterial la producción de ON esta deprimida, sugieren que la elevada presión arterial refleja un déficit de este sistema vasodilatador. Contrariamente, las publicaciones que describen una producción excesiva de ON en la hipertensión, son interpretadas como indicativas de que el sistema vasodilatador del ON es

compensatorio, respondiendo en contra de la hipertensión. Obviamente, hay necesidad de atemperar estas interpretaciones opuestas.

En la mayoría de los estudios clínicos, el agente dilatador acetilcolina ha sido utilizado para evaluar la función endotelial dependiente de la liberación de ON. Los estudios de los cambios en el flujo sanguíneo (pletismográfico) del antebrazo, en respuesta a la administración de acetilcolina en la arteria braquial, han permitido establecer la participación del ON en la respuesta vasodilatadora. En los pacientes sanos, la instilación de acetilcolina en la arteria braquial ocasionó un incremento dependiente de la dosis en el flujo sanguíneo del antebrazo. La vasodilatación fue atribuida al ON por su reversión con un inhibidor de la SON (Taddei et al., 1993). En contraste, la respuesta a la acetilcolina permaneció inalterada después de la inyección intrabraquial de indometacina, indicando que los productos de la COX (prostanoides como la prostaciclina, PGI₂) no desempeñan un papel importante en las respuestas dependientes del endotelio en condiciones normales (Taddei et al., 1993, 1998). Con base en el estudio del efecto de la acetilcolina sobre la resistencia vascular, varios grupos de investigadores (Hirooka et al., 1992; Taddei et al., 1993, 1994; Panza et al., 1990, 1993; Linder et al., 1990) han reportado la posible participación del ON en la hipertensión clínica. Al comparar la acción vasodilatadora de la acetilcolina en pacientes hipertensos y normotensos, encontraron que el aumento del flujo sanguíneo fue significativamente menor en los primeros. La diferencia no fue el resultado de una menor sensibilidad del músculo liso vascular al ON, porque el incremento en el flujo en respuesta a los donadores de ON como la nitroglicerina y el nitroprusiato de sodio fue equivalente en ambos grupos (Panza et al., 1990). En los pacientes con hipertensión esencial, la inhibida respuesta relajante a la acetilcolina es coincidentemente resistente a la inhibición de la SON. Que la respuesta a la acetilcolina refleja la liberación de ON, fue documentado adicionalmente por la observación de que esta respuesta fue deprimida después del tratamiento del antebrazo con el inhibidor de la SON, L-

NMMA (Calver et al., 1992). También, las respuestas vasodilatadoras a la acetilcolina y la nitroglicerina fueron estudiadas en arterias coronarias de pacientes con hipertensión esencial y en controles normotensos (Treasure et al., 1992). Semejantemente al lecho vascular del antebrazo, las respuestas a la nitroglicerina no difirieron, pero las respuestas a la acetilcolina fueron reducida en las arterias coronarias del grupo hipertenso.

Los trabajos previamente mencionados, fueron hechos con base en el estudio comparativo de pacientes con hipertensión esencial y sujetos normotensos. No obstante, deficiencias similares en la respuesta vasodilatadora han sido observadas en los pacientes con formas secundarias de hipertensión, hipertensión renovascular e hiperaldosteronismo primario (Taddei et al., 1993). El estudio comparativo del flujo sanguíneo del antebrazo también ha sido realizado con la instilación de L-NMMA (Calver et al., 1992). Este inhibidor de la SON ocasionó una disminución del flujo sanguíneo, demostrando que la liberación tónica de ON contribuye a la resistencia vascular basal del antebrazo. El decremento en el flujo sanguíneo producido por el L-NMMA fue significativamente menor en pacientes hipertensos, sugiriendo que la dilatación mediada por el ON basal está reducida en la hipertensión esencial (Calver et al., 1992). Los investigadores señalaron que la liberación basal del ON puede ser más relevante en la hipertensión, que su liberación estimulada (v.gr., en respuesta a la acetilcolina). Una interesante perspectiva en cuanto al posible mecanismo responsable de la liberación deprimida de ON en la hipertensión es presentada por la observación de que el tratamiento antihipertensivo con el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), captopril, normalizó la respuesta vasodilatadora de la acetilcolina en el antebrazo (Hirooka et al., 1992). El tratamiento antihipertensivo con nifedipina, que redujo la presión arterial al mismo nivel, no corrigió la respuesta a la acetilcolina. Los autores consideraron (Hirooka et al., 1992) que algunas de las acciones vasoprotectoras de los inhibidores de la ECA, están mediadas por un

incremento de la liberación endotelial de ON, lo cual en turno puede deberse a la estimulación local de cininas (bradicinina) dentro de la pared vascular.

Falloon y Heagerty (1994) proporcionaron evidencia de una defectuosa dilatación dependiente del endotelio en las arterias de resistencia de pacientes con hipertensión esencial. En este estudio se midió la relajación dependiente del endotelio provocada por la acetilcolina en arterias subcutáneas humanas, con el uso de un miógrafo de perfusión para simular condiciones *in vivo*. De forma similar a los estudios previos en el antebrazo, ellos encontraron que la relajación a la acetilcolina fue reducida significativamente en las pequeñas arterias de resistencia aisladas de pacientes con hipertensión esencial, mientras que la relajación al nitroprusiato de sodio no difirió entre pacientes hipertensos y sujetos normotensos (Fallon y Heagerty, 1994). Este estudio proporciona apoyo adicional para el papel de la disfunción endotelial como importante contribuidora de la aumentada resistencia periférica en la hipertensión arterial.

Dos estudios recientes fallaron en apuntalar la posible contribución de la liberación atenuada de ON en el incremento de la resistencia vascular en hipertensión. Cockcroft et al (1994) utilizaron una aproximación estándar de la resistencia vascular del antebrazo y no encontraron diferencia en las respuestas vasodilatadoras a la acetilcolina y al carbacol entre pacientes con hipertensión esencial y los sujetos normotensos. En el segundo estudio que reporto ausencia de diferencia, el diámetro de la arteria braquial fue monitoreado en respuesta a cambios en la velocidad del flujo sanguíneo (Laurent et al., 1990). Los incrementos en el flujo sanguíneo activaron la liberación endotelial de ON, pero no se encontró diferencia en los incrementos asociados en el diámetro de la arteria braquial entre los individuos hipertensos y normotensos (Laurent et al., 1990).

En resumen, la mayoría de la evidencia de los estudios clínicos indica que hay una deficiencia en la liberación del ON por el endotelio en la

hipertensión. La razón de los resultados divergentes (Cockcroft et al., 1994; Laurent et al., 1990) no es clara, pero puede postularse que varios subgrupos de pacientes con hipertensión esencial difieren con respecto a la liberación endotelial de ON. Esto estaría de acuerdo con la heterogeneidad bien establecida de hipertensión esencial en humanos.

Justificación.

La producción de óxido nítrico (ON) por el endotelio vascular es un mecanismo importante de control de la presión sanguínea (Rees et al., 1989; Rubanyi et al., 1986; Ignarro, 1989; Moncada et al., 1991; Pohl et al., 1993; Zatz y Baylis, 1998; Stauss y Persson, 2000). La síntesis de ON por la enzima sintasa de ON endotelial (SONe) es estimulada por estrés por fricción del flujo sanguíneo actuando en el endotelio, así como por la ocupación por agonistas de receptores de la membrana endotelial (Moncada et al., 1991; Rees et al., 1989; Rubanyi et al., 1986; Ignarro, 1989; Zatz y Baylis, 1998; Pohl et al., 1993; Stauss y Persson, 2000). Las respuestas estimuladas por agonistas son reguladas por la asociación de la SONE con el complejo Ca^{2+}/CaM ; en cambio, las fuerzas de fricción dependientes del flujo pueden también activar la SONE de forma independiente (y dependiente) del complejo Ca^{2+}/CaM (Moncada et al., 1991; Rees et al., 1989; Rubanyi et al., 1986; Ignarro, 1989; Zatz y Baylis, 1998; Pohl et al., 1993). Por otra parte, los mecanismos de constricción muscular pueden ejercer una influencia importante en la liberación de ON. En principio, es posible la transferencia de señales químicas del músculo liso al endotelio a través de uniones comunicantes. Así, ha sido mostrado que la constricción de las arteriolas por agonistas (v.gr., la fenilefrina) ocasiona la elevación secundaria de la concentración intracelular de Ca^{2+} endotelial y, por lo tanto, estimula la producción de ON (Dora et al., 1997, 2003). Además, hay evidencia de que en ausencia de flujo luminal, puede ocurrir estrés por fricción endotelial durante la contracción isométrica, debido a los cambios en la orientación de las células endoteliales en relación con el músculo liso y la lámina elástica (Dimmeler et al., 1999; Fleming et al., 1999). De esta manera, la activación de la SONE puede no estar confinada exclusivamente a los vasodiladores específicos endoteliales (como la bradicinina, el ATP, y la acetilcolina) o al estrés por fricción dependiente de flujo. Las funciones del músculo liso y de las células endoteliales en la pared de la arteriolas, están unificadas por

complejos procesos mecánicos y químicos de señalización intercelular (Takano et al., 2005).

Desde la clarificación de la biosíntesis de ON, los análogos de la L-arginina han sido utilizados como inhibidores de la SON para evaluar la contribución del ON a la fisiología y fisiopatología cardiovasculares. En particular, ha sido probado que la administración aguda y crónica del éster metilo de la N^G-nitro-L-arginina (L-NAME) aumenta la presión sanguínea en varias especies (Moncada et al., 1991; Zatz y Baylis, 1998). En conjunto, los experimentos con inhibición de la SON sostienen la proposición de que la hipertensión así obtenida refleja la supresión del efecto vasodilatador tónico dependiente del ON, que deja sin oposición la acción también tónica de vasoconstrictores endógenos (Moncada et al., 1991; Zatz y Baylis, 1998). De otra forma, a la fecha, una cantidad considerable de datos sugiere que un aumento o disminución de la presión sanguínea, o tono vascular, aumenta o disminuye, correspondientemente, el estrés por fricción endotelial y la liberación de ON (Zatz y Baylis, 1998). Experimentos *in vivo* en las ratas, indican que la respuesta vasopresora por la inhibición de la SON es atenuada por procedimientos o agentes que disminuyen el tono vascular, y así la presión sanguínea (i.e., desmedulación o bloqueo ganglionar); contrariamente, en animales desmedulados, la inducción de aumentos moderados o intensos en la presión sanguínea con instilación constante de vasoconstrictores (i.e., fenilefrina o vasopresina) restaura o aumenta, respectivamente, las respuestas presoras en comparación con las ratas anestesiadas (Vargas et al., 1990; Elayan et al., 2002). Distintivamente, los efectos vasopresores inducidos por la inhibición de la SON han sido positivamente correlacionados con la presión sanguínea sistólica basal en la rata (Elayan et al., 2002). Además, los niveles de ON han aparecido como más altos en la condición de hipertensión, ya que la inhibición de la SON produjo un aumento mayor de las respuestas vasopresoras producidas por estimulación nerviosa simpática en las ratas espontáneamente hipertensas comparadas con las normotensas (Tabrizchi y Triggle, 1991). Contrariamente, hay información de que las

respuestas presoras provocadas por los inhibidores de la SON, son independientes del tono vascular existente, ya que la presión sanguínea fue aumentada por el L-NAME de forma cuantitativamente equivalente en las ratas desmeduladas (van Gelderen y Saxena, 1992) y en las anestesiadas (van Gelderen et al., 1991). Resultados similares fueron obtenidos en nuestro laboratorio (datos no publicados).

Las últimas observaciones nos impulsaron a reconsiderar críticamente la hipótesis que propone que la magnitud de la respuesta presora por inhibición de la SON depende del nivel basal de tono vascular. Para evaluar esta hipótesis, nosotros medimos los efectos vasopresores diastólicos y sistólicos del L-NAME en grupos de ratas desmeduladas, bajo diferentes condiciones hemodinámicas provocadas por cambios escalonados en el tono vascular. Los cambios reportados en las respuestas presoras causados por inhibición de la SON en función del tono vascular (o la presión arterial) pueden ser explicados, al menos parcialmente, en relación con dos factores que a nuestro entender no han sido adecuadamente considerados. Primero, la inhibición de la síntesis de ON en el endotelio de las grandes arterias (conductancia); segundo, la reducción de la distensibilidad arterial con los aumentos experimentales en la presión sanguínea arterial de base. Ambos factores pueden modificar la presión arterial del pulso.

Hipótesis:

Para el desarrollo de este trabajo se elaboraron tres hipótesis complementarias:

- La magnitud de la respuesta presora producida por la inhibición farmacológica de la SON depende del nivel basal de tono vascular o presión arterial.

- Las respuestas presoras causadas por la inhibición de la SON en función del tono vascular, se relacionan fundamentalmente con la inhibición de la síntesis de ON en el endotelio de las grandes arterias de conductancia.

- Las respuestas presoras producidas por la inhibición de la SON en función del tono vascular, se explican parcialmente por la reducción de la distensibilidad arterial provocada por los aumentos en la presión sanguínea arterial de base.

Objetivo General:

Examinar si el efecto del inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, éster metilo de N^G-nitro-L-arginina (L-NAME), en la presión sanguínea depende del tono vascular periférico.

Objetivos particulares:

- Evaluar los efectos vasopresores producidos por la administración intravenosa estable (instilación) de diferentes dosis del agonista de AR- α_1 , fenilefrina, en grupos de ratas desmeduladas.

- Estudiar los efectos del inhibidor de la SON, L-NAME, sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca en ratas desmeduladas. bajo diferentes condiciones hemodinámicas provocadas por cambios escalonados en el tono vascular.

- Con base en la respuestas hemodinámicas provocadas por la fenilefrina y el L-NAME, analizar los cambios en la presión del pulso arterial que indiquen cambios en la distensibilidad arterial.

Material y Métodos.

Las ratas machos Wistar (250-300 g de peso; 10-12 semanas de edad) se mantuvieron con un ciclo de luz y oscuridad de 12 por 12 horas, en un cuarto aislado, con libre acceso a agua y comida en sus cajas. Los experimentos fueron conducidos bajo los protocolos aprobados por el Comité de Cuidados y Uso Animal de nuestra Institución.

Preparación de las ratas descerebradas y desmedulas.

Previa anestesia con éter etílico, las ratas fueron vagotomizadas bilateralmente en la región cervical y se introdujeron cánulas en sus tráqueas para permitir respiración asistida con aire ambiental (50 ciclos.min⁻¹; 20 ml.kg⁻¹) por medio de un bomba de ventilación. Los animales se descerebraron y desmedularon usando un estilete de acero inoxidable, introduciéndolo a través de la órbita ocular y el foramen magnum hacia el canal espinal. Restablecida la respiración artificial, se continuó con la inserción de catéteres de polietileno en la arteria carótida derecha y la vena femoral derecha para registrar la presión arterial y permitir la administración de drogas, respectivamente. Otro catéter fue colocado en la vena femoral izquierda para los experimentos de administración continua de fenilefrina (ver diseño experimental). La presión arterial (mm Hg) fue medida con un transductor de presión (TSD 104, Biopac) y registrada en una computadora con el programa AcqKnowledge (MP100WSW, Biopac Systems Inc.; California, USA). La frecuencia cardíaca (pulsos por minuto; ppm) fue computada de la señal de presión sanguínea. Antes de iniciar la fase de administración de los fármacos, se estableció un período mínimo de 30 minutos para estabilizar la preparación. La temperatura fue controlada a 37 ± 0.5 ° C con una manta eléctrica y evaluada por medio de un transductor rectal.

Protocolo experimental.

