

**PAPEL DEL OXIDO NÍTRICO VASCULAR
EN LA CIRROSIS HEPÁTICA EXPERIMENTAL**

Noemí M. Atucha, F. Javier A. Nadal, David Iyu, Joaquín García-Estañ

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia

Correspondencia:

Joaquín García-Estañ López
Depto. Fisiología
Fac. Medicina
30100 Murcia

Teléfono: 968-364880

Fax: 968-364150

E-mail: jgestan@um.es

Página Web: <http://www.um.es/~grupo-cirrosis/index.html>

Una de las más importantes características de la cirrosis hepática, sea humana o experimental, es la vasodilatación esplácnica y sistémica. Aunque su origen no está en absoluto claro, se piensa que además de factores como el aumento de la capacidad vascular, hay también una mayor vasodilatación activa, como consecuencia de la excesiva generación de sustancias vasodilatadoras, muchas de ellas de origen local. De entre la gran variedad de sustancias implicadas, en este trabajo analizaremos algunas de las pruebas que indican que el óxido nítrico (NO) es el principal factor implicado en dicha vasodilatación.

El NO en la pared vascular.

El NO se forma a partir del aminoácido L-arginina (1-3), debido a la acción de varias isoformas del enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La isoforma endotelial o NOS3 se expresa de forma constitutiva en la célula endotelial, donde hace que se forme NO de manera continua, aunque en pequeñas cantidades, en respuesta a factores físicos (estrés de rozamiento) o químicos (hormonas vasoconstrictoras, por ejemplo). Por el contrario, la NOS2 o inducible es “inducida” en la pared vascular por endotoxinas y citoquinas, entre otros, y produce grandes cantidades de NO, bien que en un corto espacio de tiempo. Este proceso produce una gran vasodilatación que juega un papel de gran importancia en la regulación del proceso inflamatorio.

La vasodilatación debida al NO requiere la producción de un segundo mensajero, el cGMP, como se demuestra tras la inhibición de la guanilato ciclasa mediante azul de metileno, por ejemplo. A su vez, el cGMP produce la vasodilatación mediante la modulación de varias protein-quinasas, como la inhibición de la quinasa de la cadena ligera de la miosina, lo que reduce la actividad de la miosina, o mediante el control de la concentración de calcio intracelular (2).

El NO y las alteraciones cardiovasculares de la cirrosis hepática experimental.

Los tres modelos animales más usados de cirrosis hepática o hipertensión portal son el de administración de tetracloruro de carbono (CCl₄), el de ligadura crónica del conducto biliar (LCB) y el de ligadura parcial de la vena porta (LVP). Como el lector podrá comprobar, hay algunas diferencias en el papel del NO en cada uno de ellos. Por ello, estos estudios experimentales han de ser tratados con precaución, sobre todo en el caso de intentar una extrapolación al ser humano (4).

Los tres modelos experimentales mencionados presentan la típica circulación hiperdinámica que caracteriza a la enfermedad humana, esto es, gasto cardíaco elevado y descenso de las resistencias vasculares, con presión arterial normal (en la fase pre-ascítica) o francamente disminuída (4-5).

Papel del NO en la circulación hiperdinámica.

Bastantes experimentos han demostrado claramente que la administración de inhibidores de la síntesis de NO a animales con cirrosis o hipertensión portal aumenta la presión arterial en forma dependiente de la dosis (6-8). Por supuesto, este efecto hipertensor es mayor que en los animales controles. El tratamiento crónico con esos mismos inhibidores también aumenta la presión arterial y reduce el gasto cardíaco y la hipervolemia, lo que indica que el NO es un mediador de importancia de la circulación hiperdinámica (8-10). Otros estudios recientes han mostrado también que existe una mayor liberación de NO desde el endotelio de las arterias mesentéricas antes incluso de que la circulación hiperdinámica esplácnica está completamente establecida (11), antes por lo tanto del desarrollo de la circulación hiperdinámica sistémica. Estos datos sugieren claramente que el NO desempeña un papel primario en el desarrollo de esta vasodilatación arterial. Aunque la isoforma que parece estar implicada con mayor probabilidad es la endotelial, también se ha descrito en el modelo de LVP la implicación de la isoforma inducible (13).

Papel del NO en la hiporrespuesta vascular a vasoconstrictores.

Otra importante alteración cardiovascular que muestran los modelos experimentales de cirrosis hepática o hipertensión arterial es una menor respuesta presora a las influencias humorales o nerviosas vasoconstrictoras (13-14). Se sabe que en las enfermedades hepáticas existe una activación del sistema nervioso simpático, de la vasopresina y del sistema renina-angiotensina, como se sabe los más poderosos vasoconstrictores endógenos. Sin embargo, la administración de esas sustancias a animales cirróticos produce una respuesta presora menor de lo normal. Esta hiporrespuesta vascular se ha observado tanto en animales conscientes como anestesiados y en distintos tejidos y vasos in vitro. Como veremos, la gran mayoría de los trabajos realizados sobre este tema indican que el NO es el principal mecanismo patogénico implicado.

