



ORIGINALES

Efectos renales de la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico en ratas cirróticas con ascitis

M. C. Ortiz, L. A. Fortepiani, C. Martínez-Salgado*, N. Eleno*, N. M. Atucha, J. M. López-Novoa*, J. García-Estañ

Departamentos de Fisiología. *Facultades de Medicina de Murcia y Salamanca.

RESUMEN

Estudios previos han demostrado que la inhibición aguda de la síntesis de óxido nítrico (NO) mejora la excreción de agua y sodio y la hipotensión arterial en ratas cirróticas con. En este trabajo hemos analizado los efectos renales producidos por el tratamiento crónico (10 días) con aminoguanidina (AG, 100 mg/kg/día), un inhibidor preferente de la sintasa inducible de NO (iNOS), o con N^w-Nitro-L-Arginina Methyl Ester (L-NAME, 0,5 mg/kg/día), un inhibidor no selectivo de la sintasa de NO, en un modelo experimental de cirrosis hepática y ascitis en ratas (inhalación de tetracloruro de carbono). Las ratas cirróticas no tratadas tenían menor presión arterial media (PAM), diuresis, natriuresis y tasa de filtración glomerular (TFG) y similar flujo sanguíneo renal (FSR) que sus controles. La administración crónica de AG no modificó ninguno de esos parámetros ni en las controles ni en las cirróticas. Sin embargo, el tratamiento crónico con L-NAME normalizó la PAM y aumentó significativamente la diuresis y natriuresis de los animales cirróticos, mientras que en los animales controles los efectos no fueron significativos. Estos datos indican que la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico con L-NAME, pero no con aminoguanidina, mejora la perfusión renal y la excreción de agua y sodio de las ratas cirróticas con ascitis. La excesiva producción de NO es un factor que contribuye a la retención de sodio e hipotensión arterial característica de la cirrosis hepática experimental.

Palabras clave: **Cirrosis hepática. Función renal. Óxido nítrico. Nitratos. Nitritos. Presión arterial.**

RENAL EFFECTS CHRONIC NITRIC OXIDE SYNTHESIS INHIBITION IN CIRRHOTIC RATS WITH ASCITES

SUMMARY

Previous studies have shown that acute inhibition of nitric oxide (NO) synthesis improves sodium and water excretion and increases blood pressure in cirrho-

Recibido: 20-II-2001.

En versión definitiva: 9-VII-2001.

Acceptado: 14-VII-2001.

Correspondencia: Dr. Joaquín García-Estañ López

Dpto. Fisiología
Fac. Medicina
30100 Murcia
E-mail: jgel@um.es

tic rats with ascites, thus suggesting that NO is an important factor contributing to the arterial hypotension and sodium retention of liver cirrhosis. In the present work we have analyzed the renal effects derived from the chronic oral treatment (10 days) with aminoguanidine (AG, 100 mg/kg/day), a preferential inhibitor of inducible NO synthase (iNOS), or N^w-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME, 0.5 mg/kg/day), a nonselective inhibitor of NOS, in an experimental model of liver cirrhosis with ascites (carbon tetrachloride inhalation). Untreated cirrhotic rats showed lower mean arterial pressure (MAP), diuresis, natriuresis and glomerular filtration rate (GFR) and similar renal blood flow (RBF) compared with the untreated control rats. Chronic administration of AG did not modify significantly any parameter in cirrhotic and control animals. Conversely, long-term L-NAME administration to cirrhotic rats normalized MAP and significantly increased water and sodium excretion, whereas in control animals these parameters were not significantly modified. These results show that chronic NO synthesis inhibition with L-NAME, but not with aminoguanidine, improves renal perfusion pressure and increases the lower sodium and water excretion of cirrhotic rats with ascites. Thus, an enhanced production of NO is an important factor contributing to the renal sodium and water retention characteristic of liver cirrhosis.

Key words: Liver cirrhosis. Renal function. Sodium retention. Blood pressure. Nitric oxide. Plasma nitrates. Plasma nitrites.

INTRODUCCIÓN

Diversas alteraciones de la función renal, tales como retención de sodio y agua, son comunes en las fases avanzadas de la cirrosis hepática. Los mecanismos que median esta mayor reabsorción tubular no están completamente aclarados. Según la hipótesis de la vasodilatación arterial periférica, la más actual de las teorías que intentan explicar la patogenia de la cirrosis hepática, el principal factor patogénico de la retención renal de la cirrosis es la vasodilatación arterial que induce un estado circulatorio hiperdinámico. Este estado estimularía a los sistemas antidiuréticos y antinatriuréticos que producirían un aumento de la reabsorción de agua y sodio¹.

En los últimos años hemos sido testigos de la importancia que el óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador, ha alcanzado como contribuidor a la disfunción circulatoria y renal de la cirrosis hepática². Muchos autores³⁻¹⁰ han sugerido que la vasodilatación local y sistémica de la cirrosis hepática está relacionada con un exceso de producción de NO. Así, la inhibición de la síntesis de NO en animales con cirrosis hepática reduce la circulación hiperdinámica^{4-6,9} y mejora la función excretora renal^{3, 8, 10, 11}. Los mecanismos por los que un exceso de NO podría producir esas alteraciones renales no están claros, pero se piensa que están relacionados con la vasodilatación arterial que produce, ya que al disminuir la presión arterial² la capacidad renal de eliminar