Los efectos presores del L-NAME en las ratas desmeduladas. Después de haber obtenido estables condiciones hemodinámicas por 30 minutos, los valores basales de presión sanguínea distólica (PAD) y sistólica (PAS), presión del pulso arterial (PP), y frecuencia cardiaca (FC) fueron determinados. Posteriormente, los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales que recibieron por vía intravenosa salina (grupo de ratas SAL-des) o el agonista de receptores adrenérgicos α_1 (AR- α_1), fenilefrina, con el propósito de inducir cambios escalonados estables en la presión arterial. Así, se obtuvieron niveles bajos (grupo de ratas BFEN-des), medios (grupo de ratas MFEN-des), y altos (grupo de ratas AFEN-des) de tono vascular con infusión continua de 3, 10 y 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de fenilefrina, respectivamente. El grupo de ratas SAL-des recibió 0.9 % NaCl, 10 $\mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Aproximadamente 10 min después, todos los animales recibieron una dosis de L-NAME (10 mg.kg^{-1} , i.v.). Las respuestas de PAD, PAS, PP, y FC provocadas por el L-NAME fueron registradas. Similarmente, las respuestas hemodinámicas del enantiómero inactivo como inhibidor de la SON, D-NAME (10 mg.kg^{-1} ; i.v.), fueron evaluadas en dos grupos separados de ratas SAL-des y BFEN-des.

Presentación y análisis de datos.

Los resultados están expresados como la media \pm el error estándar de la media (ESM) de determinaciones obtenidas de 8 a 9 animales diferentes. El análisis estadístico fue hecho utilizando la prueba t de Student o el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de forma apropiada por la prueba de Tukey. En todas las comparaciones un valor menor que P 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo. Solamente una dosis de L-NAME (o D-NAME) fue utilizada en cada animal.

Drogas:

Los siguientes fármacos fueron utilizados: éster metilo de N^G-nitro-L-arginina (L-NAME), éster metilo de N^G-nitro-D-arginina (D-NAME), l-fenilefrina clorhidrato, y dl-propranolol clorhidrato (Sigma Chemical Company; St. Louis, MO, U.S.A.). Los fármacos fueron disueltos en solución salina.

Resultados.

Parámetros Controles y Basales.

Los valores característicos de presión arterial y frecuencia cardiaca de los grupos de ratas desmeduladas utilizados para el análisis hemodinámico de las respuestas al L-NAME, están presentes en la tabla 1 y las figuras 1 a 4. En los animales instilados con fenilefrina (BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des), se observaron importantes incrementos en la PAD y la PAS en comparación con sus propios controles (Tabla 1). Además, al comparar los grupos de ratas BFEN-des con MFEN-des, y MFEN-des con AFEN-des, la PAD y la PAS se encontraron incrementadas de manera dependiente de la dosis de fenilefrina (Tabla 1; Figuras 1 y 2). La PP aumentó con la instilación de fenilefrina en los tres grupos experimentales mencionados (Tabla 1; Figura 3). La dosis más alta de fenilefrina ocasionó un aumento de la FC en las ratas desmeduladas (grupo AFEN-des) (Tabla 1; Figura 4), el cual fue revertido por el antagonista de AR- β , propranolol (1mg.kg^{-1} , i.v.) (Figura 8). Este aumento de la FC no fue asociado con cambios en la presión sanguínea (AFEN-des (n=9) vs. AFEN-des+propranolol (n=8): PAD 115 ± 7 vs. 117 ± 5 mm Hg, y PAS 164 ± 12 vs. 166 ± 12 mm Hg, respectivamente; $P > 0.05$ en cada caso).

La instilación de solución salina (NaCl 0.9%; $10 \mu\text{l.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ durante 60 minutos) en los animales desmedulados (SAL-des), no ocasionó cambios significativos en las variables hemodinámicas estudiadas (Tabla 1).

Tabla 1. Los valores basales de presión arterial diastólica (PAD), presión arterial sistólica (PAS), presión del pulso arterial (PP) y frecuencia cardiaca (FC) en cuatro diferentes grupos experimentales de ratas desmeduladas, antes (Des) y después de la infusión de solución salina ($10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$; Sal-des) o fenilefrina (3, 10, y $30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des, respectivamente).

	PAD (mm Hg)	PAS (mm Hg)	PP (mm Hg)	FC (ppm) [∞]
Des (n=8)	40 ± 2	63 ± 3	22 ± 2	363 ± 9
Sal-des	39 ± 2	62 ± 3	24 ± 2	370 ± 7
Des (n=9)	37 ± 2	65 ± 2	28 ± 1	377 ± 8
BFEN-des	54 ± 4 [#]	96 ± 3 [*]	38 ± 2 [#]	381 ± 10
Des (n=8)	43 ± 2	61 ± 3	20 ± 2	359 ± 8
MFEN-des	97 ± 4 ^{*1}	133 ± 5 ^{*1}	37 ± 2 [*]	378 ± 10
Des (n=8)	38 ± 2	60 ± 2	22 ± 2	388 ± 10
AFEN-des	115 ± 4 ^{*2}	164 ± 5 ^{*3}	47 ± 3 ^{*2}	470 ± 5 ^{*3}

Los valores son las medias ± EEM de n experimentos. [#]P < 0.01, ^{*}P < 0.001 vs. su propio control. ¹P < 0.001 MFEN-des vs. BFEN-des; ²P < 0.05 AFEN-des vs. MFEN-des; ³P < 0.001 AFEN-des vs. MFEN-des.

[∞] pulsaciones por minuto.

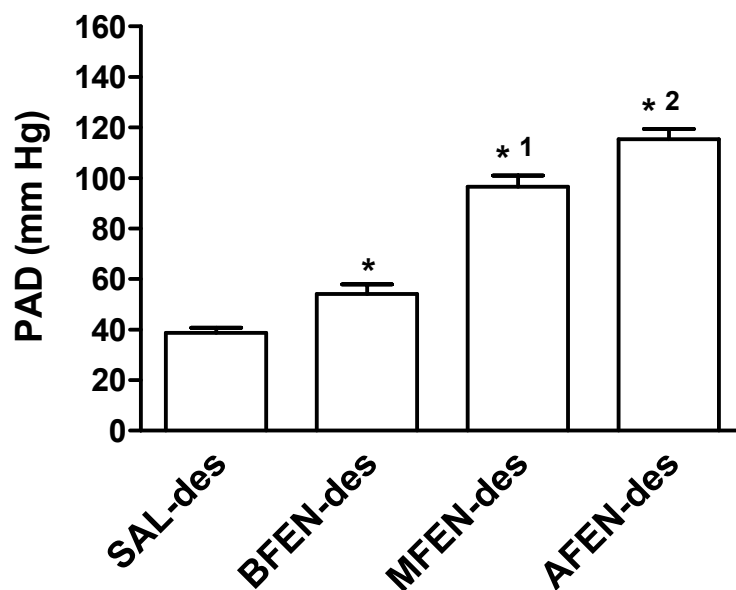


Figura 1. Representación gráfica de los valores de la presión arterial diastólica (PAD) en las ratas desmeduladas instiladas por vía intravenosa con solución salina ($10 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; SAL-des) o fenilefrina ($3, 10, \text{ y } 30 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des, respectivamente). Los datos son las medias \pm EEM de 8 a 9 experimentos. * $P < 0.001$ vs. SAL-des. ¹ $P < 0.001$ MFEN-des vs. BFEN-des; ² $P < 0.05$ AFEN-des vs. MFEN-des.

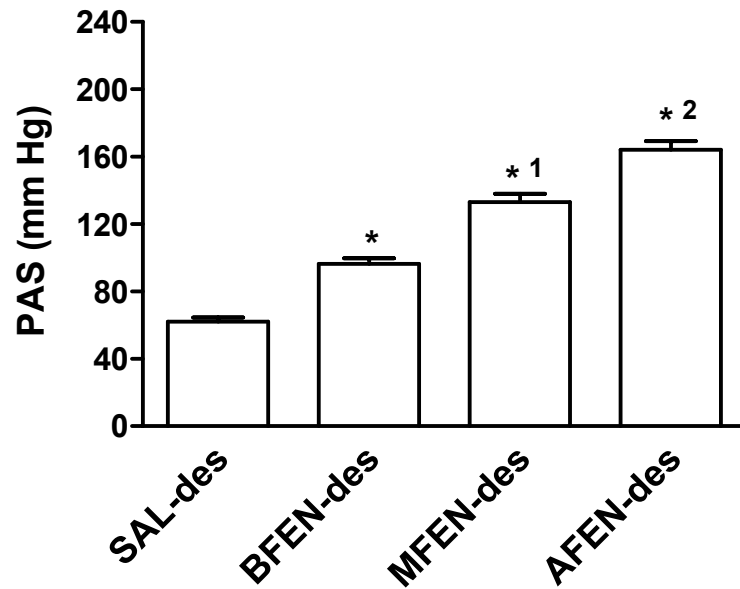


Figura 2. Representación gráfica de los valores de presión arterial sistólica (PAS) en las ratas desmeduladas instiladas por vía intravenosa con solución salina ($10 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; Sal-des) o fenilefrina ($3, 10$ y $30 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des, respectivamente). Los datos son las medias \pm EEM de 8-9 experimentos. * $P < 0.001$ vs. SAL-des. ¹ $P < 0.001$ MFEN-des vs. BFEN-des; ² $P < 0.05$ AFEN-des vs. MFEN-des.

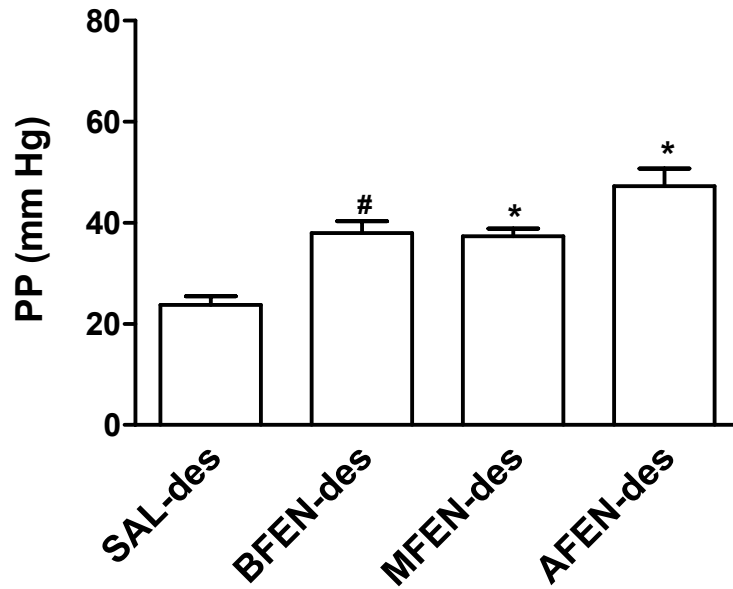


Figura 3. Representación gráfica de los valores de la presión del pulso arterial (PP) en ratas desmeduladas instiladas por vías intravenosa con solución salina ($10 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; SAL-des) o fenilefrina (3, 10, y $30 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des, respectivamente). Los datos son la medias \pm EEM de 8-9 animales. # $P < 0.05$, * $P < 0.001$ vs. SAL-des.

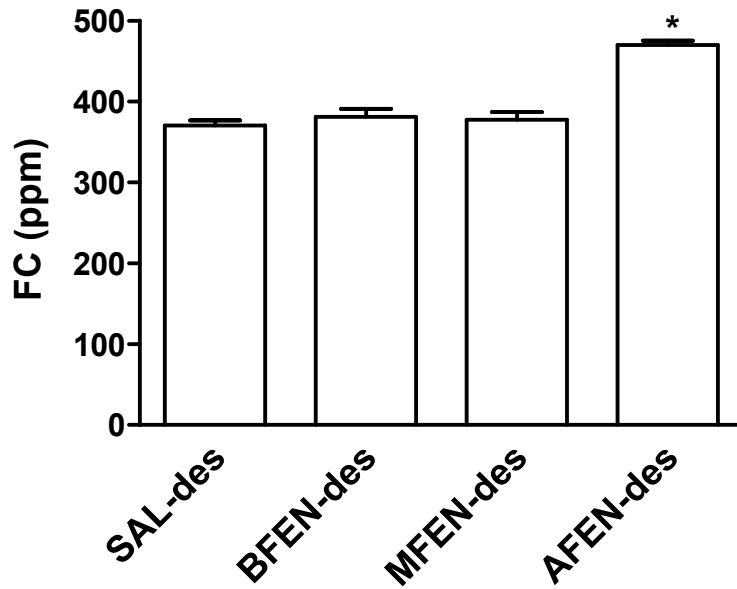


Figura 4. Los gráficos representan los valores de la frecuencia cardiaca (FC) en las ratas desmeduladas instiladas por vía intravenosa con solución salina ($10 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; SAL-des) o fenilefrina ($3, 10$ y $30 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des, respectivamente). Los datos son las medias \pm EEM de 8 a 9 experimentos. * $P < 0.001$ vs. SAL-des.

Respuestas presoras del L-NAME.

El L-NAME produjo respuestas vasopresoras en todos los grupos de animales estudiados (Figuras 5 y 6). Los incrementos en la PAS y PAD ocasionados por el L-NAME en las ratas SAL-des, fueron significativamente menores que los obtenidos en los diferentes grupos de ratas instiladas con fenilefrina, con excepción de la PAD del grupo AFEN-des (Figuras 5 y 6). En este caso, el incremento de la PAD provocado por el L-NAME fue menor que el del grupo de ratas SAL-des, aun cuando la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 5B).

En las ratas instiladas con fenilefrina, el incremento de la PAD ocasionado por el L-NAME fue mayor en el grupo BFEN-des comparado con el de los grupos MFEN-des y AFEN-des (Figura 5B); en cambio, el incremento de la PAS fue equivalente entre estos tres grupos (Figuras 6B). Los aumentos escalonados de la PAD obtenidos con la fenilefrina en los grupos BFEN-des, MFEN-des, y AFEN-des (Figuras 5A y Tabla 1), se relacionaron de manera inversa con los aumentos en la PAD producidos por el L-NAME (Figura 5B); es decir, mientras mayor fue el incremento de la PAD producido por la fenilefrina, menor fue el aumento de la PAD ocasionado por el L-NAME (Figuras 5A y 5B).

No obstante, la magnitud absoluta de la PAD en las ratas BFEN-des+L-NAME, MFEN-des+L-NAME, y AFEN-des+L-NAME, aumentó de la siguiente forma: 126.46 ± 4.61 (n=9), 152.04 ± 4.45 (n=8) (P < 0.001 vs. BFEN-des+L-NAME), y 147.19 ± 3.12 (n=8) mm Hg (P < 0.01 vs BFEN-des+L-NAME) (Figura 5A). No hubo diferencia significativa entre los dos últimos grupos. La PAS aumentó similarmente; los valores absolutos de la PAS en los animales BFEN-des+L-NAME, MFEN-des+L-NAME, y AFEN-des+L-NAME fueron, respectivamente, 165.58 ± 4.75 (n=9), 204.48 ± 4.51 (n=8) (P < 0.001 vs BFEN-des+L-NAME), y 216.66 ± 4.72 (n=8) mm Hg (P < 0.001 vs BFEN-des+L-NAME) (ver Figura 6A). El valor más grande de la PAS con L-NAME en el grupo AFEN-des comparado con las ratas MFEN-des, no alcanzó una diferencia significativa.

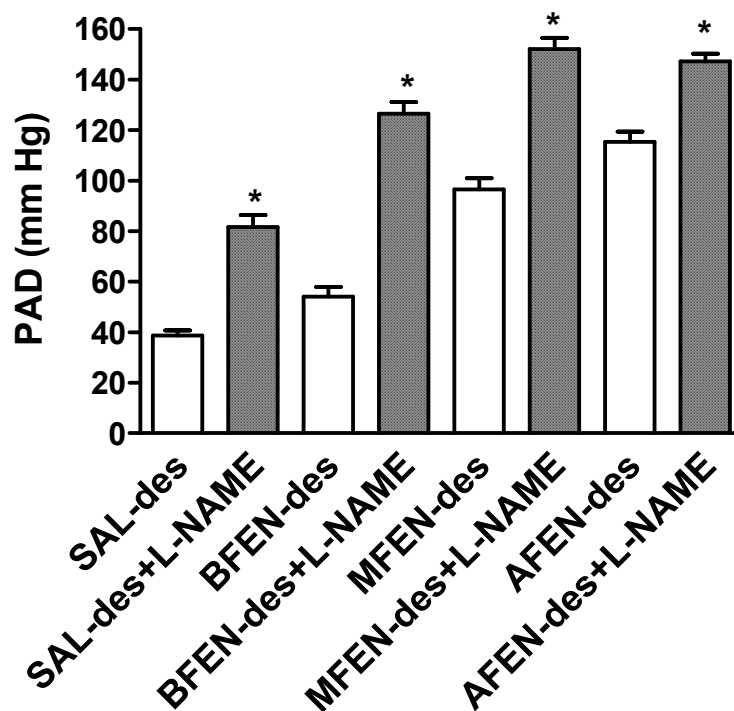


Figura 5A. Efectos en la presión arterial diastólica del éster metilo de N^G-nitro-L-arginina (L-NAME) en las ratas desmeduladas con diferentes niveles de tono vascular. Los histogramas representan los valores de la presión arterial diastólica (PAD) en las ratas desmeduladas instiladas por vía intravenosa con solución salina ($10 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; Sal-des) o fenilefrina (3, 10, y $30 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des, respectivamente), antes y después de la administración de L-NAME (10mg.kg^{-1} , i.v.; +L-NAME). Los datos son las medias \pm EEM de 8 a 9 experimentos. * $P < 0.001$ vs. su propio control.