En animales LCB anestesiados, la respuesta presora a endotelina 1 fue menor que en sus controles y la inhibición de la producción de NO mejoró esa respuesta parcialmente (15). En anillos aórticos de animales con LCB, la respuesta a fenilefrina está reducida y la inhibición de la síntesis de NO con L-NAME o la eliminación del endotelio mejoraron y casi corrigieron esa alteración (16-17), lo que sugiere que una mayor producción de NO, de origen predominantemente endotelial, interfiere con el mecanismo de la contracción. El uso de aminoguanidina, un inhibidor preferencial de la iNOS no mejoró la respuesta a fenilefrina (17). También en ratas LCB, la respuesta vasodilatadora al nitroprusiato sódico, un donante de NO, fue menor que la observada en las ratas controles (18), lo que sugeriría una alteración de la capa muscular. Sin embargo, la respuesta vasodilatadora a acetilcolina, que libera NO endotelial, en anillos aórticos y mesentéricos de animales con LCB fue

completamente normal, lo que sugiere que no todos los mecanismos de liberación de NO pueden estar alterados en este modelo de cirrosis biliar (17-18).

En el modelo de hipertensión portal sin afectación hepática (LVP), la administración sistémica de metoxamina reveló también una importante hiporrespuesta presora que fue revertida con el uso de un inhibidor de la producción de NO (19). También en este modelo, y usando la preparación vascular mesentérica, las respuestas presoras a noradrenalina, vasopresina y potasio fueron menores que en los animales controles y la inhibición de la síntesis de NO potenció y normalizó las respuestas presoras de los animales con LVP (20). Estos datos han sido parcialmente confirmados por otros laboratorios (21-23), que también demostraron que la principal fuente de este NO es la capa endotelial (24-25). En este modelo, también se ha descrito la participación de otros factores distintos del NO (26), como los canales de potasio, efecto que fue descrito por nuestro laboratorio (27), usando el inhibidor tetraetilamonio. Además, en estos experimentos se comprobó que el efecto del NO se lleva a cabo mediante dos mecanismos diferentes, uno es mediante la formación de cGMP y el otro, mediante la activación directa de canales de potasio. Sin embargo, el papel de los canales de potasio parece de pequeña magnitud y el NO parece ser el principal mediador de la hiporrespuesta (27). Todos estos resultados concuerdan con estudios que han encontrado una mayor actividad de la isoforma constitutiva de la NOS en arterias mesentéricas de animales con LVP (28-29), así como experimentos que demuestran una mayor liberación de NO, de las arterias mesentéricas de ratas con LVP, en respuesta a aumentos del flujo sanguíneo y del estrés de rozamiento, estímulos básicos para la liberación de NO endotelial (30).

En contraste con estas homogéneas respuestas de las arterias mesentéricas entre diferentes laboratorios, el uso de anillos de aorta de animales con LVP ha proporcionado muchas discrepancias. Así, se han descrito respuestas menores, normales o incluso aumentadas en respuesta a la aplicación de vasoconstrictores (31-34). También la actividad enzimática ha sido medida normal (29) o aumentada (28). Es muy probable que estas diferencias sean debidas a las distintas metodologías empleadas o incluso a variaciones fisiopatológicas en la actividad enzimática aórtica según el momento de evolución de la enfermedad en el animal.

En el modelo de CCl_4 , los resultados comentados anteriormente también son válidos. Así, se ha descrito que la angiotensina II y la noradrenalina producen menos efecto en estos animales que en sus controles (35-37).

En resumen, la mayor producción de NO, principalmente de origen endotelial, parece ser responsable de la menor respuesta presora a vasoconstrictores observada en el lecho mesentérico (21, 24-25, 38), riñón (39) y anillos aórticos de ratas con cirrosis o hipertensión portal (40-42).

