

LA DEXAMETASONA, UN INHIBIDOR DE LA EXPRESION DE LA OXIDO NITRICO SINTASA INDUCIBLE, NO MODIFICA EL ESTADO HIPERDINAMICO EN RATAS CIRROTICAS

LILIANA ALBORNOZ¹, JUAN CARLOS BANDI¹, MARCELO DE LAS HERAS², RICARDO MASTAI²

¹ Sección de Hígado, Servicio de Clínica Médica, Hospital Italiano,

² Unidad de Trasplante de Organos, Hospital Alemán, Buenos Aires

Resumen El aumento de la producción de óxido nítrico juega un papel importante en la fisiopatología de la circulación hiperdinámica asociada a la hipertensión portal. El probable mecanismo por el cual se produce este aumento no se encuentra aún bien definido. Con el objetivo de evaluar si la isoforma inducible es la responsable de estos cambios hemodinámicos, hemos estudiado el efecto de la administración de dexametasona, un inhibidor de la expresión de la óxido nítrico sintasa II, en ratas cirróticas tras la ligadura y sección del colédoco. Se determinaron los diferentes parámetros hemodinámicos sistémicos y espláncnicos, mediante la técnica de microesferas radiactivas, luego de la administración de dexametasona (3 mg/kg/día durante 3 días, ip) o su vehículo. En los animales cirróticos el efecto glucocorticoideo se puso de manifiesto a través de una disminución significativa en la ganancia de peso corporal y un moderado aumento, pero no significativo, de la presión arterial media. La administración de dexametasona no se asoció a cambios significativos de la resistencia vascular sistémica y espláncnica como así tampoco del flujo sanguíneo portal y presión portal. Similares resultados se observaron en el grupo de animales utilizados como controles. Se detectaron niveles significativamente más elevados de endotoxina en sangre portal y sistémica en 5 de 6 animales cirróticos. Nuestros resultados muestran que la administración de dexametasona no modifica los parámetros hemodinámicos sistémicos y espláncnicos en ratas cirróticas y endotoxémicas sugiriendo que la estimulación de la sintasa inducible no juega un papel importante en el aumento de la síntesis de óxido nítrico en la cirrosis.

Abstract *Dexamethasone, an inhibitor of the expression of the inducible nitric oxide synthase, does not modify the hyperdynamic state in cirrhotic rats.* Increased nitric oxide formation has been shown to be involved in the hyperdynamic circulation of portal hypertension. It has been proposed that it could be related to stimulation of the inducible nitric oxide synthase by endotoxin. Therefore, the aim of the present study was to evaluate whether dexamethasone treatment, an inhibitor of the expression of the inducible enzyme, ameliorates the hyperdynamic circulation observed in cirrhotic rats due to chronic bile duct ligation. Systemic and splanchnic hemodynamic parameters were measured after administration of dexamethasone (3 mg/kg/day during 3 days, ip) or its vehicle. In cirrhotic rats dexamethasone treatment caused a mild but not significantly higher mean arterial pressure in comparison with vehicle while similar values of cardiac output, peripheral vascular resistance, portal blood flow and portal pressure were observed in both group of animals. A significant body weight loss over the three days of treatment was observed in rats receiving dexamethasone. In sham-operated rats, dexamethasone administration caused similar changes as observed in cirrhotic animals. Endotoxemia was observed in five of six cirrhotic rats while it was not detected in the control group. Our results show that dexamethasone administration does not modify systemic and splanchnic hemodynamic parameters in endotoxemic cirrhotic rats. This finding suggests that stimulation of the inducible nitric oxide synthase may not play a role in the increased nitric oxide production in portal hypertension.

Key words: cirrhosis, systemic and splanchnic hemodynamics, nitric oxide, dexamethasone, portal hypertension

El óxido nítrico (ON) es un potente vasodilatador endógeno sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por la acción enzimática de la ON sintasa (ONS) de la cual se conocen actualmente tres isoformas: la isoforma I o neural que interviene en la transmisión nerviosa, la

isoforma III o endotelial constitutiva sintetizada en células endoteliales y la isoforma II o inducible que se expresa en un gran número de células en respuesta al estímulo por endotoxina u otras citoquinas¹.