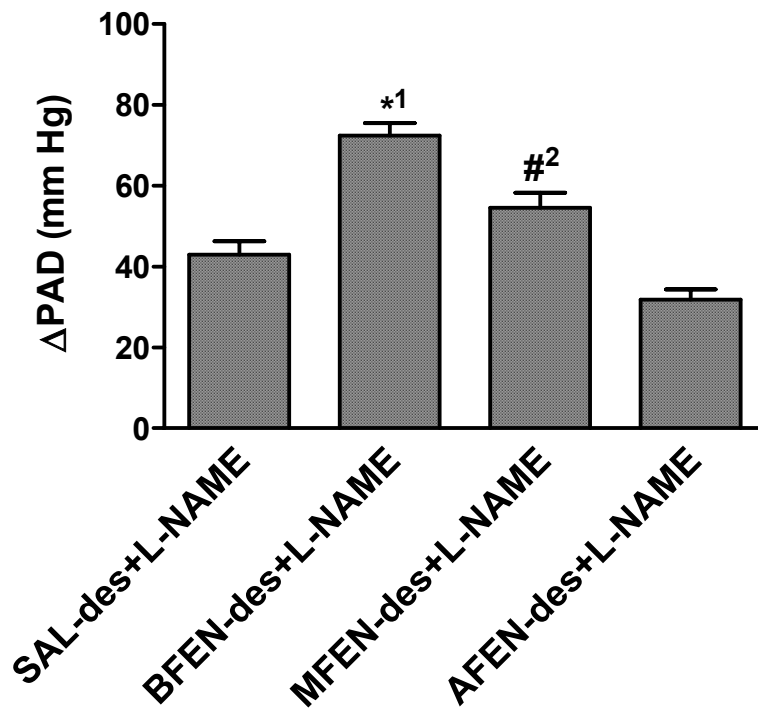


Figura 5B. De los experimentos en la figura 2A, los incrementos en la presión arterial diastólica (Δ PAD) obtenidos con L-NAME (+L-NAME) en los grupos de ratas SAL-des, BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des. Los valores son las medias \pm EEM. # $P < 0.05$, * $P < 0.001$ vs. SAL-des+L-NAME. ¹ $P < 0.001$ BFEN-des+L-NAME vs. MFEN-des+L-NAME. ² $P < 0.001$ MFEN-des+L-NAME vs. AFEN-des+L-NAME.

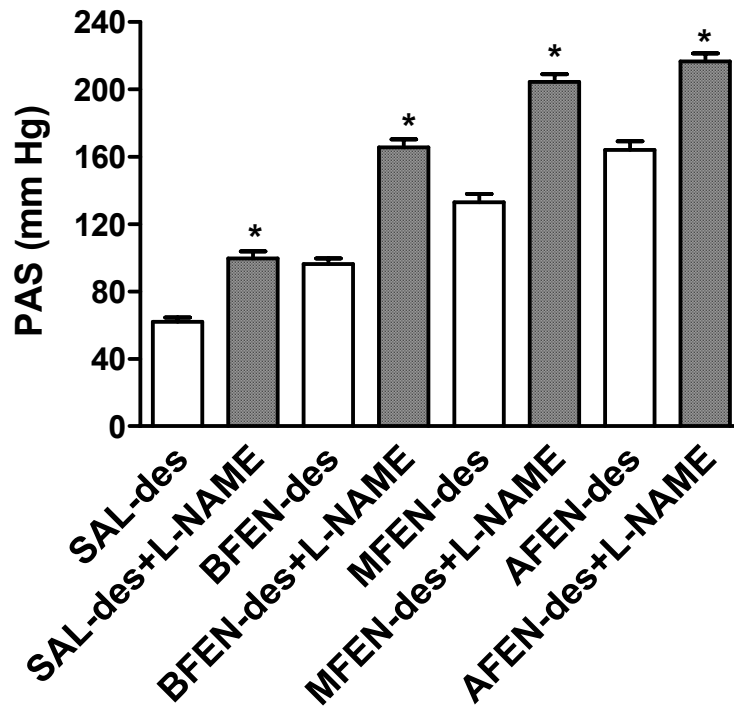


Figura 6A. Efectos en la presión arterial sistólica del éster metilo de N^G-nitro-L-arginina (L-NAME) en ratas desmeduladas con diferentes niveles de tono vascular. Los histogramas representan los valores de presión arterial sistólica (PAS) en las ratas desmeduladas instiladas por vía intravenosa con solución salina ($10 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; Sal-des) o fenilefrina (3, 10 y $30 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des, respectivamente), antes y después de la administración de L-NAME (10mg.kg^{-1} , i.v.; +L-NAME). Los datos son las medias \pm EEM de 8-9 experimentos. * $P < 0.001$ vs. su propio control.

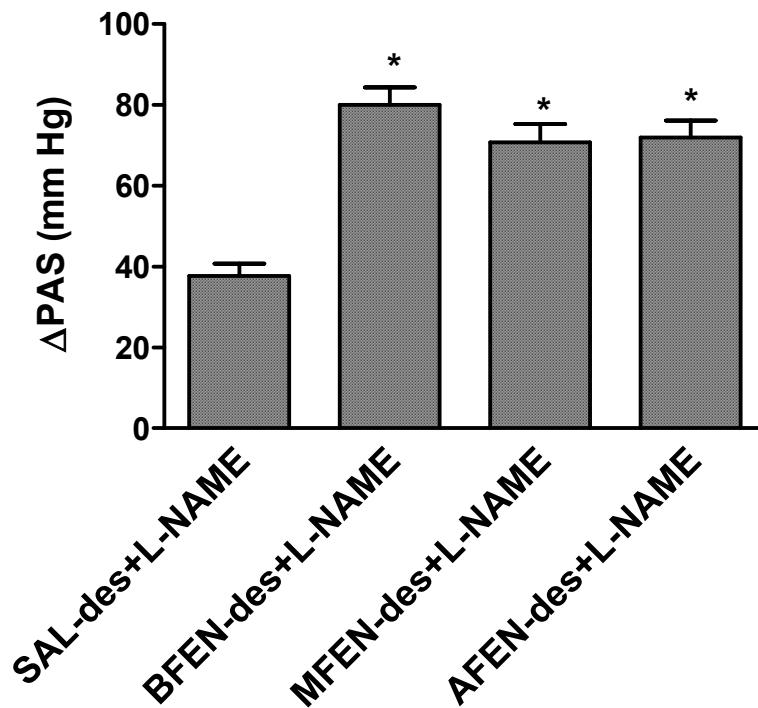


Figura 6B. De los experimentos en la figura 5A, los incrementos en la presión arterial sistólica (Δ PAS) obtenidos con L-NAME (+L-NAME) en los grupos de ratas SAL-des, BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des. Los datos son las medias \pm EEM. * $P < 0.001$ vs. Sal-des+L-NAME.

En las ratas SAL-des, la PP no se modificó durante la respuesta presora del L-NAME (Figura 7A). En cambio, la PP fue significativamente mayor con la administración de L-NAME en los grupos BFEN-des, MFEN-des, y AFEN-des en comparación con sus respectivos controles (Figura 7A). Los valores de PP obtenidos con el L-NAME mostraron el siguiente orden: SAL-des < BFEN-des < MFEN-des ≤ AFEN-des (Figura 7B). Todos los grupos instilados con fenilefrina mostraron una PP inducida por el L-NAME, significativamente más grande que el grupo SAL-des (Figura 7A). Asimismo, la PP en los grupos AFEN-des y MFEN-des fue mayor que la del grupo BFEN-des; sin embargo, no hubo diferencia significativa en la PP entre los grupos MFEN-des y AFEN-des (Figura 7B).

En una serie de experimentos preliminares, los efectos del L-NAME (10 mg.kg⁻¹; i.v.) fueron estudiados en ratas instiladas con 1 µg.kg⁻¹.min⁻¹ de fenilefrina. Los valores de PAD y PAS para el grupos de ratas SAL-des fueron 37 ± 2 y 65 ± 2, y 82 ± 5 y 100±4 mm Hg antes y después de L-NAME, respectivamente, y para el grupo de ratas instilado con fenilefrina (n=8), los valores de PAD y PAS fueron 44±3 y 74±4, y 90±4 y 110±5 mm Hg antes y después de L-NAME, respectivamente. Cuando se compararon apropiadamente, los valores de presión arterial obtenidos con fenilefrina, aunque ligeramente mayores que aquellos de las ratas SAL-des, no alcanzaron diferencia estadística; similarmente, las respuestas vasopresoras del L-NAME no difirieron significativamente de las obtenidas en las ratas SAL-des.

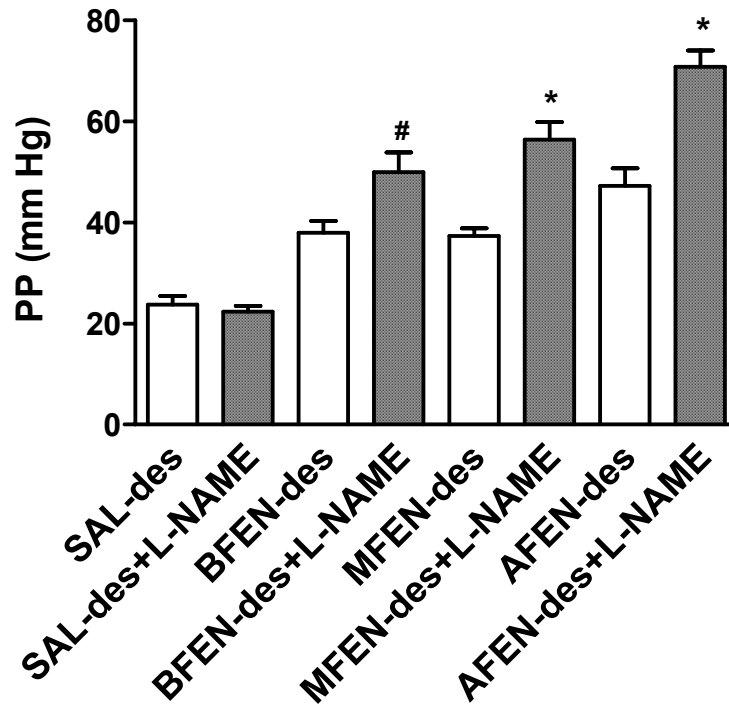


Figura 7A. Efectos del éster metilo de N^G-nitro-L-arginina (L-NAME) sobre la presión del pulso arterial en ratas desmeduladas con diferentes niveles de tono vascular. Los histogramas representan los valores de la presión del pulso arterial (PP) en ratas desmeduladas instiladas por vías intravenosa con solución salina ($10 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; SAL-des) o fenilefrina (3, 10 y $30 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des, respectivamente), antes y después de la administración de L-NAME (10mg.kg^{-1} , i.v.; +L-NAME). Los datos son la medias \pm EEM de 8-9 animales. # $P < 0.05$, * $P < 0.001$ vs. su propio control.

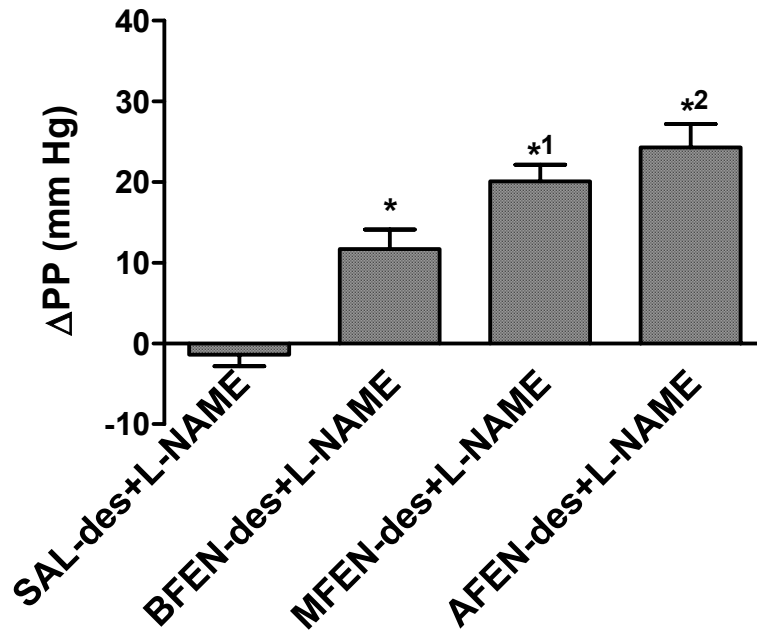


Figura 7B. De los experimentos en la figura 7A, los incrementos en la presión del pulso arterial (Δ PP) obtenidos con el L-NAME (+L-NAME) en los grupos de ratas SAL-des, BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des. Los valores son la medias \pm EEM. * $P < 0.001$ vs. Sal-des+L-NAME. ¹ $P < 0.05$ MFEN-des+L-NAME vs. BFEN-des+L-NAME. ² $P < 0.01$ AFEN-des+L-NAME vs. BFEN-des+L-NAME.

La frecuencia cardiaca (HR) no fue modificada por el L-NAME en los grupos experimentales de ratas (Figura 8). En cambio, como ya se mencionó, las ratas AFEN-des mostraron un aumento significativo de la FC (Figura 4) que fue revertido por el propranolol (Figura 8). Así, la elevada FC observada con el L-NAME en el grupo AFEN-des, fue restituida a valores que no difieren de los otros grupos experimentales mediante el tratamiento con propranolol ($1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.v.) (Figura 8).

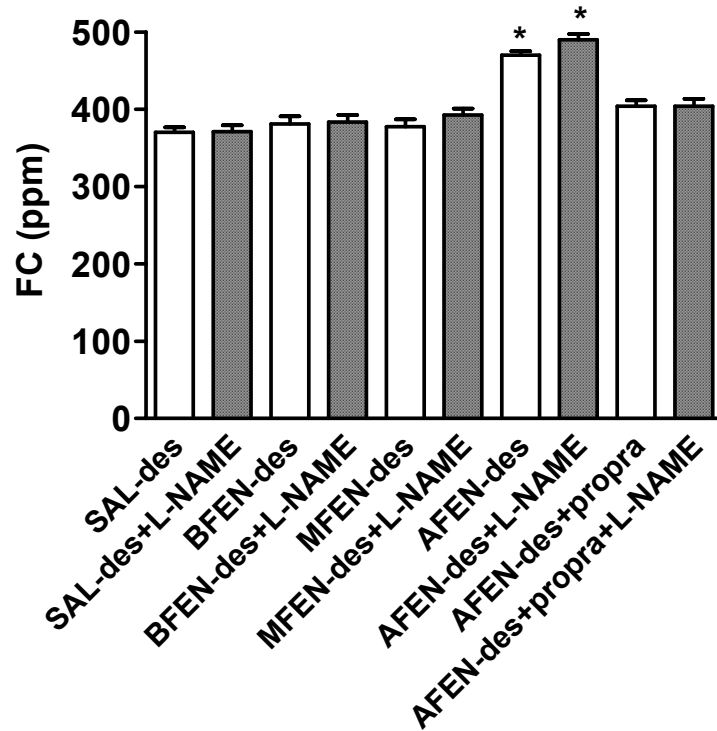


Figura 8. Efectos del éster metilo de N^G-nitro-L-arginina (L-NAME) sobre la frecuencia cardiaca de ratas desmeduladas con diferentes niveles de tono vascular. Los histogramas representan los diferentes valores de la frecuencia cardiaca (FC) en las ratas desmeduladas instiladas por vía intravenosa con solución salina ($10 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; SAL-des) o fenilefrina (3, 10 y $30 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; BFEN-des, MFEN-des y AFEN-des, respectivamente), antes y después de la administración de (10mg.kg^{-1} , i.v.; +L-NAME). Otros dos grupos de ratas AFEN-des, recibieron propranolol (1mg.kg^{-1} , i.v.; +propra) 5 minutos antes que la fenilefrina. Los datos son la medias \pm EEM de 8-9 animales. * $P < 0.001$ vs. SAL-des. Para cada grupo de ratas, note que la FC no fue modificada por el L-NAME en comparación con su propio control.