agua y sodio se reduce también^{2,19}. Curiosamente, además de esa potente acción vasodilatadora, el NO es también una sustancia diurética y natriurética^{2,20} y este efecto podría contrarrestar los efectos producidos por su propia acción vasodilatadora o los producidos por las hormonas vasoconstrictoras, como la angiotensina II. Hasta la fecha, sin embargo, no está claro qué isoformas de la sintasa de NO están funcionalmente implicadas en esas alteraciones ya que a pesar de que se ha descrito tanto activación de la endotelial (eNOS)¹²⁻¹⁴ como de la inducible (iNOS)^{10,14}, sólo los inhibidores no selectivos de la NOS como el L-NAME son capaces de corregir la hiporrespuesta vascular a vasoconstrictores típica de la cirrosis¹⁵⁻¹⁷, aunque tanto el L-NAME como la aminoguanidina, un inhibidor preferente de la iNOS, son capaces de elevar de forma aguda la presión arterial y la excreción de agua y sodio^{3, 10, 18}.

En este trabajo, hemos evaluado si la administración crónica de inhibidores de la síntesis de NO, como el L-NAME y la aminoguanidina, al igual que ocurre con la administración aguda de dichas drogas, mejora la hipotensión arterial y la función renal de un modelo experimental de cirrosis hepática con ascitis en ratas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos usado ratas Sprague-Dawley macho, nacidas y criadas en el Servicio de Animales de Labo-

ratorio de la Universidad de Murcia. Todos los protocolos experimentales usados en este estudio han sido realizados siguiendo la normativa actual para el tratamiento ético de los animales de experimentación de la Unión Europea y las leyes españolas.

Inducción de la cirrosis hepática

La producción de cirrosis se ha realizado por el método de inhalación de tetracloruro de carbono en animales tratados con fenobarbital en el agua de bebida^{7-8,18}, según lo descrito por McLean & McLean²¹, y modificado posteriormente por López-Novoa y cols.²². Esta técnica produce un tipo de cirrosis micronodular en unas 12 semanas, con gran frecuencia de aparición de ascitis. En este trabajo sólo hemos usado ratas con ascitis franca, sugerida por la inspección y palpación abdominal y comprobada tras el sacrificio del animal. Todos los animales recibieron la última sesión de inhalación una semana antes de comenzar los experimentos, momento en el que se terminó también la adición de fenobarbital al agua de bebida.

Grupos experimentales

Se han usado los siguientes grupos de animales: 1) Animales que no recibieron ningún tratamiento (control, n = 4; cirrosis, n = 4). 2) Animales que recibieron N^G-nitro-L-Arginina Methyl Ester durante 10 días (L-NAME, Sigma Chemical, Madrid, 0,5 mg/kg/día en el agua de bebida, control, n = 5; cirrosis, n = 7). 3) Animales que recibieron aminoguanidina durante 10 días (AG, hemisulfato sódico; Sigma, 100 mg/kg/día en el agua de bebida, control, n = 5; cirrosis, n = 7). La dosis de cada droga fue ajustada diariamente según la ingesta de agua y el peso de cada animal.

Preparación quirúrgica

Al final del período de tratamiento, los animales se anestesiaron con Inactin (100 mg/kg, ip; Research Biochemical International, Natick, MA, USA) y se colocaron en un quirofanillo termostataado para mantener la temperatura corporal a 37° C. Todos los experimentos se han realizado en ratas sin ayunar. Además de una traqueotomía, para facilitar la respiración, se colocaron catéteres en la vena femoral derecha para la administración de infusiones, en la arteria femoral derecha para la medición de la presión arterial (transductor Hewlett-Packard 1280; am-

plificador Hewlett-Packard 8805D; Andover, MA; USA) y obtención de sangre y en la vejiga urinaria para obtener muestras de orina. Tras la cirugía, los animales recibieron una infusión intravenosa de mantenimiento de 0,9% NaCl (1,5 ml/100g/h) durante todo el experimento. A esa infusión se añadió [³H]inulina (NEN, 1 µCi/ml; Itisa, Madrid) y p-aminohipurato (PAH, 6 mg/ml; Fluka, Madrid) para la medida de la tasa de filtración glomerular (TFG) y del flujo plasmático renal (FPR), respectivamente. El flujo sanguíneo renal (FSR) se calculó dividiendo el FPR por hematocrito/100. Tras la cirugía, se esperó un mínimo de 60 minutos antes de comenzar el experimento.

Protocolo experimental

Una vez canulada la arteria femoral, y antes de ninguna otra manipulación, se extrajo una muestra de sangre (250 µl) para la medida de los niveles plasmáticos de nitratos + nitritos. La sangre se centrifugó (10.000 rpm, 10 min) y el plasma fue congelado a -20° C. Una vez terminado el período de recuperación tras la cirugía, se realizó un período de aclaramiento de 30 minutos, en el que se obtuvieron muestras de orina y de sangre y se registró la presión arterial media (PAM) de forma continua. Al finalizar el experimento, se obtuvo una muestra de sangre de la vena renal izquierda para determinar la concentración de PAH. Tras ello, la rata fue sacrificada mediante toracotomía y los riñones extraídos, pesados y congelados a -20° C.