Recientemente, hemos demostrado junto a otros autores, que un aumento de la síntesis de ON puede jugar un papel importante en la fisiopatogenia de las alteraciones hemodinámicas sistémicas y espláncnicas que se asocian a la hipertensión portal^{2, 5}. Sin embargo, en la actualidad el probable mecanismo por el cual se produce este aumento de la síntesis de ON en la hipertensión

Recibido: 4-VI-1999

Aceptado: 25-IV-2000

Dirección postal: Dr. Ricardo Mastai, Unidad de Trasplante de Organos, Hospital Alemán, Avda. Pueyrredón 1640, 1118 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4827-7085 e-mail: rmastai@hospitalaleman.com.ar

portal no se encuentra aún bien definido. Con el objetivo de evaluar si la isoforma inducible es la responsable de estos cambios hemodinámicos hemos estudiado el efecto de la administración de dexametasona, un inhibidor de la expresión de la ONS II, en un modelo experimental de cirrosis hepática.

Material y métodos

Se utilizaron 28 ratas Wistar macho de aproximadamente 200 g de peso al tiempo de la cirugía, colocadas en jaulas individuales con libre acceso a alimento y agua hasta la finalización del estudio. La cirrosis hepática fue inducida, bajo anestesia con éter, mediante la ligadura y sección del conducto biliar, según método previamente descrito⁶. Los animales fueron estudiados a las 4 semanas luego de los procedimientos quirúrgicos, tiempo necesario para desarrollar una cirrosis biliar secundaria en este modelo⁶. Los animales fueron divididos en dos grupos. En el primero de ellos se incluyeron 16 animales con cirrosis. A 8 se les administró dexametasona (3 mg/kg/día, i.p.) durante 3 días; los restantes animales recibieron placebo (solución fisiológica) administrada en las mismas condiciones que el glucocorticoide.

En el segundo grupo de animales se incluyeron 12 ratas que fueron sometidas a una operación ficticia, las cuales fueron utilizadas como controles. A 6 de ellas se les administró placebo y a las 6 restantes dexametasona, usando un esquema similar al anteriormente mencionado para los animales cirróticos. La dosis y el tiempo de administración de la dexametasona se seleccionaron de acuerdo a estudios previos^{7,8}. Asimismo, con el propósito de investigar los niveles plasmáticos de endotoxina, se realizó un estudio adicional en 6 ratas con ligadura del conducto biliar y 6 animales sometidos a operación ficticia.

Estudios hemodinámicos

Los estudios hemodinámicos se realizaron luego de 3 días de tratamiento. Las técnicas utilizadas para las mediciones hemodinámicas han sido descritas en estudios previos de nuestro u otros grupos^{9,11}. Brevemente, las ratas se anestesiaron con clorhidrato de ketamina (Ketalar, 150 mg/kg, i.m.). En primer lugar, se cateterizó el ventrículo izquierdo vía arteria carótida derecha mediante un catéter P-50. Luego, se colocó otro catéter de igual diámetro en la arteria femoral derecha con la finalidad de monitorear en forma continua la presión arterial media y obtener la muestra de sangre para el cálculo del flujo sanguíneo regional (ver más adelante). La presión portal se determinó mediante la punción directa de la vena porta antes de sacrificarse los animales. Las mediciones de presión arterial media y presión portal se obtuvieron mediante un transductor de presión (P-23 Gould Staham); el trazado de las mismas se obtuvo mediante registros continuos en un polígrafo multicanal (Dyne MCD).