A diferencia del L-NAME, la administración intravenosa de $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de D-NAME no produjo cambios en la presión sanguínea en otros dos grupos de ratas SAL-des ($n=4$) y BFEN-des ($n=4$) (Figuras 9 y 10). Los valores de PAD y PAS para el grupo SAL-des fueron 42 ± 3 y 61 ± 3 , y 39 ± 3 y 63 ± 2 mm Hg antes y después de D-NAME, respectivamente ($P > 0.05$ en cada caso) (Figura 9); y para el grupo BFEN-des, los valores de PAD y PAS fueron 56 ± 2 y 93 ± 3 , y 54 ± 1 y 101 ± 4 mm Hg antes y después de D-NAME, respectivamente ($P > 0.05$ en cada caso) (Figura 10).

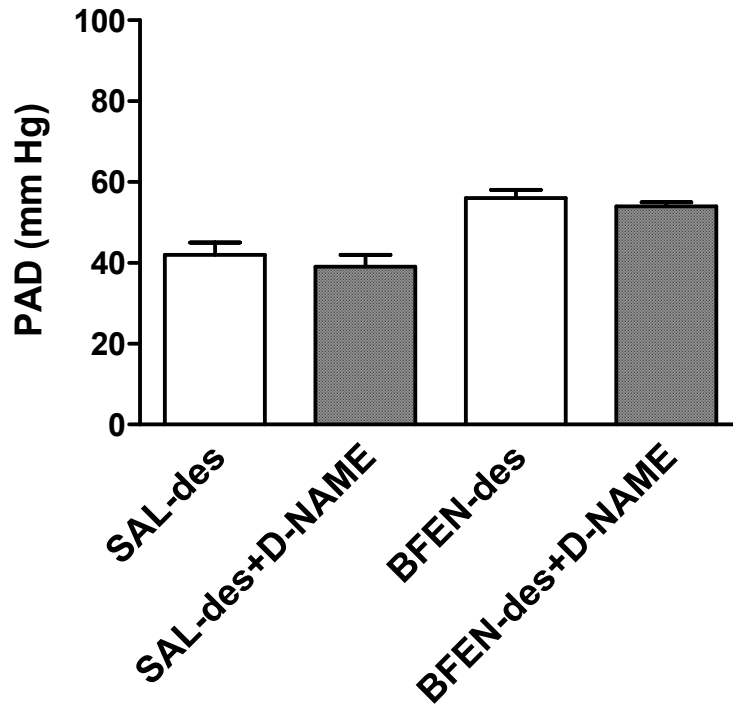


Figura 9. Los valores en la presión arterial diastólica obtenidos con el éster metilo de N^G-nitro-D-arginina (D-NAME) en las ratas desmeduladas con dos niveles diferentes de tono vascular. Los histogramas representan la presión arterial diastólica (PAD) en las ratas desmeduladas instiladas por vía intravenosa con solución salina ($10 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; SAL-des) o fenilefrina ($3 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; BFEN-des, respectivamente), antes y después de la administración de D-NAME (10mg.kg^{-1} , i.v.; +L-NAME). Los datos son las medias \pm EEM de 4 experimentos.

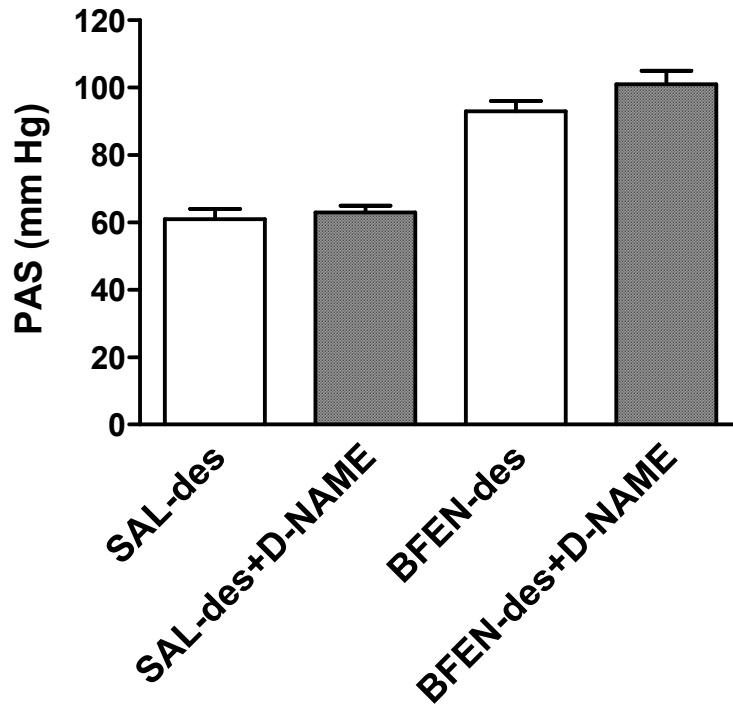


Figura 10. Los valores en la presión arterial sistólica obtenidos con el éster metilo de N^G-nitro-D-arginina (D-NAME) en las ratas desmeduladas con dos niveles diferentes de tono vascular. Los histogramas representan la presión arterial sistólica (PAS) en las ratas desmeduladas instiladas por vía intravenosa con solución salina ($10 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; SAL-des) o fenilefrina ($3 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; BFEN-des, respectivamente), antes y después de la administración de D-NAME (10mg.kg^{-1} , i.v.; +L-NAME). Los datos son las medias \pm EEM de 4 experimentos.

Discusión.

En el presente estudio, los efectos vasopresores del inhibidor de la SON, L-NAME, fueron examinados bajo condiciones experimentales relacionadas con diferentes niveles de tono vasomotor. En experimentos *in vivo*, las respuestas presoras provocadas por los fármacos inhibidores de la SON, son atribuidas al aumento de la resistencia periférica por la inhibición del tono vasodilatador dependiente del ON endotelial (Moncada et al., 1991; Rees et al., 1989; Rubanyi et al., 1986; Ignarro, 1989; Zatz y Baylis, 1998). Sin embargo, la relación entre el tono vascular basal, o la presión arterial, y la magnitud de la respuestas presoras provocadas por los inhibidores de la SON es actualmente motivo de controversia. Varios grupos de investigadores han reportado una correlación positiva entre el valor de presión arterial preexistente y las respuestas presoras ocasionadas por la inhibición de la síntesis de ON en la rata; notablemente, la correlación se observó incluso en condiciones de hipertensión experimental (Vargas et al., 1990; Elayan et al., 2002). En oposición, otros investigadores han reportado que las respuestas presoras provocadas por la inhibición de la síntesis de ON son independientes del tono vascular preexistente (van Gelderen and Saxena, 1991; van Gelderen et al., 1991). Nuestros resultados con animales instilados con fenilefrina, confirman que la producción de ON esta acoplada al tono vascular. En comparación con las ratas SAL-des, los valores más altos de PAS y PAD obtenidos con el L-NAME en los grupos de ratas BFEN-des y MFEN-des, y de PAS en las ratas AFEN-des, implican que el tono vascular incrementado por la fenilefrina puede estar vinculado con la liberación aumentada de ON. Sin embargo, los datos muestran claramente que no existe una correlación positiva entre los incrementos en la presión arterial inducidos por la fenilefrina en los tres grupos de ratas (i.e., BFEN-des < MFEN-des < AFEN-des) y los incrementos en la presión sanguínea causados por el L-NAME. En este sentido, los aumentos en la PAS inducidos por el L-NAME fueron similares entre los tres grupos de ratas tratados con fenilefrina y, de forma

muy clara, se observó una relación inversa entre los incrementos escalonados en la PAD obtenidos con la instilación de fenilefrina y los incrementos en la PAD causados por el L-NAME; es decir, mientras mayor fue el valor estable de presión arterial inducido por la fenilefrina, menor fue el cambio en la PAD producido por el L-NAME. Al final, el aumento en la PAD inducido con el L-NAME en las ratas AFEN-des, fue menor que la respuesta correspondiente en las ratas SAL-des.

Los diferentes niveles de presión sanguínea obtenidos en los grupos de ratas BFEN-des, MFEN-des, y AFEN-des se consideran fundamentalmente dependientes del aumento en la actividad contráctil del músculo liso vascular producido por el agonista de AR- α_1 , fenilefrina. La liberación de ON en nuestras condiciones experimentales, puede relacionarse principalmente con dos variables funcionales: el estrés por fricción de flujo (Moncada et al., 1991; Rees et al., 1989; Rubanyi et al., 1986; Ignarro, 1989; Zatz y Baylis, 1998; Pohl et al., 1993; Stauss y Persson, 2000) y la contracción del músculo liso vascular *per se* (Dora et al, 1997, 2003; Dimmeler et al., 1999; Fleming et al., 1999). En principio, la magnitud de ambas variables puede aumentar de forma dependiente de la dosis de instilación de fenilefrina y, en consecuencia, incrementar la liberación endotelial de ON y el tono vasodilatador. De esta forma, resulta aparentemente inconsistente la falta de correlación positiva entre el tono vascular previamente establecido con la fenilefrina y la dimensión de las respuestas vasopresoras del L-NAME. De hecho, la relación entre estas variables ha resultado ser compleja.

Como se mencionó, los incrementos de la PAD y la PAS obtenidos con el L-NAME alcanzaron un máximo con el desarrollo de un tono vasomotor moderado en el grupo de ratas BFEN-des (presión arterial próxima a la normotensión). Cuando el incremento del tono vascular basal fue mayor antes de la inhibición de la síntesis de ON (grupos de ratas MFEN-des y AFEN-des), el incremento en la PAS producido por el L-NAME permaneció relativamente constante; sin embargo, el incremento en la

PAD fue reducido. Además, las respuestas vasopresoras del L-NAME obtenidas en presencia de una dosis de fenilefrina media unidad de logaritmo menor que la usada en las ratas BFEN-des, no difirieron estadísticamente de aquellas obtenidas con el inhibidor en las ratas SAL-des. Así, observamos una relación entre el efecto presor del L-NAME y el tono vasomotor basal para un valor moderado del tono, pero especulamos que la estimulación periférica de la síntesis de ON pudo haber alcanzado valores próximos al máximo en las ratas BFEN-des; consecuentemente, el estrés por fricción y la actividad contráctil posiblemente continuaron aumentando en las ratas MFEN-des y AFEN-des, sin producir efectos apreciables en el tono vascular dependiente de ON. Por otra parte, el efecto vasoconstrictor generalizado de la fenilefrina, al causar aumento de la presión arterial y reducción de la perfusión tisular, muy posiblemente activó otros mecanismos reguladores del flujo sanguíneo (Stauss y Persson, 2000; van Gelderen y Saxena, 1992). Como resultado, la relación cuantitativa entre el tono vascular y la liberación de ON, pudo haber sido importantemente afectada por la participación de otros mecanismos vasodilatadores.

Los valores de la PP aumentaron con las respuestas presoras provocadas por el L-NAME en los tres grupos de ratas instiladas con fenilefrina. Además, el aumento en la PP producido por el L-NAME fue mayor conforme se incrementó el valor de la presión arterial control. El orden creciente de valores de la PP obtenido con el L-NAME fue: SAL-des < BFEN-des < MFEN-des < AFEN-des. Ahora, es importante hacer una consideración fundamental. La magnitud del aumento en la PAS (Δ PAS) con el L-NAME después de la administración de fenilefrina, permaneció estable para las tres dosis y, así, no fue dependiente de la dosis; no obstante, el valor absoluto de la PAS con el L-NAME después de la instilación de fenilefrina, aumentó de forma dependiente de la dosis (BFEN-des < MFEN-des < AFEN-des). De forma similar, el valor absoluto de la PAD obtenido con el L-NAME en los animales tratados con fenilefrina, aumentó de forma dependiente de la dosis (BFEN-des <

MFEN-des \approx AFEN-des), aún cuando la magnitud del aumento en la PAD (Δ PAD) con L-NAME después de los tratamientos con fenilefrina, disminuyó en la forma previamente descrita. En consecuencia, el incremento en la PP después del L-NAME fue debido a un aumento de la PAS dependiente de la dosis, mientras que ocurrió un incremento menor (o falta de aumento, como en el caso de las ratas AFEN-des), también dosis dependiente, de la PAD. Por otra parte, en el grupo de ratas SAL-des, el L-NAME aumentó la PAS y la PAD en la misma proporción conduciendo a una PP estable (no diferente del control). Esto sugiere un aumento predominante en el tono de las arterias de resistencia después del L-NAME (disminución en la disponibilidad de ON), sin cambio significativo en la distensibilidad arterial (ver adelante) cuando la inhibición de la síntesis de ON ocurre en presencia de tono vascular muy bajo. En contraste, es importante hacer énfasis, desde las ratas BFEN-des hasta las AFEN-des, los incrementos absolutos en la PAS después del L-NAME fueron mayores que aquellos en la PAD, conduciendo a aumentos en la PP y así, proponemos, desenmascarando indirectamente el papel de la síntesis de ON en la regulación del tono y distensibilidad de las arterias proximales de conducción.

La presión del pulso arterial está principalmente determinada por la resistencia periférica y las propiedades elásticas de la aorta (más del 60% de la distensibilidad arterial total reside en la aorta) (Stergiopulos y Westerhof, 1998; Stergiopolus et al., 1996). Además, es necesario considerar el efecto modulador de los parámetros cardíacos (Stergiopulos et al., 1996). Asumiendo que éstos no variaron durante la administración de L-NAME (en este trabajo, la FC no fue modificada por el L-NAME, y no encontramos evidencia disponible que indique que el L-NAME aumente el volumen latido), una reducción proporcional de la distensibilidad arterial puede explicar los incrementos en la PP ocasionados por el inhibidor de la SON. Es importante considerar que: (i) las arterias en las ratas (como en otras especies), han mostrado poseer un poderoso mecanismo vasodilatador dependiente de la síntesis y liberación de ON por el

endotelio (Vanhoutte, 2003; Safar y Laurent, 2003); (ii) la modificación aguda de la velocidad del flujo es considerada el más importante determinante fisiológico del aumento del estrés por fricción en el endotelio (Stauss y Persson, 2000); y (iii) la mayor velocidad del flujo sanguíneo durante la fase rápida de eyección sistólica se observa en la aorta. De esta forma, durante la fase de eyección sistólica, el ON liberado por estrés por fricción dependiente del flujo puede participar funcionalmente en relación con la distensibilidad aórtica. El incremento en la PP inducido por el L-NAME sugiere la participación del ON en el aumento dinámico del diámetro arterial durante la sístole ventricular y, también en relación con las arterias, indica que la liberación fisiológica del ON es sensible al flujo pulsátil (Hutcheson y Griffith, 1991). Por otra parte, la distensibilidad arterial disminuye con los valores altos de presión arterial; así para el L-NAME, y en estos términos para cualquier sustancia vasopresora, la PP y las respuestas presoras serán afectadas en condiciones experimentales de hipertensión.

En relación al mecanismo probable por el cual el efecto presor del L-NAME en la PAD disminuye mientras que el tono vascular basal aumenta con la fenilefrina, nosotros consideramos la siguiente explicación. Principalmente en condiciones de hipertensión, las arterias son menos distensibles a mayores que menores valores de presión arterial, y un aumento de la resistencia periférica aumentará la PAS más que la PAD. Así, en nuestros experimentos con fenilefrina, cuando la presión arterial basal aumentó substancialmente, la notable combinación de incremento en la resistencia y disminución de la distensibilidad arterial ocasionadas por el L-NAME, elevaron la PAS más que la PAD. Además, cuando las arterias se tornan menos distensibles acomodan un incremento menor del volumen latido durante la fase de eyección rápida, y así aumenta la fracción del volumen sanguíneo que abandona las arterias durante el mismo período (lo cual se asocia con una disminución acelerada de la presión durante la diástole). En consecuencia, durante la diástole tardía se obtiene una presión arterial reducida (es decir, PAD para el caso).