Técnicas analíticas

La concentración de [³H]Inulina en las muestras de orina y plasma se midió con un contador de centelleo líquido. La TFG se calculó mediante el aclaramiento de inulina. La diuresis se midió por gravimetría y la concentración de PAH mediante una técnica colorimétrica²³. La concentración de sodio se midió por fotometría de llama (Corning 435; Izasa, Barcelona). La concentración plasmática de nitratos + nitritos se midió mediante un kit comercial (Nitric Oxide Colorimetric Assay, Boehringer Mannheim, GmbH, Germany). Para comprobar que la administración de AG inhibió de forma eficaz la producción renal de NO, el riñón izquierdo fue usado para determinar la expresión de la proteína iNOS (mediante Western blot), de la forma descrita previamente por Criado y cols.¹⁰.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm 1 error estándar. Las diferencias estadísticas entre grupos se han evaluado mediante la prueba de la t de Student no pareada. Se ha considerado que un nivel de P menor de 0,05 es un resultado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Todos los animales cirróticos mostraron ascitis en cantidades variables (10-30 ml, además de edema mesentérico y esplenomegalia. El peso corporal fue similar entre grupos, pero los animales tratados crónicamente con L-NAME pesaron menos que sus controles. El peso renal y del bazo fue siempre superior en los grupos cirróticos que en los controles. El hematocrito fue también siempre inferior en los animales cirróticos que en los controles, pero en el grupo de cirrosis + L-NAME fue mayor que en los otros dos grupos de animales cirróticos (tabla I).

La figura 1 muestra la PAM en los grupos experimentales. El grupo de cirrosis sin tratar mostró hipotensión ($88,7 \pm 2,5$ mmHg vs $110,0 \pm 2,9$ en los controles) y la administración crónica de AG no modificó estos valores ($89,3 \pm 4,6$). Sin embargo, el tratamiento crónico con L-NAME aumentó la PAM en los animales cirróticos y la normalizó completamente ($105,6 \pm 3,2$). Ni la AG ni el L-NAME afectaron de forma significativa a la PAM en los grupos de animales controles ($109,6 \pm 5,9$ y $115,6 \pm 9,2$, respectivamente).

Las ratas cirróticas sin tratar mostraron una menor diuresis ($20,2 \pm 6,1$ vs $57,7 \pm 5,3$ μ l/min/g) y natriuresis ($2,2 \pm 0,9$ vs $8,5 \pm 1,4$ μ Eq/min/g) que sus controles (figura 2). El tratamiento con AG no modificó esas cifras en los controles ($52,1 \pm 7,3$ y $8,2 \pm 0,8$, respectivamente) ni tampoco en los cirróticos ($14,6 \pm 4,2$ y $1,1 \pm 0,5$, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento crónico con L-NAME aumentó

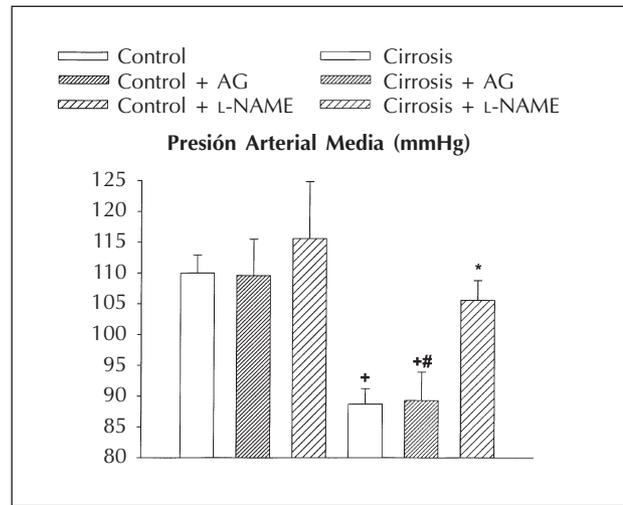


Fig. 1.—Presión arterial media en los animales tratados con aminoguanidina (AG) o N^w-Nitro-L-Arginina Methyl Ester (L-NAME). +: p < 0,05 vs control; *: p < 0,05 vs grupo sin tratar; #: p < 0,05 vs grupo control sin tratar.

de forma significativa la excreción de agua y sodio en el grupo cirrótico, de tal manera que casi se normalizaron respecto al grupo control sin tratar ($39,3 \pm 4,1$ y $4,7 \pm 0,5$, respectivamente) y fueron estadísticamente similares a las del grupo control tratado con L-NAME. En este grupo, la diuresis ($42,6 \pm 9,2$) y la natriuresis ($6,2 \pm 1,5$) fueron ligeramente inferiores a los del grupo control sin tratar.

La figura 3 ilustra los parámetros hemodinámicos renales. La TFG fue menor en los cirróticos que en los controles sin tratar ($0,86 \pm 0,10$ ml/min/g vs $1,32 \pm 0,06$) y no cambió con la AG en los cirróticos ($0,76 \pm 0,10$) o en los controles ($1,30 \pm 0,10$). Sin embargo, el tratamiento con L-NAME descendió la TFG en los controles pero no en los cirróticos, por lo que las diferencias entre ambos desaparecieron ($0,94 \pm 0,10$ vs $0,93 \pm 0,10$). El FSR fue similar entre ambos grupos en todas las situaciones experimentales y sólo el

Tabla I. Parámetros generales en los animales controles y cirróticos tratados crónicamente con aminoguanidina (AG) o N^w-Nitro-L-Arginina Methyl Ester (L-NAME). +: p < 0,05 vs grupo control

	Peso corporal (g)	Peso renal (g)	Peso esplénico (g)	Hematocrito (%)
Control	450,0 \pm 9,4	2,79 \pm 0,06	0,75 \pm 0,06	44,2 \pm 0,8
Control + AG	453,6 \pm 18,5	2,87 \pm 0,11	0,70 \pm 0,04	43,7 \pm 0,8
Control + L-NAME	489,6 \pm 11,1	2,94 \pm 0,15	0,86 \pm 0,07	43,2 \pm 0,8
Cirrosis	435,0 \pm 16,5	3,42 \pm 0,35+	1,70 \pm 0,18+	29,5 \pm 1,9+
Cirrosis + AG	453,0 \pm 22,2	3,58 \pm 0,21+	1,92 \pm 0,22+	33,9 \pm 2,1+
Cirrosis + L-NAME	427,1 \pm 16,4+	3,39 \pm 0,16+	1,70 \pm 0,09+	36,9 \pm 0,96*+