El gasto cardíaco y los flujos sanguíneos regionales se midieron por la técnica de microesferas radiactivas^{9,11}. Brevemente, se inyectaron aproximadamente 60 000 microesferas marcadas con Sr 85 (15 ± 2 micras de diámetro, New England Nuclear, Ma, USA) en el ventrículo izquierdo. Se obtuvo una muestra de referencia a través del catéter colocado en la arteria femoral durante 75 segundos a una velocidad constante de 1 ml/min utilizando una bomba de extracción continua (Apema PC10). Al completar el estudio los animales fueron sacrificados mediante una inyección endovenosa de cloruro de potasio. Los pulmones, hígado, bazo, intestino, páncreas, estómago, mesenterio, riñones y testículos se extrajeron, lavaron, pesaron y colocaron en tubos. La radiactividad de cada órgano y

de la muestra de referencia se determinó en un contador gamma (Tecnuar).

El gasto cardíaco (ml/min) se calculó por la fórmula: radioactividad inyectada (cpm) x flujo de la muestra de referencia (ml/min) / radioactividad de la muestra de referencia (cpm). Sus resultados también se expresan como índice cardíaco el cual se calculó: gasto cardíaco/100 g de peso corporal. El flujo sanguíneo de cada órgano se determinó según la fórmula: radioactividad del órgano (cpm) x flujo de la muestra de referencia (ml/min) / radioactividad de la muestra de referencia (cpm). El flujo sanguíneo portal se cuantificó como la suma de los flujos sanguíneos del estómago, bazo, intestino delgado y grueso, páncreas y mesenterio. La resistencia vascular periférica (mmHg/ml/min/100 g) se calculó mediante la siguiente fórmula: presión arterial media / índice cardíaco, mientras que la resistencia vascular esplácnica (mmHg/ml/min/100 g) se calculó como: (presión arterial media-presión portal) / flujo sanguíneo portal. A los efectos de determinar la resistencia venosa portal, ΔP es la presión portal y Q es el flujo venoso portal.

Determinación de endotoxina

Se recolectó sangre portal y sistémica por punción directa de la vena porta y aorta abdominal, respectivamente, en condiciones de esterilidad usando como anticoagulante heparina (Abbott) a una concentración final de 20 UI/ml de sangre. La extracción y manipulación de muestras y reactivos se realizó con material libre de pirógenos. El plasma se separó a 4 °C y se conservó a -20 °C hasta su estudio. La endotoxina plas-mática se cuantificó mediante el test del lisado de amebocito de limulus (LAL, Whittaker Bioproducts, MD, USA)¹². Brevemente, las muestras se diluyeron 1:9 en agua libre de pirógenos y calentaron a 75 °C durante 15 min con el objeto de extraer inhibidores y/o activadores del test. Cincuenta µl de las muestras pretratadas y estándares (endotoxina de *Escherichia coli* 0111:B₄, Whittaker Bioproducts) se incubaron con 50 µl de reactivo de LAL a 37 °C durante 30 min. Se agregó el sustrato cromogénico (p-nitroanilina) y se incubó durante 20 min a 37 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido acético al 25% y se leyó la absorbancia a 405 nm. El límite de detección del ensayo fue de 1 pg/ml.

Los resultados se expresaron como media ± estándar. El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el test de la t de Student. Se consideró significativa una p < 0.05.

Resultados

Nuestros resultados confirman la presencia de un estado hiperdinámico sistémico y esplácnico en animales con cirrosis hepática por ligaduras y sección de colédoco (Tablas 2 y 3).

Tratamiento con dexametasona en animales cirróticos: Como se observa en la Tabla 1, el efecto glucocorticoide se puso de manifiesto por una disminución significativa de la ganancia de peso corporal en los animales tratados con dexametasona durante 3 días, en comparación con los que recibieron vehículo. La presión arterial media fue mayor en las ratas tratadas con dexametasona con respecto a las que recibieron vehículo, aunque esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa (Tabla 2). Los restantes parámetros hemodinámicos sistémicos y esplácnicos fueron simila-

TABLA 1.– Efecto del tratamiento con dexametasona sobre el peso corporal en ratas controles y cirróticas