Finalmente, cabe mencionar que los factores biológicos que modulan la PP y la distensibilidad arterial han sido estudiados principalmente en modelos genéticos de hipertensión en ratas (Safar y Laurent, 2003; Fitch y Vergona, 2001; Susic et al., 2001), e involucran sobre todo al ON y agentes vasoconstrictores. Varios estudios, en conjunto, sugieren que la supresión aguda de ON endógeno disminuye la distensibilidad arterial de manera independiente de los cambios en presión arterial media y que un sistema endógeno intacto de ON se requiere para mantener la elasticidad arterial (Safar y Laurent, 2003; Fitch y Vergona, 2001; Susic et al., 2001).

Conclusión.

Las respuestas vasopresoras producidas por el inhibidor de la SON, L-NAME, en las ratas desmeduladas son influenciadas por el tono vasomotor preexistente de manera compleja. No encontramos una simple correlación positiva entre el tono vascular o nivel de presión arterial, y la magnitud de las respuestas presoras diastólica y sistólica obtenidas con el L-NAME. Un hallazgo interesante fue, empero, que el incremento en la PP inducido por el L-NAME fue mayor en concordancia con el incremento del valor de la presión arterial de base. La inhibición de la síntesis de ON en el endotelio arterial puede explicar el incremento de la PP causado por el L-NAME, como el resultado de la reducción de la capacidad funcional de las arterias para aumentar su diámetro durante la sístole ventricular. Además, las arterias se torna menos distensibles cuando son estiradas por la presión arterial sanguínea elevada, de forma que para el L-NAME la PP aumentó en condiciones experimentales de hipertensión.

Bibliografia.

Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(22):10769-10772.

Altman JD, Kinn J, Duncker DJ, Bache RJ. Effect of inhibition of nitric oxide formation on coronary blood flow during exercise in the dog. *Cardiovasc Res.* 1994; 28(1):119-124.

Anderson KM, Faber JE. Differential sensitivity of arteriolar alpha1- and alpha2-adrenoceptor constriction to metabolic inhibition during rat skeletal muscle contraction. *Circ Res.* 1991; 69: 174–184.

Baumann JE, Persson PB, Ehmke H, Nafz B, Kirchheim HR. Role of endothelium-derived relaxing factor in renal autoregulation in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1992; 263(2 Pt 2): F208-213.

Beierwaltes WH, Sigmon DH, Carretero OA. Endothelium modulates renal blood flow but not autoregulation. *Am J Physiol.* 1992; 262(6 Pt 2): F943-949.

Berk BC, Corson MA, Peterson TE, Tseng H. Protein kinases as mediators of fluid shear stress stimulated signal transduction in endothelial cells: a hypothesis for calcium-dependent and calcium-independent events activated by flow. *J Biomech.* 1995; 28:1439-1450.

Berg BR, Cohen KD, and Sarelius IH. Direct coupling between blood flow and metabolism at the capillary level in striated muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995; 268: H1215–H1222.

Berne RM. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 204: 317–322, 1963.

Berne RM. Regulation of coronary blood flow. *Physiol Rev* 44: 1–29, 1964.

Brzezinska AK, Merkus D, and Chilian WM. Metabolic communication from cardiac myocytes to vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2232–H2237, 2005.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 1991; 351: 714-718.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990; 347: 768-770.

Brenman JE, Xia H, Chao DS, Black SM, Bredt DS. Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev Neurosci*. 1997; 19(3): 224-231.

Buckwalter JB, Curtis VC, Valic Z, Ruble SB, Clifford PS. Endogenous vascular remodeling in ischemic skeletal muscle: a role for nitric oxide. *J Appl Physiol* 2003; 94(3): 935 - 940.

Buga GM, Gold ME, Fukuto JM, Ignarro LJ. Shear stress–induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension*. 1991; 17: 187-193.

Buga GM, Griscavage JM, Rogers NE, Ignarro LJ. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ Res*. 1993; 73: 808-812.

Busse R, Mulsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1990; 275: 87-90.

Calver A, Collier J, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens.* 1992; 10: 1025-1031.

Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 24(6):1468-1474.

Charles IG, Palmer RMJ, Hickery MS, Baylis MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S. Cloning, characterization and expression of cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 11419-11423.

Chilian, W. M., C. L. Eastham, and M. L. Marcus. Microvascular distribution of coronary vascular resistance in beating left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1986; 251 (20): H779–H788.

Clementi E, Brown GC, Foxwell N, Moncada S. On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(4):1559-1562.

Clifford PS, Hellsten Y. Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2004; 97(1):393-403.

Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Benjamin N, Ritter JM. Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1036-1040.

Cohen KD and Sarelius IH. Muscle contraction under capillaries in hamster muscle induces arteriolar dilatation via KATP channels and nitric oxide. *J Physiol* 2002; 539: 547–555.

Cooke JP, Stamler J, Andon N, Davies PF, McKinley G, Loscalzo J. Flow stimulates endothelial cells to release a nitrovasodilator that is potentiated by reduced thiol. *Am J Physiol*. 1990; 259: H804-H812.

Cooke JP, Tsao PS. Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb*. 1994; 14(5): 653-5.

Dakak N, Husain S, Mulcahy D, Andrews NP, Panza JA, Waclawiw M, Schenke W, Quyyumi AA. Contribution of nitric oxide to reactive hyperemia: impact of endothelial dysfunction. *Hypertension*. 1998; 32(1):9-15.

Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*. 1999; 79(2): 387-423.

de Wit C. Closing the Gap at Hot Spots. *Circ Res*. 2007; 100(7): 931 - 933.

de Wit C, Jahrbeck B, Schäfer C, Bolz SS, Pohl U. Nitric oxide opposes myogenic pressure responses predominantly in large arterioles in vivo. *Hypertension*. 1998; 31(3):787-794.

de Wit, C., P. von Bismarck, Pohl U. Synergistic action of vasodilators that increase cGMP and cAMP in the hamster cremaster microcirculation. *Cardiovasc Res*. 1994; 28: 1513–1518.

Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601-605.

Dinerman JL, Lowenstein CJ, Solomon HS. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation: potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res*. 1993; 73: 217-222.

Djordjevic S, Roberts DL, Wang M, Shea T, Camitta MG, Masters BS, Kim JJ. Crystallization and preliminary x-ray studies of NADPH-cytochrome P450 reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(8): 3214-8.

Dora K.A., Doyle M.P., Duling B.R. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(12): 6529-6534.

Dora K.A., Xia J., Duling B.R. Endothelial cell signaling during conducted vasomotor responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(1): H1119-1126.

Dora KA, Hinton JM, Walker SD, et al. An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium-derived vasodilators in rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 2000;129: 381-387.

Duling BR, Hogan RD, Langille BL, Lelkes P, Segal SS, Vatner SF, Weigelt H, Young MA. Vasomotor control: functional hyperemia and beyond. *Fed Proc*. 1987; 46(2):251-263.

Duncker DJ, van Zon NS, Pavek TJ, Herrlinger SK, and Bache RJ. Endogenous adenosine mediates coronary vasodilation during exercise after K(ATP) channel blockade. *J Clin Invest* 95: 285–295, 1995.

Eigenthaler M, Lohmann SM, Walter U, Pilz RB. Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999; 135: 173-209.

Elayan H.H., Kennedy B.P., Ziegler M.G. The pressor effect of NO synthase inhibition correlates to pre-existing systolic BP in the rat. *Auton. Neurosci.* (2002) **95**(1-2) 32-36.

Endo T, Imaizumi T, Tagawa T, Shiramoto M, Ando S, Takeshita A. Role of nitric oxide in exercise-induced vasodilation of the forearm. *Circulation.* 1994; 90(6): 2886-2890.

Engelke KA, Halliwill JR, Proctor DN, Dietz NM, Joyner MJ. Contribution of nitric oxide and prostaglandins to reactive hyperemia in human forearm. *J Appl Physiol.* 1996; 81(4): 1807-1814.

Falloon BJ, Heagerty AM. In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension.* 1994; 24: 16-23.

Fitch R.M., Vergona R., Sullivan M.E., Wang Y-X. Nitric oxide synthase inhibition increases aortic stiffness measured by pulse wave velocity in rats. *Cardiovasc. Res.* (2001) **51** 351-358.

Fleming I. Bobbing Along on the Crest of a Wave: NO Ascends Hamster Cheek Pouch Arterioles. *Circ Res.* 2003; 93(1): 9 -11.

Fleming I., Bauersachs J., Schafer A., Scholz D., Aldershvile J., Busse R. Isometric contraction induces the Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(3): 1123-1128.

Förstermann U, Closs EI, Pollock J, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension.* 1994; 23: 1121-1131.

Frame MD, Sarelius IH. L-arginine-induced conducted signals alter upstream arteriolar responsivity to L-arginine. *Circ Res.* 1995; 77(4): 695-701.

Francis SH, Corbin JD. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol.* 1994; 56: 237-272.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399: 597-601.

Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-376.

Garg VC, Hassid A. Nitric-oxide generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989; 83: 1774-1777.

Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem J.* 1998; 332 (Pt 3): 673-679.

Gong, MC, Iizuka K, Nixon G, Browne JP, Hall A, Eccleston JF, Sugai M, Kobayashi S, Somlyo AV, Somlyo AP. Role of guanosine nucleotide-binding proteins ras family or trimeric proteins or both in Ca²⁺ sensitization in smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 1340-1345.

Griffith TM, Edwards DH. Myogenic autoregulation of flow may be inversely related to endothelium-derived relaxing factor activity. *Am J Physiol.* 1990; 258(4 Pt 2): H1171-1180.

Griffith, T. M., D. H. Edwards, R. L. I. Davies, T. J. Harrison, and K. T. Evans. EDRF coordinates the behaviour of vascular resistance vessels. *Nature* 1987; 329: 442–445.

Gross R, Kirchheim H, Brandstetter K. Basal vascular tone in the kidney. Evaluation from the static pressure-flow relationship under normal autoregulation and at maximal dilation in the dog. *Circ Res.* 1976; 38(6): 525-531.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986; 320(6061): 454-456.

Hayashi Y, Tomoike H, Nagasawa K, Yamada A, Nishijima H, Adachi H, Nakamura M. Functional and anatomical recovery of endothelium after denudation of coronary artery. *Am J Physiol.* 1988; 254(6 Pt 2):H1081-1090.

Haynes W.G., Noon J.P., Walker B.R., Webb D.J. Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J. Hypertens.* (1993) 11 1375–1380.

Hester RL, Eraslan A, Saito Y. Differences in EDNO contribution to arteriolar diameters at rest and during functional dilation in striated muscle. *Am J Physiol.* 1993; 265(1 Pt 2):H146-151.

Hintze TH, Vatner SF. Reactive dilation of large coronary arteries in conscious dogs. *Circ Res.* 1984; 54(1):50-57.

Hirai T, Visneski MD, Kearns KJ, Zelis R, Musch TI. Effects of NO synthase inhibition on the muscular blood flow response to treadmill exercise in rats. *Appl Physiol.* 1994; 77(3):1288-1293.

Hirooka Y, Imaizumi T, Masaki H, Ando S, Harada S, Momohara M, Takeshita A. Captopril improves impaired endothelium-dependent vasodilation in hypertensive patients. *Hypertension*. 1992; 20: 175-180.

Hofmann, F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinase. *J Cell Sci*. 2000; 113: 1671-1676.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995; 377: 239-242.

Hussain SN, Stewart DJ, Ludemann JP, Magder S. Role of endothelium-derived relaxing factor in active hyperemia of the canine diaphragm. *J Appl Physiol*. 1992; 72(6):2393-2401.

Hutcheson I.R., Griffith T.M. Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. *Am. J. Physiol.* (1991) **261**(1 Pt 2) H257-262.

Ishibashi Y, Duncker DJ, Zhang J, and Bache RJ. ATP-sensitive K⁺ channels, adenosine, and nitric oxide-mediated mechanisms account for coronary vasodilation during exercise. *Circ Res* 82: 346–359, 1998.

Ignarro L.J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 1989; 65: 1-21.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 9265–9269.

Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 170: 843-850.

Ignarro LJ. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels*. 1991; 28: 67-73.

Johnson RA, Freeman RH. Sustained hypertension in the rat induced by chronic blockade of nitric oxide production. *Am J Hypertens*. 1992; 5: 919-922.

Johnson, RM, Lincoln TM. Effects of nitroprusside, glyceryl trinitrate and 8-bromo-cyclic GMP on phosphorylase a formation and myosin light chain. *Mol Pharmacol*. 1985; 27: 333-342.

Jones CJ, Kuo L, Davis MJ, DeFily DV, Chilian WM. Role of nitric oxide in the coronary microvascular responses to adenosine and increased metabolic demand. *Circulation*. 1995; 91(6):1807-1813.

Jones SC, Radinsky CR, Furlan AJ, Chyatte D, Perez-Trepichio AD. Cortical NOS inhibition raises the lower limit of cerebral blood flow-arterial pressure autoregulation. *Am J Physiol*. 1999; 276(4 Pt 2):H1253-1262.

Katusic ZS, Cosentino F. Nitric oxide synthase: from molecular biology to cerebrovascular physiology. *News Physiol Sci*. 1994; 9: 64-67.

Kawada, T, Toyosato A, Islam O, Yoshida Y, Imai S. cGMP-kinase mediates cGMP- and cAMP-induced Ca desensitization of skinned rat artery. *Eur J Pharmacol* 1997; 323: 75-82.

Kerkhof CJ, Van Der Linden PJ, and Sipkema P. Role of myocardium and endothelium in coronary vascular smooth muscle responses to hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1296–H1303, 2002.

Kimura, K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996; 273: 245-248.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*. 1994; 298: 249-258.

Koller A, Kaley G. Prostaglandins mediate arteriolar dilation to increased blood flow velocity in skeletal muscle microcirculation. *Circ Res*. 1990; 67(2): 529-534.

Koller A, Kaley G. Role of endothelium in reactive dilation of skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol*. 1990; 259(5 Pt 2):H1313-1316.

Kostic MM, Schrader J. Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. *Circ Res*. 1992; 70(1):208-212.

Kuo L, Chilian WM, Davis MJ. Interaction of pressure- and flow-induced responses in porcine coronary resistance vessels. *Am J Physiol*. 1991; 261(6 Pt 2): H1706-1715.

Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol*. 1990; 259(4 Pt 2): H1063-1070.

Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Longitudinal gradients for endothelium-dependent and -independent vascular responses in the coronary microcirculation. *Circulation* 1995; 92: 518–525.

Lamontagne D, Pohl U, Busse R. Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. *Circ Res*. 1992; 70: 123-130.

Lau KS, Grange RW, Isotani E, Sarelius IH, Kamm KE, Huang PL, Stull JT. nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle. *Physiol Genomics* 2000; 2(1): 21 - 27.

Laurent S, Lacolley P, Brunel P, Laloux B, Pannier B, Safar M. Flow-dependent vasodilatation of brachial artery in essential hypertension. *Am J Physiol*. 1990; 258: H1004-H1011.

Lee MR, Li L, Kitazawa T. Cyclic GMP causes Ca desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*. 1997; 272: 5063-5068.

Lincoln TM, Dey N, Sellak H. cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol*. 2001; 91(3): 1421-1430.

Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Lüscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo: blunted response to essential hypertension. *Circulation*. 1990; 81: 1762-1767.

Lohmann, SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, DeJonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*. 1997; 22: 307-312.

Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*. 1992; 70: 705-707.

Lüscher TF, Diederich D, Siebenmann R. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med*. 1988; 318: 462-467.

Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham J. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem.* 1992; 267: 6370-6374.

Macedo MP, Lautt WW. Autoregulatory capacity in the superior mesenteric artery is attenuated by nitric oxide. *Am J Physiol* 1996; 271(3 Pt 1): G400-404.