Como se ha comentado antes, el NO parece ser el principal factor implicado en el fenómeno de hiporrespuesta vascular de los animales con hipertensión portal y cirrosis hepática. Estudios recientes de nuestro laboratorio han intentado profundizar en el mecanismo de acción del NO (43). Nuestros datos indican que el NO interfiere de forma muy importante con los mecanismos de regulación de la concentración de calcio intracelular. En un primer grupo de experimentos, utilizando el lecho arterial mesentérico aislado y perfundido de ratas con LCB, hemos analizado la respuesta presora a la adición de calcio en vasos perfundidos con un Krebs sin calcio añadido. Así, la entrada de calcio a través de sus canales dependientes de voltaje (mediante la aplicación de un medio de perfusión con alto potasio) produce una menor respuesta en los vasos de los animales LCB que en sus controles. De la misma manera, la entrada de calcio por canales operados por el receptor adrenérgico es también menor en los animales LCB. También es defectuosa la

liberación de calcio intracelular, desde los almacenes intracelulares, en respuesta a metoxamina. Estas tres alteraciones son revertidas y mejoradas tras la inhibición de la síntesis de NO, con el inhibidor L-NNA. Es decir, que el NO interfiere de forma negativa con los mecanismos que regulan tanto la entrada extracelular como la liberación intracelular del calcio (43). Para analizar estas alteraciones de una forma más directa, hemos estudiado algunos de estos mecanismos directamente en células musculares lisas aisladas de la aorta abdominal de ratas con LCB. Los niveles de calcio se han determinado tras cargar las células con fura-2, un fluorocromo que se une al calcio intracelular, y analizar sus cambios en un microscopio de fluorescencia equipado con un fotómetro altamente sensible. Los resultados obtenidos confirman nuestros datos descritos anteriormente, es decir, tanto la entrada de calcio extracelular como la liberación intracelular son menores en las células musculares lisas de los animales con LCB. Cuando inhibimos la síntesis de NO con L-NNA esas respuestas mejoraron muchísimo, al igual que ocurrió con el uso de L-NIL, un inhibidor selectivo de la isoforma inducible de la NOS. Es decir, que una mayor producción de NO, no sólo de origen endotelial como hemos visto antes, sino también muscular es responsable de la menor movilización del calcio en las células musculares lisas de los animales con cirrosis por LCB (datos sin publicar).

Agradecimientos.

Los autores agradecen a la Fundación Renal "Reina Sofía" su apoyo y todas las atenciones recibidas. Los estudios citados se han realizado con fondos públicos procedentes de la CICYT (SAF97-0176 y SAF 2000-0176) y de la Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de Murcia (PB/14/FS/99).

REFERENCES.

1. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664-666.
2. Ignarro LJ. Nitric oxide, a novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 1990;16:477-483.
3. 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.
4. López-Nova J.M. Pathophysiological features of the carbon tetrachloride/ phenobarbital model of experimental liver cirrhosis in rats. In: The kidney in liver disease. M. Epstein Ed; William and Wilkins, Baltimore, 1988, pp 309-324.
5. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: A proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988; 5: 1151-1157.
6. 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* 1992; 15:343-349.
7. Pizcueta MP, Piqué JM, Bosch J, Whittle BJR, Moncada S. Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. *Br J Pharmacol* 1992; 105:184-190.
8. 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* 1992; 103:1909-1915.
9. Lee FY, Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. N^w-nitro-L-arginine administration corrects peripheral vasodilation and systemic capillary hypotension and ameliorates plasma volume expansion and sodium retention in portal hypertensive rats. *Hepatology* 1993; 17:84-90.
10. Niederberger M, Martin P, Ginés P, Morris K, Tsai P, Xu D, McMurtry I, Schrier RW. Normalization of nitric oxide production corrects arterial vasodilation and hyperdynamic circulation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 109:1624-1630, 1995.