Tratamiento	Controles		Cirróticas	
	Día 0	Día 3	Día 0	Día 3
Vehículo	335 ± 13	350 ± 10	416 ± 21	419 ± 23
Dexametasona	351 ± 19	310 ± 19*	389 ± 22	342 ± 21*

Media ± DE. * $p < 0.05$ respecto del día 0. La administración de dexametasona ocasionó una disminución significativa del peso corporal en los animales controles y cirróticos durante los 3 días de tratamiento

TABLA 2.– Efectos del vehículo y dexametasona sobre la hemodinámica sistémica y esplácnica en ratas controles y cirróticas

	Controles		Cirróticas	
	Vehículo (n = 6)	Dexametasona (n = 6)	Vehículo (n = 8)	Dexametasona (n = 8)
Presión arterial media (mmHg)	112 ± 6	124 ± 6	101 ± 10*	111 ± 12
Índice cardíaco (ml/min/100 g)	34.0 ± 3.1	37.0 ± 5.0	41.2 ± 7.3*	46.2 ± 13.7
Resistencia vascular periférica (mmHg/ml/min/100 g)	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1*	0.7 ± 0.1
Presión portal (mmHg)	6.2 ± 0.6	6.1 ± 0.5	15.1 ± 1.9*	14.9 ± 2.2
Flujo sanguíneo portal (ml/min/100 g)	6.2 ± 0.6	6.1 ± 1.0	7.0 ± 1.7*	7.5 ± 2.8
Resistencia vascular esplácnica (mmHg/ml/min/100 g)	5.3 ± 0.7	6.0 ± 0.8	3.5 ± 0.4*	4.1 ± 0.5

Media ± DE. * $p < 0.05$ respecto de los animales controles que recibieron vehículo. No se observaron cambios significativos entre los animales tratados con vehículo y dexametasona tanto en ratas controles como cirróticas

TABLA 3.– Hemodinámica sistémica y esplácnica, expresada en valores absolutos, en ratas controles y cirróticas

	Controles		Cirróticas	
	Vehículo (n = 6)	Dexametasona (n = 6)	Vehículo (n = 8)	Dexametasona (n = 8)
Presión arterial media (mmHg)	112 ± 6	124 ± 6	101 ± 10*	111 ± 12
Índice cardíaco (ml/min)	116 ± 12	116 ± 11	169 ± 19*	163 ± 21
Resistencia vascular periférica (mmHg/ml/min)	3.2 ± 0.5	3.0 ± 0.7	2.5 ± 0.5*	2.5 ± 0.6
Presión portal (mmHg)	6.2 ± 0.6	6.1 ± 0.5	15.1 ± 1.9*	14.9 ± 2.2
Flujo sanguíneo portal (ml/min)	20.9 ± 2.7	19.8 ± 2.6	28.5 ± 6.1*	26.7 ± 3.3
Resistencia vascular esplácnica (mmHg/ml/min)	17.1 ± 0.9	19.3 ± 1.1	13.2 ± 4.4*	14.2 ± 5.7

Media ± DE. * $p < 0.05$ respecto de los animales controles que recibieron vehículo. No se observaron cambios significativos entre los animales tratados con vehículo y dexametasona tanto en ratas controles como cirróticas

TABLA 4.— Presencia de endotoxemia en sangre portal y sistémica de animales controles y con cirrosis hepática

	Endotoxemia	
	Portal	Sistémica
Ratas controles (n = 6)	0/6	0/6
Ratas cirróticas (n = 6)	5/6	5/6

El radio representa la cantidad de ratas positivas en el test de LAL sobre el número total de ratas estudiadas. El test de LAL se realizó 28 días luego de la ligadura y sección del colédoco

res en ambos grupos de animales (Tabla 2). A los efectos de evitar la influencia de los cambios de peso corporal asociados con la administración de dexametasona, los parámetros hemodinámicos fueron expresados en valor absoluto, no encontrándose diferencias significativas en las mediciones hemodinámicas sistémicas y espláncnicas entre ambos grupos de animales (Tabla 3).