Majid DS, Navar LG. Suppression of blood flow autoregulation plateau during nitric oxide blockade in canine kidney. *Am J Physiol.* 1992; 262(1 Pt 2):F40-46.

Malinski T, Taha Z, Grunfeld S, Patton S, Kapturczak M, Tombouliau P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 193(3): 1076-1082.

Malinski T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature.* 1992; 358: 676-678.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993; 268: 12231-12234.

Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986; 237(2): 529-38.

Melkumyants AM, Balashov SA, Klimachev AN, Kartamyshev SP, Khayutin VM. Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart. *Circulation.* 1995; 92(3):320-326. *Nitric oxide does not mediate flow induced endothelium dependent arterial dilatation in the cat. *Cardiovasc Res.* 1992; 26(3):256-260.

Melkumyants, A. M., S. A. Balashov, and V. M. Khayutin. Control of arterial lumen by shear stress on endothelium. *News Physiol Sci* 1995; 10: 204–210.

Moncada S, Palmer R, Higgs E., Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43: 109-142.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans.* 1989; 17(4): 642-644.

Mortensen SP, González-Alonso J, Damsgaard R, Saltin B, Hellsten Y. Inhibition of nitric oxide and prostaglandins, but not endothelial-derived hyperpolarizing factors, reduces blood flow and aerobic energy turnover in the exercising human leg. *J Physiol.* 2007; 581(Pt 2):853-861.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6(12): 3051-3064.

Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1992; 90: 2092–2096.

Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, Koketsu N, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH. Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibres in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993; 13: 70-79.

O'Leary DS, Dunlap RC, Glover KW. Role of endothelium-derived relaxing factor in hindlimb reactive and active hyperemia in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1994; 266(4 Pt 2): R1213-1219.

Palmer R, Aston D, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333: 664-666.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond)*. 1987; 327: 524–526.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990; 323: 22-27.

Panza JA, Quyyumi AA, Callahan TS, Epstein SE. Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 21: 1145-1151.

Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J*. 1998; 11: 3045-3051.

Pierzga JM, Segal SS. Spatial relationships between neuromuscular junctions and microvessels in hamster cremaster muscle. *Microvasc Res*. 1994; 48: 50–67.

Pohl U, Lamontagne D, Bassenge E, Busse R. Attenuation of coronary autoregulation in the isolated rabbit heart by endothelium derived nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1994; 28(3):414-419.

Pohl U., Wagner K., de Wit C. Endothelium-derived nitric oxide in the control of tissue perfusion and oxygen supply: physiological and pathophysiological implications. *Eur Heart J* 1993; 14: 93-98.

Pohl, U., K. Herlan, A. Huang, and E. Bassenge. EDRF-mediated, shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1991; 261(30): H2016–H2023.

Puybasset L, Béa ML, Ghaleh B, Giudicelli JF, Berdeaux A. Coronary and systemic hemodynamic effects of sustained inhibition of nitric oxide synthesis in conscious dogs. Evidence for cross talk between nitric oxide and cyclooxygenase in coronary vessels. *Circ Res*. 1996;79(2):343-357.

Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO 3rd. Contribution of nitric oxide to metabolic coronary vasodilation in the human heart. *Circulation*. 1995;92(3): 320-326.

Rees D.D., Palmer R.M., Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1989) **86** 3375–3378.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990; 101(3): 746-752.

Rodenwaldt B, Pohl U, de Wit C. Endogenous and exogenous NO attenuates conduction of vasoconstrictions along arterioles in the microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292(5): H2341-2348.

Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986; 250: H1145-H1149.

Safar M.E., Laurent P. Pulse pressure and arterial stiffness in rats: comparison with humans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2003) **285** H1363-1369.

Saltin B. Exercise hyperaemia: magnitude and aspects on regulation in humans. *J Physiol*. 2007; 583(Pt 3): 819-823.

Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1178(2): 153-175.

Schretzenmayr A. Über kreislaufregulatorische Vorgänge an den großen Arterien bei der Muskelarbeit. *Pflüegers Arch Ges Physiol* 1933; 232: 743-748.

Scott-Burden T, Elizondo E, Ge T, Boulanger CM, Vanhoutte PM. Simultaneous activation of adenylyl cyclase and protein kinase C induces production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1994; 46: 274-282.

Segal SS and Duling BR. Propagation of vasodilation in resistance vessels of the hamster: development and review of a working hypothesis. *Circ Res* 1987; 61: 1120–1125.

Segal SS. Integration of blood flow control to skeletal muscle: key role of feed arteries. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 511–518.

Segal, S. S., D. N. Damon, and B. R. Duling. Propagation of vasomotor responses coordinates arteriolar resistances. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1989; 256(25): H832–H837.

Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1992; 267: 15274–15276.

Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res.* 1994; 74: 349-353.

Shen W, Hintze TH, Wolin MS. Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation.* 1995; 92(12):3505-3512.

Shen W, Lundborg M, Wang J, Stewart JM, Xu X, Ochoa M, Hintze TH. Role of EDRF in the regulation of regional blood flow and vascular resistance at rest and during exercise in conscious dogs. *J Appl Physiol.* 1994; 77(1):165-172.

Smith TP Jr, Canty JM Jr. Modulation of coronary autoregulatory responses by nitric oxide. Evidence for flow-dependent resistance adjustments in conscious dogs. *Circ Res.* 1993;73(2):232-240.

Stauss H.M., Persson P.B. Role of Nitric Oxide in Buffering Short-Term Blood Pressure Fluctuations. *News Physiol Sci* 2000; 15: 229-233.

Stergiopoulos N., Westerhof N. Determinants of pulse pressure. *Hypertension* (1998) **32**(3) 556-559.

Stergiopoulos N., Meister J.J., Westerhof N. Determinants of stroke volume and systolic and diastolic aortic pressure. *Am. J. Physiol.* (1996) **270**(6 Pt 2) H2050-2059.

Surks, HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, and Mendelsohn ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I. *Science.* 1999; 286: 1583-1587.

Susic D., Varagic J., Frohlich E.D. Isolated systolic hypertension in elderly WKY is reversed with L-arginine and ACE inhibition. *Hypertension* (2001) **19** 1422-1426.

Tabrizchi R., Triggle C.R. Influence of N omega-nitro-L-arginine methyl on pressor responses elicited by sympathetic nerve stimulation in pithed normotensive and hypertensive rats. *Life Sci.* (1991) **49**(26) 1989-1995.

Taddei S, Mattei P, Viridis A, Sudano I, Chiadoni L, Salvetti A. Effect of potassium on vasodilation to acetylcholine in essential hypertension. *Hypertension.* 1994; 23: 485-490.

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation.* 1998; 97(22): 2222-2229.

Taddei S, Viridis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilatation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension.* 1993; 21: 929-933.

Takano H., Dora K.A., Garland C.J. Spreading vasodilatation in resistance arteries. *J. Smooth Muscle Res* 2005; 41(6): 303-311.

Talman WT, Dragon DN. Inhibition of nitric oxide synthesis extends cerebrovascular autoregulation during hypertension. *Brain Res.* 1995; 672(1-2): 48-54.

Tanaka K, Fukuuchi Y, Gomi S, Mihara B, Shirai T, Nogawa S, Nozaki H, Nagata Inhibition of nitric oxide synthesis impairs autoregulation of local cerebral blood flow in the rat. *Neuroreport.* 1993; 4(3):267-270.

Tesfamariam B, Cohen RA. Inhibition of adrenergic vasoconstriction by endothelial cell shear stress. *Circ Res* 1988; 63(4): 720-725.

Thom SA, Hughes AD, Martin GN, Sever PS. The release of the endothelium derived relaxing factor from isolated human arteries. *J Hypertens Suppl.* 1985; 3: S97-S99.

Thompson BG, Pluta RM, Girton ME, Oldfield EH. Nitric oxide mediation of chemoregulation but not autoregulation of cerebral blood flow in primates. *J Neurosurg.* 1996; 84(1):71-78.

Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. *Pharmacol Rev.* 2007; 59(1): 54-87.

Toda N, Okamura T. Modification by L-NG-monomethyl-arginine (L-NMMA) of the response to nerve stimulation in isolated dog mesenteric and cerebral arteries. *J Pharmacol (Jpn).* 1989; 52: 171-173.

Toda N, Okamura T. Role of nitric oxide in neurally induced cerebroarterial relaxation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 258: 1027-1032.

Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev* 2003; 55(2): 271-324.

Topouzis S, Schott C, Stoclet JC. Participation of endothelium-derived relaxing factor and role of cyclic GMP in inhibitory effects of endothelium on contractile responses elicited by alpha-adrenoceptor agonists in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;18(5): 670-678.

Torrecillas, G, Diez-Marques ML, Garcia-Escribano C, Bosch RJ, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. Mechanisms of cGMP-dependent mesangial cell relaxation: a role for myosin light chain phosphatase activation. *Biochem J.* 2000; 346: 217-222.

Treasure CB, Manoukian SV, Klein JL, Vita JA, Nabel EG, Renwick GH, Selwyn AP, Alexander RW, Ganz P. Epicardial coronary artery responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients. *Circ Res.* 1992; 71: 776-781.

Ueeda M, Silvia SK, Olsson RA. Nitric oxide modulates coronary autoregulation in the guinea pig. *Circ Res.* 1992; 70(6):1296-1303.

Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989; 2: 997-1000.

Van Gelderen E.M., Saxena P.R. Effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester on the hypotensive and hypertensive responses to 5-hydroxytryptamine in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* (1992) **222**(2-3) 185-191.

Van Gelderen E.M., Heiligers J.P., Saxena P.R. Haemodynamic changes and acetylcholine-induced hypotensive responses after N^G-nitro-L-arginine methyl ester in rats and cats. *Br. J. Pharmacol.* (1991) **103**(4) 1899-1904.

Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function. From health to coronary disease. *Circ J.* 2003; 67: 572-575.

Vanhoutte P.M., Mombouli J.V. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* (1996) **39**(3) 229-238.

Vargas H.M., Ignarro L.J., Chaudhuri G. Physiological release of nitric oxide is dependent on the level of vascular tone. *Eur. J. Pharmacol.* (1990) **190**(3) 393-397.

Vecchione C, Maffei A, Colella S, et al. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes.* 2002; 51: 168-173.

Walsh MP, Marshall JM: The early effects of chronic hypoxia on the cardiovascular system in the rat: role of nitric oxide. *J Physiol*. 2006; 575(1): 263 - 275.

Wang Q, Paulson OB, Lassen NA. Is autoregulation of cerebral blood flow in rats influenced by nitro-L-arginine, a blocker of the synthesis of nitric oxide? *Acta Physiol Scand*. 1992;145(3):297-298.

Wilson JR, Kapoor S. Contribution of endothelium-derived relaxing factor to exercise-induced vasodilation in humans. *J Appl Physiol*. 1993; 75(6):2740-2744.

Woodman CR, Turk JR, Rush JW, Laughlin MH. Exercise attenuates the effects of hypercholesterolemia on endothelium-dependent relaxation in coronary arteries from adult female pigs. *J Appl Physiol*. 2004; 96(3): 1105-1113.

Xie YW, Shen W, Zhao G, Xu X, Wolin MS, Hintze TH. Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro. Implications for the development of heart failure. *Circ Res*. 1996; 79(3):381-387.

Yamabe H, Okumura K, Ishizaka H, Tsuchiya T, Yasue H. Role of endothelium-derived nitric oxide in myocardial reactive hyperemia. *Am J Physiol*. 1992; 263(1 Pt 2): H8-14.

Zatz R.M., Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 1998; 32: 958-964.

The effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester on systolic pressure, diastolic pressure and pulse pressure according to the initial level of blood pressure

Antonio Ruiz, Ruth M. López, Teresa Pérez, Carlos Castillo, Enrique F. Castillo*

Sección de Estudios de Postgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, I.P.N., Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, Col. Casco de Santo Tomás, México CP 11340, D.F., Mexico

Keywords

L-NAME,
nitric oxide,
pithed rat,
pulse pressure

Received 29 May 2007;
revised 16 August 2007;
accepted 13 November 2007

*Correspondence and reprints:
fech_esm@hotmail.com

ABSTRACT

The objective of this study was to re-examine whether the effect of the nitric oxide synthesis inhibitor, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), on blood pressure depends on peripheral vascular tone. The effects of L-NAME (10 mg/kg, i.v.) on diastolic blood pressure (DBP), systolic blood pressure (SBP), pulse pressure (PP) and heart rate (HR) were studied in pithed rats. Sal-pithed rats received 0.9% NaCl, 10 µl/kg/min. Vascular tone was step-wise increased with 3, 10 and 30 µg/kg/min intravenous phenylephrine infusion (LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed rats respectively). L-NAME elicited vasopressor responses in all the animals studied. L-NAME increases in SBP and DBP in Sal-pithed rats were significantly smaller than the ones obtained in phenylephrine infused rats. The increases in DBP elicited by L-NAME were greater in LPhe-pithed rats compared with those of MPhe-pithed and HPhe-pithed rats (i.e. the step-wise rises in DBP obtained with phenylephrine were inversely related to the increases in DBP produced by L-NAME); however, the increases in SBP were similar between these experimental groups. The PP increased during L-NAME-induced pressor responses in phenylephrine-infused rats. L-NAME increases in PP showed the following order: Sal-pithed < LPhe-pithed < MPhe-pithed ≤ HPhe-pithed rats. HR was not modified by L-NAME. In conclusion, the vasopressor responses produced by L-NAME in pithed rats are influenced by the pre-existing vasomotor tone in complex form. We did not find a simple positive correlation between the vascular tone or level of arterial pressure, and the magnitude of the diastolic and systolic pressor responses elicited by L-NAME. Interestingly, the increase in PP induced by L-NAME was greater in accordance with the increasing value of baseline arterial pressure. NO synthesis inhibition in the arterial endothelium may possibly explain the increase in PP caused by L-NAME, as resulting from the reduction in proximal conduit artery compliance.

INTRODUCTION

The vascular endothelium production of nitric oxide (NO) is an important blood pressure control system [1–7]. NO synthesis by the endothelial NO synthase (eNOS) is stimulated by blood flow-dependent shear

stress acting on the endothelium, as well as by agonist occupation of endothelial membrane receptors [1–7]. Agonist-stimulated responses are regulated by the association of eNOS with the Ca²⁺/calmodulin complex, whereas flow-dependent shear forces can also activate eNOS in a Ca²⁺/calmodulin-independent (and

-dependent) manner [1–6]. On the other hand, constrictor mechanisms may exert an important influence on NO release. Chemical signals may be transferred via gap junctions from smooth muscle to endothelium; thus, it has been shown that arteriolar constriction by agonists may cause secondary elevation in endothelial intracellular calcium concentration and, thereby, stimulate NO production [8,9]. In addition, an increase in endothelial shear stress under isometric contraction conditions may occur due to a change in the orientation of endothelial cells relative to the smooth muscle and elastic lamina [10,11]. Therefore, the activation of the eNOS may not be confined only to endothelium-specific vasodilators or to flow-dependent shear stress. Smooth muscle and endothelial cell functions in the arteriolar wall are unified by complex intercellular chemical and mechanical signalling processes [12].

Since the clarification of the biosynthesis of NO, L-arginine analogues have been used as inhibitors of NOS to assess the contribution of NO to cardiovascular physiology. In particular, it has been proved that acute and chronic administration of *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) increases blood pressure in several species [1–6,13]. Taken together, the experiments with inhibition of NOS sustain the concept that the hypertension thus achieved reflect the removal of a NO-dependent tonic vasodilator effect, leaving unimpeded a similar tonic action of endogenous vasoconstrictors [1–6]. *In vivo* experiments in rats indicate that the vasopressor response to NOS inhibition is attenuated by procedures or agents that lower vascular tone, and so blood pressure (i.e. pithing or ganglionic blockade); conversely, in pithed animals, the induction of moderate or intense blood pressure increases with vasoconstrictors constant infusion (i.e. phenylephrine or vasopressin) restores or augments, respectively, the pressor responses compared to anesthetized rats [14,15]. Distinctively, the pressor effects induced by NOS inhibition have been correlated with baseline systolic blood pressure in the rat [15]. Further, NOS inhibition produced greater augmentation of vasopressor responses to sympathetic nerve stimulation in spontaneously hypertensive rats compared with that in normotensive rats [16]. On the contrary, it has been informed that the pressor responses provoked by NOS inhibitors are independent of the existing vascular tone, as blood pressure was augmented to a similar amount by L-NAME in pithed rats [17] or anesthetized rats [18]. Similar results were obtained in our laboratory (unpublished data).