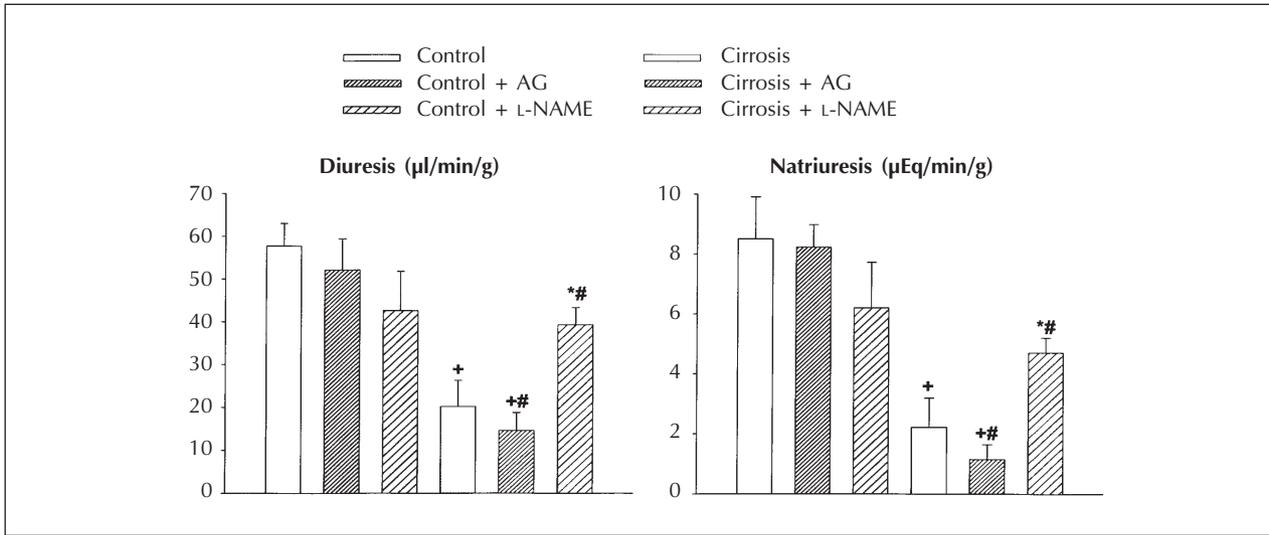


Fig. 2.—Parámetros excretorios renales en los animales tratados con aminoguanidina (AG) o N^w-Nitro-L-Arginina Methyl Ester (L-NAME). +: $p < 0,05$ vs control; *: $p < 0,05$ vs grupo sin tratar; #: $p < 0,05$ vs grupo control sin tratar.

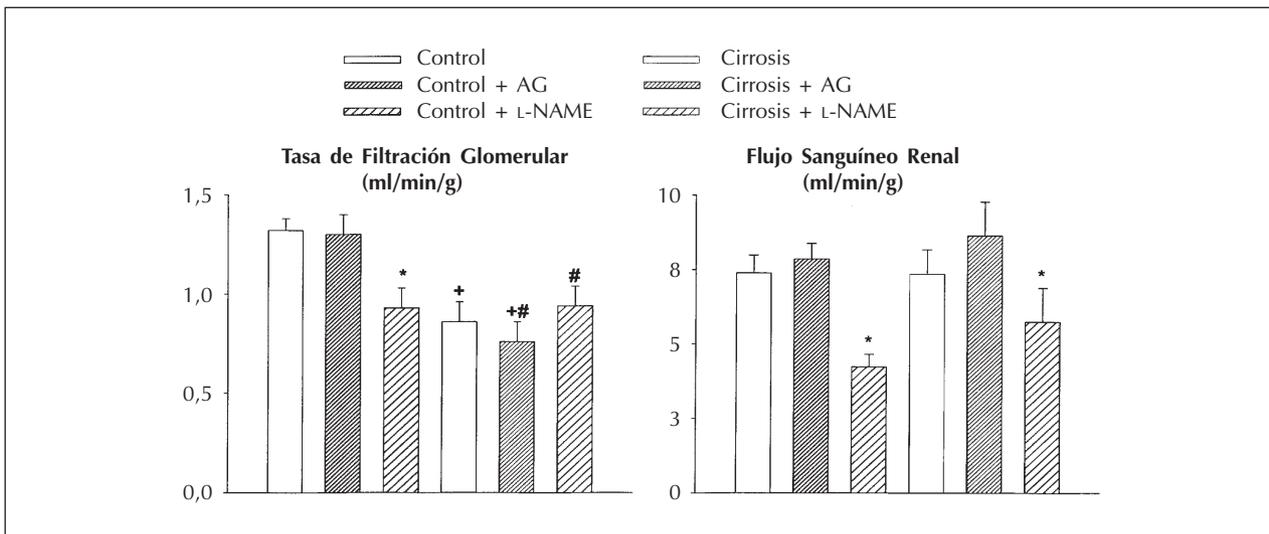


Fig. 3.—Hemodinámica renal en los animales tratados con aminoguanidina (AG) o N^w-Nitro-L-Arginina Methyl Ester (L-NAME). +: $p < 0,05$ vs control; *: $p < 0,05$ vs grupo sin tratar; #: $p < 0,05$ vs grupo control sin tratar.

tratamiento crónico con L-NAME descendió esos valores ($5,74 \pm 1,14$ ml/min/g y $4,23 \pm 0,42$, respectivamente) respecto a los grupos sin tratar ($7,34 \pm 0,83$ y $7,38 \pm 0,6$, respectivamente) o a los grupos que recibieron AG ($8,63 \pm 1,14$ y $7,86 \pm 0,56$).