11. Wiest R, Shah V, Sessa WC, Groszmann RJ. NO overproduction by eNOS precedes hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999; 276: G1043-G1051.
12. 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 anaesthetised portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1997; 26: 687-693.
13. Murray BM, Paller MS. Decreased pressor reactivity to angiotensin II in cirrhotic rats. *Circ Res* 1985; 57: 424-431.
14. Murray BM, Paller MS. Pressor resistance to vasopressin in sodium depletion, potassium depletion and cirrhosis. *Am J Physiol* 1986; 251: R525-R530.
15. Hartleb M, Moreau R, Cailmail S, Gaudin C, Lebrec D. Vascular hyporesponsiveness to endothelin-1 in rats with cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 107:1085-1093.
16. Obbergh LV, Leonard V, Chen H, Xu D, Blaise G. The endothelial and non-endothelial mechanism responsible for attenuated vasoconstriction in cirrhotic rats. *Exp Physiol* 1995; 80: 609-617.
17. 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* 1996; 91: 733-738.
18. Safka V, Moreau R, Gadano A, Lebrec D. Vascular hyporesponsiveness to vasodilators in rats with cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26:382-386.
19. Lee SS, Pak J-M, Medlicott SM, Bomzon A. Vasodilatory responses of isolated arteries of cirrhotic rats. *Clin Sci* 1995; 89; 227-232.
20. Lee FY, Albillos A, Colombato LA, Groszmann RJ. The role of nitric oxide in the vascular hyporesponsiveness to methoxamine in portal hypertensive rats. *Hepatology* 1992; 16; 1043-1048.
21. Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide mediates hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1992; 103; 235-239.
22. Heinemann A, Stauber RE. The role of inducible nitric oxide synthase in vascular hyporeactivity of endotoxin-treated and portal hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1995; 278:87-90.
23. Sogni P, Sabry S, Moreau R, Gadano A, Lebrec L, Dinh-Xuan AT. Hyporeactivity of mesenteric arteries in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1996; 24: 487-490.
24. Atucha NM, Shah V, García-Cardena G, Sessa WE, Groszmann RJ. Role of the endothelium in the abnormal response of mesenteric vessels in rats with portal hypertension and liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1996; 111:1627-1632.
25. Atucha NM, Ortiz MC, Martínez C, Quesada T, García-Estañ J. Role of protein kinase C in mesenteric pressor responses of rats with portal hypertension. *Br J Pharmacol* 1996; 118:277-282.
26. Heinemann A, Wachter CH, Holzer P, Fickert P, Stauber RE. Nitric oxide-dependent and -independent vascular hyporeactivity in mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 1031-1037.
27. Atucha NM, Ortiz MC, Fortepiani LA, Ruiz FM, Martínez C, García-Estañ J. Role of cyclic GMP and potassium channels as mediators of the mesenteric vascular hyporesponsiveness in portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998; 27: 900-905.
28. Cahill PA, Foster C, Redmond EM, Gingalewski C, Wu Y, Sitzmann JV. Enhanced nitric oxide synthase activity in portal hypertensive rabbits. *Hepatology* 1995; 22:598-606.
29. Niederberger M, Ginès 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* 1996; 24: 947-951.
30. Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998; 28: 1467-1473.
31. Karatapanis S, McCormick PA, Kakad S, et al. Alteration in vascular reactivity in isolated aortic rings from portal vein-constricted rats. *Hepatology* 1994; 20:1516-1521.
32. Michielsen PP, Boeckxstaens, Sys SU, Herman AG, Pelckmans PA. The role of increased nitric oxide in the vascular hyporeactivity to noradrenaline in long-term portal vein ligated rats. *J Hepatol* 1995; 23:341-347.
33. Michielsen PP, Boeckxstaens, Sys SU, Herman AG, Pelckmans PA. Role of nitric oxide in hyporeactivity to noradrenaline of isolated aortic rings in portal hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1995; 273: 167-174.
34. Connolly C, Cawley T, McCormick A, Docherty JR. Portal hypertension increases vasoconstrictor responsiveness of rat aorta. *Clin Sci* 1999; 96: 41-47.
35. Fernandez Muñoz, M.D., Villamediana, L.M., Blanchart A, Caramelo, C, Hernando L, López-Novoa J.M. Hemodynamic effects of angiotensin II in conscious, non ascitic, cirrhotic rats. *Clin Physiol Biochem* 1988; 6:36-43.

36. Villamediana LM, Dieguez G, Santos JC, García Villalón AL, Caramelo C, López-Novoa JM. Vascular reactivity to norepinephrine in rats with cirrhosis of the liver. *Can J Physiol Pharmacol* 1988; 66:567-572.
37. Sieber CC, López-Talavera JC, Groszmann RJ. Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic vascular hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1993; 104: 1750-1754.
38. Atucha NM, Ortíz MC, Fortepiani LA, Nadal FJA, Martínez-Prieto C, García-Estañ J. Mesenteric hyporesponsiveness in cirrhotic rats with ascites: role of cGMP and K⁺ channels. *Clin. Sci.* 99: 455-460, 2000.
39. García-Estañ J, Atucha NM, Sabio JM, Vargas F, Quesada T, Romero JC. Increased endothelium-dependent renal vasodilation in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1994; 267: R549-R553.
40. Clària J, Jiménez W, Ros J, Rigol M, Angeli P, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Increased nitric oxide-dependent vasorelaxation in aortic rings of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 1994; 20: 1615-1621.
41. Ros J, Jiménez W, Lamas S, Clària J, Arroyo V, Rivera F, Rodés J. Nitric oxide production in arterial vessels of cirrhotic rats. *Hepatology* 1995; 21:554-560.
42. Weigert AL, Martin P-Y, Niederberger M, Higa EMS, McMurtry IF, Schrier RW. Endothelium-dependent vascular hyporesponsiveness without detection of nitric oxide synthase induction in aortas of cirrhotic rats. *Hepatology* 1995; 22: 1856-1862.
43. Nadal FJA, Iyu D, Atucha NM, García-Estañ J. Interaction of nitric oxide with calcium in the mesenteric bed of bile duct-ligated rats. *Br. J. Pharmacol.* 2002;135(2):489-495.