The latter observations prompted us to critically reconsider the hypothesis that the magnitude of the pressor response to NOS inhibition is dependent on the baseline level of vascular tone. To test this hypothesis, we measured the diastolic and systolic vasopressor effects of L-NAME in groups of pithed rats under different haemodynamic conditions provoked by step-wise changes in vascular tone.

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar rats (250–300 g) were used at 12–14 weeks of age. The animals were maintained at a 12/12 h light–dark cycle in a special room at constant temperature (22 ± 2 °C), with food and water freely available in their home cages. The experiments were conducted under protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Pithed rat preparation

After ether anaesthesia and cannulation of the trachea, rats were bilaterally vagotomized in the cervical region and artificially respired by using a rodent ventilator (50 cycles/min; 20 ml/kg). Rats were pithed by pushing a stainless steel rod through the ocular orbit and foramen magnum down into the spinal canal. Catheters were placed in the right femoral vein and right carotid artery for, respectively, drug administration and blood pressure measurement. Arterial pressure (mmHg) was measured with a pressure transducer (TSD 104; Biopac, CA, USA) and recorded on a computer with the AcqKnowledge software (MP100WSW; Biopac Systems Inc.). Heart rate (b/min) was computed from the blood pressure signal. Another catheter was placed in the left femoral vein for the infusion experiments. Body temperature was maintained at 37 ± 0.5 °C with an electric blanket and monitored by a rectal probe transducer.

EXPERIMENTAL PROTOCOL

Pressor effects of L-NAME in pithed rats

After a stable haemodynamic condition had been observed for 30 min, baseline values of diastolic (DBP) and systolic blood pressure (SBP), arterial pulse pressure (PP) and heart rate (HR) were determined. Afterward, the animals were divided into four groups which received intravenously either saline (Sal-pithed rats) or the α_1 -adrenoceptor agonist, phenylephrine, to induce stable step-wise changes in blood pressure. Low (LPhe-pithed rats), medium (MPhe-pithed rats) and high

(HPhe-pithed rats) levels of vascular tone were produced by phenylephrine continuous infusion of 3, 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ respectively. Sal-pithed rats received 0.9% NaCl, 10 $\mu\text{l}/\text{kg}/\text{min}$. About 10 min later, all the animals received one dose of L-NAME (10 mg/kg, i.v.). The DBP, SBP, PP and HR responses to L-NAME were recorded. Likewise, haemodynamic responses to D-NAME (10 mg/kg; i.v.) were evaluated in two separate groups of Sal-pithed and LPhe-pithed rats.

DATA PRESENTATION AND ANALYSIS

Statistical analysis was conducted by using Student's *t*-test and a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, as appropriate. In all cases, a value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Results are expressed as mean \pm SEM. Only one dose of L-NAME (or D-NAME) was used in one rat.

Drugs

The following drugs were used: N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N^G -nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME), L-phenylephrine hydrochloride and DL-propranolol hydrochloride (Sigma Chemical Company; St Louis, MO, USA). Initially, all drugs were dissolved in distilled water; subsequent dilutions were made in assay buffer:

RESULTS

Basal and control parameters

The blood pressure and HR characteristics of the groups of pithed rats used for the analysis of haemodynamic responses to L-NAME are depicted in Table I. In the animals infused with phenylephrine (LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed rats), significant increases in DBP and SBP were observed in comparison with their own controls (Table I). Likewise, PP was augmented in phenylephrine infused rats (Table I). In addition, when comparing the groups of LPhe-pithed with MPhe-pithed rats, and MPhe-pithed with HPhe-pithed rats, both DBP and SBP were increased by phenylephrine in a dose-dependent manner (Table I). The highest dose of phenylephrine provoked an increase in HR (HPhe-pithed rats), which was reverted by the antagonist of β -adrenoceptors, propranolol (1 mg/kg, i.v.) (Figure 4). Saline infusion (NaCl 0.9%; 10 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{kg}$ during 60 min) in pithed animals (Sal-pithed rats), did not cause significant changes in haemodynamic variables (Table I).

Table I Values of diastolic blood pressure (DBP), systolic blood pressure (SBP), arterial pulse pressure (PP) and heart rate (HR) in four different groups of pithed rats intravenously infused with saline (10 $\mu\text{l}/\text{kg}/\text{min}$; Sal-pithed) or phenylephrine (3, 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$; LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed respectively), before and after the administration of L-NAME (10 mg/kg, i.v.; +L-NAME).

	DBP (mmHg)	SBP (mmHg)	PP (mmHg)	HR (b/min)
Pithed ($n = 8$)	40 \pm 2	63 \pm 3	22 \pm 2	363 \pm 9
Sal-pithed	39 \pm 2	62 \pm 3	24 \pm 2	370 \pm 7
Sal-pithed + L-NAME	82 \pm 5	100 \pm 4	22 \pm 1	371 \pm 8
Pithed ($n = 9$)	37 \pm 2	65 \pm 2	28 \pm 1	377 \pm 8
LPhe-pithed	54 \pm 4 ^a	96 \pm 3 ^b	38 \pm 2 ^a	381 \pm 10
LPhe-pithed + LNAME	126 \pm 5	166 \pm 5	50 \pm 4	383 \pm 9
Pithed ($n = 8$)	43 \pm 2	61 \pm 3	20 \pm 2	359 \pm 8
MPhe-pithed	97 \pm 4 ^{b,c}	133 \pm 5 ^{b,c}	37 \pm 2 ^b	378 \pm 10
MPhe-pithed + L-NAME	152 \pm 4 ^d	204 \pm 5 ^d	56 \pm 3	392 \pm 8
Pithed ($n = 8$)	38 \pm 2	60 \pm 2	22 \pm 2	388 \pm 10
HPhe-pithed	115 \pm 4 ^{b,e}	164 \pm 5 ^{b,f}	47 \pm 3 ^{b,e}	470 \pm 5 ^{b,f}
HPhe-pithed + L-NAME	147 \pm 3 ^g	217 \pm 5 ^d	71 \pm 3	490 \pm 8

Pithed = baseline values. Values are mean \pm SEM of n experiments. Note that to avoid redundancy, the statistical analysis described in the figures is not presented here.

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$ vs. its own control (Pithed). ^c $P < 0.001$ MPhe-pithed vs. LPhe-pithed. ^d $P < 0.001$ vs. LPhe-pithed + L-NAME. ^e $P < 0.05$ HPhe-pithed vs. MPhe-pithed. ^f $P < 0.001$ HPhe-pithed vs. MPhe-pithed. ^g $P < 0.01$ vs. LPhe-pithed + L-NAME.

Pressor responses to L-NAME

N^G -nitro-L-arginine methyl ester induced vasopressor responses in all the animal groups studied (Figures 1 and 2). The increases in SBP and DBP caused by L-NAME in Sal-pithed rats were significantly smaller than the obtained ones in the groups of rats infused with phenylephrine, with the exception of the DBP of HPhe-pithed group (Figures 1B and 2B). In this group, the increase in DBP obtained with L-NAME was smaller than that of the Sal-pithed group (Figure 1B). In phenylephrine infused rats, L-NAME-induced increases in DBP were greater in the LPhe-pithed group compared with MPhe-pithed and HPhe-pithed groups (Figure 1B); however, the increases in SBP were equivalent between these groups (Figure 2B). The step-wise rises in DBP obtained with phenylephrine in LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed rats (Figure 1A and Table I) were inversely related to the increases in DBP produced by L-NAME (Figure 1B); that is, the greater the increase in DBP induced by phenylephrine, the smaller is the increase in DBP caused by L-NAME (Figure 1).

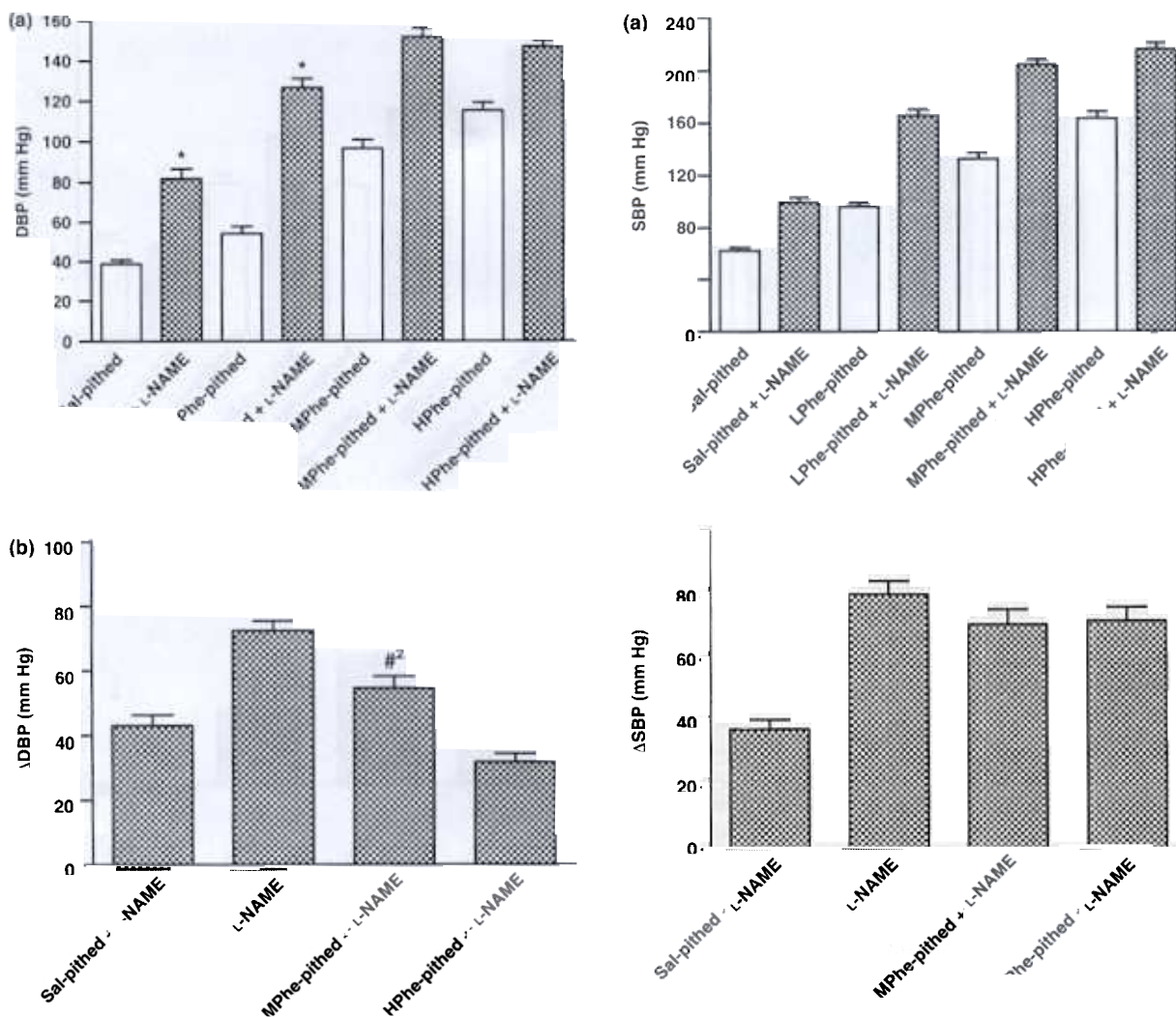


Figure 1 Diastolic blood pressure effects of N^6 -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in pithed rats with different levels of vascular tone. (a) Diastolic blood pressure (DBP) values in pithed rats intravenously infused with saline ($10 \mu\text{l/kg/min}$; Sal-pithed) or phenylephrine ($3, 10$ and $30 \mu\text{g/kg/min}$; LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed respectively), before and after the administration of L-NAME (10 mg/kg , i.v.; +L-NAME). Values are mean \pm SEM of eight to nine experiments. * $P < 0.001$ vs. its own control. (a) From experiments in (a), increments in diastolic blood pressure (ΔDBP) elicited by L-NAME (+L-NAME) in Sal-pithed, LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed rats. Values are mean \pm SEM. # $P < 0.05$, * $P < 0.001$ vs. Sal-pithed + L-NAME. ¹ $P < 0.001$ LPhe-pithed + L-NAME vs. MPhe-pithed + L-NAME. ² $P < 0.001$ MPhe-pithed + L-NAME vs. HPhe-pithed + L-NAME.

Nonetheless, the absolute magnitude of DBP increased as follows: LPhe-pithed + L-NAME < MPhe-pithed + L-NAME < HPhe-pithed + L-NAME rats (Table I;

Figure 1A). There was no difference between the latter two groups. Likewise, the absolute magnitude of SBP increased: LPhe-pithed + L-NAME < MPhe-pithed + L-NAME \leq HPhe-pithed + L-NAME rats (Table I; Fig-

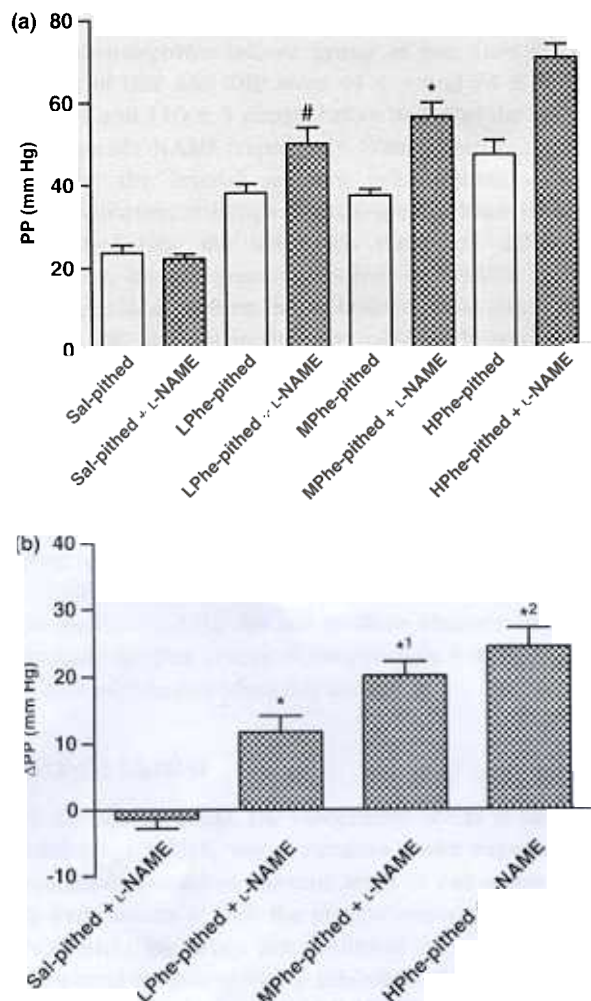


Figure 3 Effects of *N*⁶-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on arterial pulse pressure in pithed rats with different levels of vascular tone. (a) Arterial pulse pressure (PP) values in pithed rats intravenously infused with saline (10 μ l/kg/min; Sal-pithed) or phenylephrine (1, 3 and 10 μ g/kg/min; LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed respectively), before and after the administration of L-NAME (10 mg/kg, i.v.; +L-NAME). Values are mean \pm SEM of eight to nine animals. [#] $P < 0.05$, ^{*} $P < 0.001$ versus its own control. (b) From experiments in (a), increments in arterial pulse pressure (Δ PP) elicited by L-NAME (+L-NAME) in Sal-pithed, LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed rats. Values are mean \pm SEM. ^{*} $P < 0.001$ vs. Sal-pithed + L-NAME. ¹ $P < 0.05$ MPhe-pithed + L-NAME vs. LPhe-pithed + L-NAME. ² $P < 0.01$ HPhe-pithed + L-NAME vs. LPhe-pithed + L-NAME.

ure 2A). The greater value of SBP with L-NAME in HPhe-pithed compared with that in MPhe-pithed rats did not reach a statistically significant difference.