La concentración plasmática de nitratos + nitritos fue significativamente mayor en los animales cirróticos

que en los controles ($7,4 \pm 1,2$ vs $1,6 \pm 0,7$ µg/ml) y la AG la descendió ($4,3 \pm 0,4$) en los cirróticos, aunque permaneció todavía mayor que la de los controles. El tratamiento con L-NAME no normalizó los niveles de nitratos + nitritos en las ratas con cirrosis ($5,0 \pm 0,7$), aunque el descenso producido propició que ya no hubiera diferencias signifi-

cativas con el grupo control tratado de forma similar ($3,1 \pm 0,7$). En los grupos controles, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos (fig. 4).

La tabla II muestra la cantidad de proteína iNOS en el tejido renal de los grupos experimentales. En los cirróticos, los niveles de iNOS fueron claramente superiores a los de los controles y ambos tratamientos los disminuyeron. Sin embargo, sólo el tratamiento con AG descendió los niveles de iNOS a valores similares a los de los controles.

La tabla III muestra diversos parámetros de función renal útiles para analizar los efectos excretorios. Así, en ambos grupos tratados con L-NAME hay un importante aumento de la resistencia vascular renal, y sólo en los cirróticos, aumenta de forma significativa la fracción de filtración y la excreción fraccional de sodio. Especialmente llamativo es éste último, donde el porcentaje de excreción de sodio respecto del filtrado casi se normaliza en los animales cirróticos tratados con L-NAME.

Tabla III. Parámetros de función renal en los animales controles y cirróticos tratados crónicamente con aminoguanidina (AG) o N^w-Nitro-L-Arginina Methyl Ester (L-NAME)

	RVR	FF (%)	EFNa (%)
Control	14,9 ± 2,2	32,0 ± 3,1	4,44 ± 0,56
Control + AG	13,9 ± 1,5	29,4 ± 2,8	4,36 ± 0,42
Control + L-NAME	27,3 ± 3,1*	38,8 ± 3,8	4,59 ± 0,38
Cirrosis	12,1 ± 2,3	16,6 ± 2,5*	1,84 ± 0,25*
Cirrosis + AG	10,3 ± 1,9	13,4 ± 1,8*	1,07 ± 0,31*
Cirrosis + L-NAME	18,4 ± 1,4*+	26,0 ± 1,6*+	3,57 ± 0,25*+

RVR: resistencia vascular renal (mmHg.min/ml); FF: fracción de filtración; EFNa: excreción fraccional de sodio. *: $p < 0,05$ vs Control; +: $p < 0,05$ vs Cirrosis.

DISCUSIÓN

El dato más relevante de este trabajo es que la inhibición, a largo plazo y no selectiva, de la síntesis de NO en ratas cirróticas con ascitis mejora de forma importante la excreción renal de agua y sodio y corrige la hipotensión arterial. En contraste con estos datos, el uso crónico de aminoguanidina, un inhibidor preferente de la iNOS, no produjo ningún efecto beneficioso en los animales cirróticos. Estos resultados sugieren, por consiguiente, que el NO, probablemente de origen constitutivo endotelial, es un importante mediador de la retención de agua y sodio y de la hipotensión arterial característica de este modelo experimental de cirrosis hepática.

Estos resultados concuerdan con los de Martin y cols.²⁴, quienes trataron un grupo de ratas cirróticas con una dosis de L-NAME que normaliza la producción de NO y observaron una mejoría de la retención de sodio. En nuestro trabajo, hemos usado una dosis similar a la de ese estudio²⁴ y encontrado que este tratamiento aumenta la excreción de agua y sodio de las ratas cirróticas con ascitis, pero sin corregir completamente la menor diuresis y natriuresis basal. Es posible que diferencias en el grado de evolución de la cirrosis puedan explicar estas divergencias. Sin embargo, también es posible que, además del NO, haya otros factores implicados en la retención de sodio y agua de la cirrosis hepática. Es interesante, de todas formas, comprobar que esa

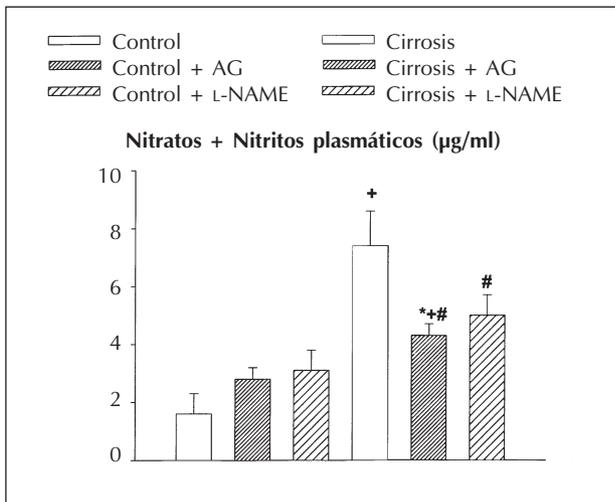


Fig. 4.—Niveles plasmáticos de nitratos + nitritos en los animales tratados con aminoguanidina (AG) o N^w-Nitro-L-Arginina Methyl Ester (L-NAME). +: $p < 0,05$ vs control; *: $p < 0,05$ vs grupo sin tratar; #: $p < 0,05$ vs grupo control sin tratar.

Tabla II. Cantidad de iNOS renal (unidades arbitrarias) en los grupos experimentales

	Control	Control + L-NAME	Control + AG	Cirrosis	Cirrosis + L-NAME	Cirrosis + AG
iNOS	100,0	68,4 ± 12,2*	84,3 ± 30,9	169,1 ± 21,9*	131,6 ± 10,4*	112,9 ± 14,5+

+: $p < 0,05$ vs Control; +, $p < 0,05$ vs Cirrosis.

dosis de L-NAME sí corrige completamente la hipotensión arterial, una de las más claras características de la cirrosis hepática. Este resultado concuerda con multitud de estudios previos que sugieren que el exceso de NO producido en diversos lechos vasculares, incluido el esplácnico y el renal, produce una disminución de las resistencias vasculares generalizada que impide el mantenimiento de una presión arterial normal²⁻⁹.

Sin embargo, a pesar de que la presión arterial se normalizó con el L-NAME, la excreción renal no lo hizo, lo que sugiere que la retención de sodio y agua no depende únicamente de una menor presión de perfusión renal¹⁹. Se cree que esta menor presión de perfusión renal es uno de los factores que participan en la menor diuresis y natriuresis de la cirrosis hepática, tanto experimental como humana^{1-2, 19,25}. Aunque la función excretora renal del animal o paciente cirrótico puede ser mejorada aumentando la presión arterial, nosotros hemos comprobado que el riñón de un animal cirrótico no puede normalizar su menor excreción basal de agua y sodio únicamente con un aumento de presión arterial¹⁹. Curiosamente, esa menor excreción basal de agua y sodio sí pudo ser normalizada en otro trabajo en el que se inhibió la síntesis de NO a dosis que no produjeron cambios de presión arterial, aunque sí afectaron al riñón^{2,8}. Por ello, es posible que además de la presión arterial, algunos de los conocidos sistemas antinatriuréticos puedan seguir elevados y ser responsables de la falta de normalización de la función excretora de los animales cirróticos tratados crónicamente con L-NAME. Por ejemplo, el sistema renina-angiotensina que se conoce que es estimulado de forma importante tras el tratamiento crónico con L-NAME²⁶.

Los mecanismos renales subyacentes están muy probablemente relacionados con la menor producción de óxido nítrico que entonces permite una mayor expresión de los efectos vasoconstrictores, sobre todo de la angiotensina II²⁶. También se podría explicar así el aumento de la fracción de filtración, por vasoconstricción de la arteriola eferente. Respecto al aumento de la excreción fraccional de sodio y de agua en los animales cirróticos, hay dos factores claramente implicados: en primer lugar hay un aumento del porcentaje de plasma filtrado importante, de un 10%; sin embargo, la excreción fraccional aumenta un 100%, lo que sugiere que la reabsorción tubular ha disminuido. Este efecto es el que es paradójico cuando se inhibe la síntesis de NO en animales cirróticos, como previamente se ha descrito^{2-3,8}. Mientras que en animales controles, la administración de L-NAME disminuye la excreción, en los animales cirróticos se produce todo lo con-

trario. Muy probablemente este efecto es debido al importante aumento de presión arterial: por efecto directo intrarrenal se estimula el mecanismo de diuresis y natriuresis de presión¹⁹ y por efectos extrarrenales disminuye la activación del sistema renina-angiotensina, simpático y vasopresina¹¹.

Aunque parece clara la implicación de la isoforma constitutiva endotelial de la sintasa de NO (eNOS) en la patogenia de la circulación hiperdinámica de la cirrosis^{4-6,9}, el papel de la isoforma inducible (iNOS) es más controvertido^{10,14,16-17}. Así, el uso de inhibidores preferenciales de la iNOS en modelos animales de hipertensión portal ha proporcionado resultados contradictorios, desde una mejoría²⁷ a la falta completa de efecto¹¹. Estudios previos de nuestro laboratorio han descrito que la administración aguda de AG, en dos modelos distintos de cirrosis, tiene efectos beneficiosos sobre la presión arterial y la función excretora renal^{10,18}. Por ello, es sorprendente que la administración crónica de AG en los experimentos aquí descritos, no produjera ningún efecto. Sin embargo, la administración crónica de AG se ha usado con éxito en otras enfermedades en las que la iNOS tiene un papel importante (28-30). No creemos que la falta de efecto de la AG en nuestras ratas cirróticas pueda ser debido a una insuficiente dosis o menor absorción intestinal, ya que esta misma dosis y vía de administración se ha usado en otras ocasiones con éxito^{27-28,31-32}. Además, no sólo los niveles plasmáticos de nitratos + nitritos descendieron claramente en los animales cirróticos sino que también la mayor cantidad de iNOS de los riñones de los animales cirróticos se normalizó en los animales que recibieron AG. Otra posible razón puede estar relacionada con un aumento compensatorio de la isoforma eNOS, producido mientras que la iNOS está siendo inhibida³³. En cualquier caso, estos datos no apoyan el uso de la AG como una buena opción para el estudio de la cirrosis hepática en animales. Futuros experimentos que empleen inhibidores más específicos y potentes de la iNOS podrán aclarar este oscuro punto.