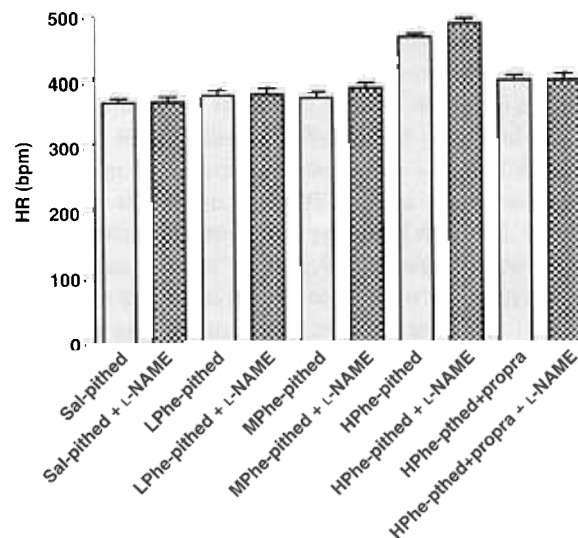


Figure 4 Effects of *N*⁶-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on heart rate in pithed rats with different levels of vascular tone. Heart rate (HR) values in pithed rats intravenously infused with saline (10 μ l/kg/min; Sal-pithed) or phenylephrine (1, 3 and 10 μ g/kg/min; LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed respectively), before and after the administration of L-NAME (10 mg/kg, i.v.; +L-NAME). Two other groups of HPhe-pithed rats received propranolol (1 mg/kg, i.v.; +propra) 5 min before the administration of phenylephrine. Values are mean \pm SEM of eight to nine animals. ^{*} $P < 0.001$ vs. Sal-pithed. For each group of rats, note that HR was not modified by L-NAME in comparison with its own control.

In Sal-pithed rats, PP was not modified during the pressor response to L-NAME (Figure 3A). However, PP was significantly greater during L-NAME administration in LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed rats compared with that in their respective controls (Figure 3A). The values of PP obtained with L-NAME showed the following order: Sal-pithed < LPhe-pithed < MPhe-pithed \leq HPhe-pithed rats (Figure 3B). In phenylephrine infused rats, PP during L-NAME administration was significantly greater than in Sal-pithed rats (Figure 3B). Also, the PP values after the administration of L-NAME in HPhe-pithed and MPhe-pithed rats were greater than in LPhe-pithed rats; nevertheless, there was no statistically significant difference in PP between MPhe-pithed and HPhe-pithed groups (Figure 3B).

In a series of preliminary experiments, the effects of L-NAME (10 mg/kg; i.v.) were studied in rats infused with 1 μ g/kg/min of phenylephrine. The values of DBP and SBP for the Sal-pithed group were 37 ± 2 and 65 ± 2 , and 82 ± 5 and 100 ± 4 mmHg before and

after the administration of L-NAME respectively; and for this phenylephrine-infused group of rats ($n = 8$), the values of DBP and SBP were 44 ± 3 and 74 ± 4 , and 90 ± 4 and 110 ± 5 mmHg before and after the administration of L-NAME respectively. When compared appropriately, the arterial pressure values obtained with phenylephrine, although slightly greater than those of Sal-pithed rats, did not reach significant difference. Similarly, the vasopressor responses to L-NAME did not differ significantly from those obtained in Sal-pithed rats.

The HR was not modified by L-NAME in any of the experimental groups of rats (Figure 4). However, as already mentioned, HPhe-pithed rats showed a significant increase in HR that was reverted by propranolol (Figure 4). Thus, the high HR observed with L-NAME in HPhe-pithed rats was restituted to values that do not differ from the other experimental groups by means of propranolol treatment (1 mg/kg, i.v.) (Figure 4).

Unlike L-NAME, the intravenous administration of 10 mg/kg D-NAME did not produce changes in blood pressure in other groups of Sal-pithed ($n = 4$) and LPhe-pithed ($n = 4$) rats (data not shown).

DISCUSSION

In the present study, the vasopressor effects of the NOS inhibitor, L-NAME, were examined under experimental conditions related to different levels of vasomotor tone. In experiments *in vivo*, the pressor responses caused by NOS-inhibiting drugs are attributed to an increase in peripheral resistance by the inhibition of the vasodilator tone dependent on endothelial NO [1–7]. Nevertheless, the relation between basal vascular tone, or arterial pressure, and the magnitude of the pressor response caused by NOS inhibition is the reason for controversy. Several groups of investigators have reported a positive correlation between the values of pre-existing arterial pressure and the pressor responses caused by the inhibition of NO synthesis in the rat; remarkably, a correlation was even observed in conditions of experimental hypertension [14–16]. On the contrary, other investigators have reported that the pressor responses caused by NO synthesis inhibition are independent on pre-existing vascular tone [17,18]. Our results with animals infused with phenylephrine confirm that NO production is coupled to vascular tone. In comparison with Sal-pithed rats, the higher values of SBP and DBP obtained with L-NAME in LPhe-pithed and MPhe-pithed rats, and SBP in HPhe-pithed rats, imply that the vascular tone increased by phenylephrine may possibly

be coupled to the augmented release of NO. Nonetheless, the data clearly show that a simple positive correlation between the increases in arterial pressure induced by phenylephrine in the three groups of rats (i.e. LPhe-pithed < MPhe-pithed < HPhe-pithed rats) and the increases in blood pressure caused by L-NAME does not exist. In this sense, L-NAME-induced increases in SBP were similar between these groups of rats; and, conspicuously, an inverse relation was observed between the step-wise augments in DBP obtained with phenylephrine infusion and the increases in DBP caused by L-NAME; that is, the greater the stable value of arterial pressure induced by phenylephrine, the smaller the change in DBP produced by L-NAME. Finally, the increase in DBP produced by L-NAME in HPhe-pithed rats was smaller than the corresponding response in Sal-pithed rats.

The different levels of blood pressure obtained in LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed rats depended on the enhanced vascular smooth muscle activity produced by phenylephrine. In these experimental conditions, NO release can be associated mainly with two functional variables: flow-dependent shear stress [1–7] and vascular smooth muscle contraction *per se* [8–11]. In principle, both can be increased by phenylephrine infusion in a dose-dependent manner, augmenting endothelium-dependent NO release and vasodilator tone. Thus, the absence of a positive correlation between the pre-existing vascular tone and the magnitude of the vasopressor responses to L-NAME is apparently inconsistent. In fact, the relationship between these variables has turned out to be complex.

As it was mentioned, the increases in DBP and SBP obtained with L-NAME reached a maximum with the development of a moderate vasomotor tone in LPhe-pithed rats (arterial pressure close to normotension). When the increase in vascular tone at baseline before NO synthesis inhibition was higher, the increase in SBP produced by L-NAME remained relatively constant; however, the increase in DBP was reduced. Further, the vasopressor responses to L-NAME obtained in the presence of a dose of phenylephrine smaller (a half unit of logarithm) than that used in LPhe-pithed rats did not differ statistically from those of Sal-pithed rats. On this basis, we observed a relation between the pressure effect of L-NAME and the basal vasomotor tone for a moderate value of tone, but speculate that the peripheral stimulation of NO synthesis could have reached values next to the maximum in LPhe-pithed rats; consequently, shear stress and contractile activity could continue increasing in MPhe-pithed and HPhe-pithed rats, without

producing appreciable effects in NO-dependent vascular tone. On the other hand, the generalized vasoconstrictor effect of phenylephrine, when causing an increase in the arterial pressure and a reduction in tissue perfusion, can activate other regulating mechanisms of blood flow [7,19].

Arterial pulse pressure increased during the pressor responses elicited by L-NAME in LPhe-pithed, MPhe-pithed and HPhe-pithed rats. The order of values of PP obtained with L-NAME was Sal-pithed < LPhe-pithed < MPhe-pithed ≤ HPhe-pithed rats. Thus, the increase in PP induced by L-NAME was greater, while higher was the baseline blood pressure obtained with phenylephrine. Here, it is worth making a fundamental consideration. The amount of increase in the SBP (Δ SBP) with L-NAME after phenylephrine administration appeared stable for the three doses and thus was not dose dependent; nevertheless, the absolute magnitude of SBP with L-NAME after phenylephrine infusion increased in a dose-dependent manner (LPhe-pithed < MPhe-pithed < HPhe-pithed rats). Likewise, the absolute value of DBP obtained with L-NAME in phenylephrine-treated animals, increased in a dose-dependent way (LPhe-pithed < MPhe-pithed ≈ HPhe-pithed rats), even though the magnitude of increase in the DBP (Δ DBP) with L-NAME after phenylephrine treatments decreased as previously described. Thus, the increase in pulse pressure after the administration of L-NAME was due to a dose-dependent increase in SBP, while a relatively small dose-dependent increase (or no increase as in HPhe-pithed rats) occurred in DBP too. Further, in the group of Sal-pithed rats, L-NAME increased the DBP and SBP in the same proportion, thus leading to a stable PP. This suggests a predominant increase in the tone of the resistance arteries after the administration of L-NAME (decrease in NO availability); however, there was no statistically significant change in arterial compliance (as discussed below) when NO synthesis inhibition occurred in the presence of very low vascular tone. By contrast, as previously stressed, from LPhe-pithed to HPhe-pithed rats, the absolute increases in SBP after the administration of L-NAME were higher than those in DBP, leading to increases in PP and thus, we propose, unmasking indirectly the role of NO synthesis in the regulation of proximal conduit artery tone and compliance.

Arterial pulse pressure is determined mainly by the peripheral resistance and the elastic properties of the aorta (more than 60% of the total arterial compliance resides in the aorta) [20,21]. In addition, one needs to consider the modulating effect of cardiac parameters [21]. Assuming that cardiac parameters did not vary

during L-NAME administration (in this work, HR was not modified by L-NAME; and we did not find available evidence suggesting that L-NAME augments stroke volume), a proportional reduction in arterial compliance may explain the increases in PP caused by the NOS inhibitor. It is important to consider that: (i) arteries in the rats (like in other species), have shown to have a powerful vasodilator mechanism dependent on endothelial NO synthesis and release [22,23]; (ii) acute alteration in flow velocity is considered the most important physiological determinant of changes in endothelial shear stress [7]; and (iii) the greater speed of blood flow during the fast phase of systolic ejection is observed in the aorta. Thus, during the phase of systolic ejection, NO released by flow-dependent shear stress may participate functionally in relation to aortic compliance. The increase in PP induced by L-NAME suggests the participation of NO in the dynamic augment of the arterial diameter during ventricular systole and, also in relation to the arteries, it indicates that the physiological liberation of NO is sensible to pulsatile flow [24].

In relation to the probable mechanism by which the pressure effect of L-NAME on DBP decreases, while the basal vascular tone increases with phenylephrine, we considered the following explanation. Mainly in conditions of hypertension, the arteries are less compliant at higher than at lower arterial pressures, and an increase in peripheral resistance will raise SBP more than DBP. Thus, in our experiments with phenylephrine, when baseline arterial pressure rises substantially, the salient combination of increased resistance and diminished arterial compliance elicited by L-NAME elevated SBP more than DBP. In addition, the less compliant arteries accommodate a smaller increment in stroke volume during rapid ejection phase, and thus increases the fraction of the blood volume that will run out of the arteries during the same period, which is associated with an accelerated decrease in pressure during diastole. Consequently, a reduced blood pressure is reached in late diastole, i.e. DBP.

Biological factors modulating PP and arterial compliance have been studied chiefly in genetic models of hypertension in rats [23,25,26], and involve mainly NO and vasoconstrictive agents. Several studies, taken together, suggest that acute withdrawal of endogenous NO decreases arterial compliance independent of mean arterial blood pressure changes and that an intact endogenous NO system is required to maintain arterial elasticity [23,25,26].

In conclusion, the vasopressor responses produced by the NOS inhibitor, L-NAME, in pithed rats are influenced

by the pre-existing vasomotor tone in complex form. We did not find a simple positive correlation between the vascular tone or level of arterial pressure, and the magnitude of the diastolic and systolic pressor responses elicited by L-NAME. An interesting finding was, nevertheless, that the increase in PP induced by L-NAME was greater in accordance with the increasing value of baseline arterial pressure. The inhibition of the synthesis of NO in the arterial endothelium can explain the increase in the PP caused by L-NAME, as resulting from the reduction in the functional capacity of the arteries to increase its diameter during ventricular systole. In addition, the arteries become less compliant when they are stretched by the elevated arterial blood pressure, so that for L-NAME (and other vasopressor substances) the PP increased in experimental conditions of hypertension.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a research grant from Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN), Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (COFAA) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

REFERENCES

- Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* (1991) **43** 109–142.
- Rees D.D., Palmer R.M., Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* (1989) **86** 3375–3378.
- Rubanyi G.M., Romero J.C., Vanhoutte P.M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* (1986) **250** H1145–H1149.
- Ignarro L.J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.* (1989) **65** 1–21.
- Zatz R.M., Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* (1998) **32** 958–964.
- Pohl U., Wagner K., de Wit C. Endothelium-derived nitric oxide in the control of tissue perfusion and oxygen supply: physiological and pathophysiological implications. *Eur. Heart J.* (1993) **14** 93–98.
- Stauss H.M., Persson P.B. Role of nitric oxide in buffering short-term blood pressure fluctuations. *News Physiol. Sci.* (2000) **15** 229–233.
- Dora K.A., Doyle M.P., Duling B.R. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* (1997) **94** 6529–6534.
- Dora K.A., Xia J., Duling B.R. Endothelial cell signaling during conducted vasomotor responses. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* (2003) **285** H1119–H1126.
- Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* (1999) **399** 601–605.
- Fleming I., Bauersachs J., Schafer A., Scholz D., Aldershvile J., Busse R. Isometric contraction induces the Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* (1999) **96** 1123–1128.
- Takano H., Dora K.A., Garland C.J. Spreading vasodilatation in resistance arteries. *J. Smooth Muscle Res.* (2005) **41** 303–311.
- Haynes W.G., Noon J.P., Walker B.R., Webb D.J. Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J. Hypertens.* (1993) **11** 1375–1380.
- Vargas H.M., Ignarro L.J., Chaudhuri G. Physiological release of nitric oxide is dependent on the level of vascular tone. *Eur. J. Pharmacol.* (1990) **190** 393–397.
- Elayan H.H., Kennedy B.P., Ziegler M.G. The pressor effect of NO synthase inhibition correlates to pre-existing systolic BP in the rat. *Auton. Neurosci.* (2002) **95** 32–36.
- Tabrizchi R., Triggle C.R. Influence of N omega-nitro-L-arginine methyl on pressor responses elicited by sympathetic nerve stimulation in pithed normotensive and hypertensive rats. *Life Sci.* (1991) **49** 1989–1995.
- van Gelderen E.M., Saxena P.R. Effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester on the hypotensive and hypertensive responses to 5-hydroxytryptamine in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* (1992) **222** 185–191.
- van Gelderen E.M., Heiligers J.P., Saxena P.R. Haemodynamic changes and acetylcholine-induced hypotensive responses after N^ω-nitro-L-arginine methyl ester in rats and cats. *Br. J. Pharmacol.* (1991) **103** 1899–1904.
- Vanhoutte P.M., Mombouli J.V. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* (1996) **39** 229–238.
- Stergiopoulos N., Westerhof N. Determinants of pulse pressure. *Hypertension* (1998) **32** 556–559.
- Stergiopoulos N., Meister J.J., Westerhof N. Determinants of stroke volume and systolic and diastolic aortic pressure. *Am. J. Physiol.* (1996) **6 Pt 2** H2050–H2059.
- Vanhoutte P.M. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ. J.* (2003) **67** 572–575.
- Safar M.E., Laurent P. Pulse pressure and arterial stiffness in rats: comparison with humans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2003) **285** H1363–H1369.
- Hutcheson I.R., Griffith T.M. Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. *Am. J. Physiol.* (1991) **1 Pt 2** H257–H262.
- Fitch R.M., Vergona R., Sullivan M.E., Wang Y.-X. Nitric oxide synthase inhibition increases aortic stiffness measured by pulse wave velocity in rats. *Cardiovasc. Res.* (2001) **51** 351–358.
- Susic D., Varagic J., Frohlich E.D. Isolated systolic hypertension in elderly WKY is reversed with L-arginine and ACE inhibition. *Hypertension* (2001) **19** 1422–1426.