Se ha descrito previamente que los pacientes y animales con cirrosis hepática tienen niveles plasmáticos elevados de nitratos y nitritos^{18,34-35}, hecho también comprobado en el presente trabajo, lo que parece reflejar un aumento generalizado de la síntesis de NO. Curiosamente, aunque la AG no produjo ningún efecto beneficioso sí descendió los niveles de nitratos + nitritos en los animales cirróticos. Este resultado podría ser debido a la reducción de la síntesis de NO de origen extravascular, ya que se conoce que otras células además del endotelio vascular contribuyen a la producción total^{10,36-37}.

Además, es posible que la inhibición de la iNOS produzca un aumento compensatorio de la expresión de la eNOS³³. Por otra parte, aunque el tratamiento con L-NAME produjo importantes cambios sistémicos y renales, el descenso de los nitratos+nitritos plasmáticos no fue estadísticamente significativo. Este resultado podría explicarse en base a interferencias del inhibidor en el ensayo químico. Así, se ha descrito³⁸⁻³⁹ que los análogos de la L-arginina que contienen el grupo nitro- interfieren con los ensayos que usan la reacción de Griess, usada en este trabajo. En conclusión, aunque la medida de los nitratos-nitritos plasmáticos no sea el mejor método para estimar la producción de NO, parece lógico pensar que los efectos presores y renales producidos por la administración crónica de L-NAME en los animales cirróticos sea debida a una reducción de la producción de NO.

Estos resultados también indican que el tratamiento crónico con L-NAME aumenta el hematocrito de los animales cirróticos y esto puede ser debido al descenso del volumen plasmático, como consecuencia de la elevación de la excreción de agua y sodio. Se ha descrito que la administración de L-NAME puede prevenir la expansión de volumen plasmático asociada con el desarrollo de hipertensión portal⁴⁰ y ésto también podría influir en la respuesta sistémica a la inhibición crónica del NO.

En resumen, los resultados de este trabajo muestran que la administración crónica de L-NAME, pero no de aminoguanidina, normaliza la hipotensión arterial y produce una mejoría, bien que incompleta, de la retención de agua y sodio de un modelo experimental de cirrosis hepática con ascitis. El NO, de origen endotelial, participa de forma muy importante en la patogenia de las alteraciones sistémicas y renales de la cirrosis hepática. Sin embargo, otros factores, de origen intrarrenal, podrían también participar en estas alteraciones.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se realizó gracias a ayudas de la CICYT SAF97-0176 and SAF 2000-0176. Durante la realización del mismo, MCO (FP94-29000129) y LAF (PN95-42849602) fueron becarias predoctorales del Ministerio de Educación y Cultura de España.

BIBLIOGRAFÍA

- Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J: Peripheral arteriolar vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 8: 1151-1157, 1988.
- Romero JC, García-Estañ J, Atucha NM: Nitric oxide and renal function: The control of blood pressure under normal conditions and during cirrhosis. In «The kidney in liver disease», M Epstein, ed. 4th ed. Hanley & Belfus, Inc. Philadelphia, 373-385, 1996.
- Clària J, Jiménez W, Ros J, Asbert M, Castro A, Arroyo V, Rivera F, Rodés J: Pathogenesis of arterial hypotension in cirrhotic rats with ascites: Role of endogenous nitric oxide. *Hepatology* 15: 343-349, 1992.
- Pizcueta MP, Piqué JM, Bosch J, Moncada S: Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. *Br J Pharmacol* 105: 184-190, 1992.
- Pizcueta MP, Piqué JM, Fernández M, Bosch J, Rodés J, Whittle BJR, Moncada S: Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 103: 1909-1915, 1992.
- Lee FY, Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ: N^w-nitro-L-arginine administration corrects peripheral vasodilation and systemic capillary hypotension and ameliorates plasma volume expansion and sodium retention in portal hypertensive rats. *Hepatology* 17: 84-90, 1993.
- García-Estañ J, Atucha NM, Sabio JM, Vargas F, Quesada T, Romero JC: Increased endothelium-dependent renal vasodilation in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 267: R549-R553, 1994.
- Atucha NM, García-Estañ J, Ramírez A, Pérez MC, Quesada T, Romero JC: Renal effects of nitric oxide synthesis inhibition in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 267: R1454-R1460, 1994.
- Niederberger M, Martin PY, Ginés P, Morris K, Tsai P, Xu DL, McMurtry I, Schrier RW: Normalization of nitric oxide production corrects arterial vasodilation and hyperdynamic circulation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 109: 1624-1630, 1995.
- Criado M, Flores O, Ortiz MC, Hidalgo F, Rodríguez-López AM, Eleno N, Atucha NM, Sánchez-Rodríguez A, Arévalo M, García-Estañ J, López-Novoa JM: Elevated glomerular and blood mononuclear lymphocyte nitric oxide production in rats with chronic bile duct ligation: Role of inducible nitric oxide synthase activation. *Hepatology* 26: 268-276, 1997.
- Martin PY, Schrier RW: Pathogenesis of water and sodium retention in cirrhosis. *Kidney Int* 51 (Supl. 59): S43-S49, 1997.
- Niederberger M, Ginés P, Martin P-Y, Tsai P, Morris K, McMurtry I, Schrier RW: Comparison of vascular nitric oxide production and systemic hemodynamics in cirrhosis versus prehepatic portal hypertension in rats. *Hepatology* 24: 947-951, 1996.
- Martin PY, Xu DL, Niederberger M, Weigert A, Tsai P, John JST, Ginés P, Schrier RW: Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 39: F494-F499, 1996.
- Morales-Ruiz M, Jiménez W, Pérez-Sala D, Ros J, Leivas A, Lamas S, Rivera F, Arroyo V: Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 24: 1481-1486, 1996.
- Ortiz MC, Fortepiani LA, Martínez C, Atucha NM, García-Estañ J: Vascular hyporesponsiveness in aortic rings from cirrhotic rats: role of nitric oxide and endothelium. *Clin Sci* 91: 733-738, 1996.
- Sogni P, Smith APL, Gadano A, Lebrec D, Higenbottam TW: Induction of nitric oxide synthase II does not account for excess vascular nitric oxide production in experimental cirrhosis. *J Hepatol* 26: 1120-1127, 1997.
- Weigert AL, Martin P-Y, Schrier RW: Vascular hyporesponsiveness in cirrhotic rats: role of different nitric oxide synthase isoforms. *Kidney Int* 52 (Supl. 61): S41-S44, 1997.

18. Ortiz MC, Fortepiani LA, Martínez C, Atucha NM, García-Estañ J: Renal and pressor effects of aminoguanidine in cirrhotic rats with ascites. *J Am Soc Nephrol* 7: 2694-2699, 1996.
19. Atucha NM, Cegarra M, Ramírez A, Quesada T, García-Estañ J: Pressure diuresis and natriuresis in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 265: G1045-G1049, 1993.
20. Romero JC, Lahera V, Salom MG, Biondi ML: Role of endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol* 2: 1371-1387, 1992.
21. McLean EK, McLean AEM, Satton PM: Instant cirrhosis, an improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of CCl₄ and fenobarbitone. *Brit J Exp Path* 50: 502-506, 1969.
22. López-Novoa JM, Rengel MA, Rodicio JL, Hernando L: A micropuncture study of salt and water retention in chronic experimental cirrhosis. *Am J Physiol* 232: F315-F318, 1977.
23. Waugh WH, Beall PT: Simplified measurement of p-aminohippurate and another arylamines in plasma and urine. *Kidney Int* 5: 429-436, 1974.
24. Martin PY, Ohara M, Ginés P, Xu DL, St John J, Niederberger M, Schrier RW: Nitric oxide synthase inhibition for one week improves renal sodium and water excretion in cirrhotic rats with ascites. *J Clin Invest* 101: 235-242, 1998.
25. Atucha NM, García-Estañ J: Intrarenal alterations in experimental liver cirrhosis. *News Physiol Sci* 11: 48-52, 1996.
26. Ortiz MC, Fortepiani LA, Ruiz-Marcos FM, Atucha NM, García-Estañ J: Role of AT1 receptors in the renal papillary effects of acute and chronic nitric oxide inhibition. *Am J Physiol* 274: R766-R772, 1998.
27. Lee FJ, Wang SS, Tsai YT, Lin HJ, Lin HC, Chu CJ, Wu SL, Tai CC, Lee SD: Aminoguanidine corrects hyperdynamic circulation without ameliorating portal hypertension and portal hypertensive gastropathy in anesthetized portal hypertensive rats. *J Hepatol* 26: 687-693, 1997.
28. Cross AH, Misko TP, Lin RF, Hickey WF, Trotter JL, Tilton RG: Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *J Clin Invest* 93: 2684-2690, 1994.
29. Wu CC, Chen SJ, Szabó C, Timmerman C, Vane JR: Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of endotoxics shock. *Br J Pharmacol* 337: 776-777, 1995.
30. Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG: Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 273: 15-24, 1995.
31. Preedy VR, Hammond B: An investigation into the effects of aminoguanidine treatment on the plasma and blood of free-fed and dietary-restricted rats. *J Pharm Pharmacol* 43: 337-34, 1991.
32. Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, Hata I, Hata K, Yamamoto K, Ishii Y, Muramatsu I, Sudo M: Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol* 270: E840-E845, 1996.
33. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDanile ML, Williamson JR, Currie MG: Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 233: 119-125, 1993.
34. Guarner C, Soriano G, Tomás A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S: Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 18: 1139-1143, 1993.
35. Sugano S: Endotoxin levels in cirrhotic rats with sterile and infected ascites. *Gastroenterol Jpn* 27: 348-353, 1992.
36. Laffi G, Foschi M, Masini E, Simoni A, Mugnai L, La Villa G, Barletta G, Mannaioni PF, Gentilini: Increased production of nitric oxide by neutrophils and monocytes from cirrhotic patients with ascites and hyperdynamic circulation. *Hepatology* 22: 1666-1673, 1995.
37. Morales-Ruiz M, Jiménez W, Ros J, Solé M, Leivas A, Bosch-Marcé M, Rivera F, Arroyo V, Rodés J: Nitric oxide production by peritoneal macrophages of cirrhotic rats: A host response against bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 112: 2056-2064, 1997.
38. Rivas-Cabañero L, Valdivieso JM, López-Novoa JM: N^G-nitro-L-arginine methyl ester causes glomerular nitrite production in long-term incubations. *Nephron* 73: 97-98, 1996.
39. Greenberg SS, Xie J, Spitzer JJ, Wang JF, Lancaster J, Grisham MB, Powers DR, Giles TD: Nitro containing L-arginine analogs interfere with assays for nitrate and nitrite. *Life Sci* 57: 1949-1961, 1995.
40. García-Pagán JC, Fernández M, Bernadich C, Pizcueta P, Piqué JM, Bosch J, Rodés J: Effects of continued NO inhibition on portal hypertensive syndrome after portal vein stenosis in rat. *Am J Physiol* 267: G984-G990, 1994.