Tratamiento con dexametasona en ratas controles: En forma similar a lo observado en los animales cirróticos, el peso corporal disminuyó en forma significativa en las ratas tratadas con dexametasona a lo largo de los 3 días del estudio (Tabla 1). Se observó un aumento de la presión arterial media que no alcanzó significancia estadística en los animales tratados con dexametasona en comparación con los que recibieron vehículo. Los restantes parámetros hemodinámicos sistémicos y espláncnicos fueron similares en ambos grupos de animales (Tabla 2).

Niveles plasmáticos de endotoxina: No se encontraron niveles detectables de endotoxina en sangre periférica y portal de las ratas controles (Tabla 4). Por el contrario, se observó endotoxemia en 5 de las 6 ratas cirróticas, tanto en la circulación portal como sistémica (Tabla 4).

Discusión

Nuestros resultados demuestran que la inhibición selectiva de la ONS inducible mediante la administración durante 3 días de dexametasona no modifica la circulación hiperdinámica sistémica y espláncnica en un modelo experimental de cirrosis hepática y endotoxemia.

El ON se ha reconocido como un potente vasodilatador endógeno que interviene en diferentes procesos fisiológicos como la transmisión neural y la inhibición de la función plaquetaria¹. Esta molécula se sintetiza en el endotelio vascular, tejido nervioso y plaquetas a partir del aminoácido L-arginina a través de la acción catalítica de un grupo de enzimas denominadas ONS de las cuales se han caracterizado tres isoformas: dos de ellas son constitutivas, Ca²⁺ y calmodulina dependientes (isoformas I y III) y la tercera es inducible por citoquinas

y lipopolisacáridos bacterianos e independiente de Ca²⁺-calmodulina (isoforma II)^{1,13}. Estas enzimas son inhibidas por análogos de la L-arginina como N^G-monometil-L-arginina y N^G-nitro-L-arginina^{1,14,15}. Por otra parte, los glucocorticoides, como la dexametasona, inhiben la expresión de la isoforma inducible sin afectar a la sintasa constitutiva^{1,7}.

En los últimos años, diversos autores han sugerido que el aumento de la producción de ON juega un papel importante en las alteraciones hemodinámicas asociadas a la hipertensión portal^{2,5}. En este sentido, estudios recientes de nuestro y otros laboratorios han demostrado que la inhibición de ON mediante análogos de la L-arginina corrige la vasodilatación sistémica y espláncnica en dos modelos diferentes de hipertensión portal^{2,5}. Asimismo, se ha demostrado que la inhibición de ON normaliza la hiporreactividad a los vasoconstrictores endógenos y exógenos en ratas con hipertensión portal prehepática^{3,16}. Sin embargo, en la actualidad no se ha llegado a dilucidar si este aumento en la disponibilidad de ON que se observa en la hipertensión portal se debe a una activación de la isoforma endotelial constitutiva y/o a una estimulación de la expresión de la enzima inducible. En 1991, Vallance y Moncada¹⁷ sugirieron que el aumento de los niveles de endotoxina circulante observado en la cirrosis puede estimular la expresión de la ONS inducible con el consecuente aumento de la producción de ON. Con el propósito de evaluar la contribución de esta vía enzimática en el aumento de la disponibilidad de ON en la cirrosis, hemos investigado los efectos hemodinámicos de la dexametasona en ratas cirróticas tras la ligadura y sección del colédoco. La elección del uso de dexametasona se basa en el hecho de que este glucocorticoide administrado a la dosis señalada inhibe la expresión de la isoforma II⁷. En el presente estudio, se ha confirmado que los animales con cirrosis presentan una circulación hiperdinámica manifestada por una vasodilatación sistémica y espláncnica. De igual manera, se comprobó endotoxemia tanto en sangre portal como sistémica en este grupo de animales.

El efecto glucocorticoide se puso de manifiesto a través de un aumento de la presión arterial media y una disminución significativa de la ganancia de peso corporal durante los tres días de tratamiento con dexametasona en los animales controles y en aquellos con cirrosis hepática. El mecanismo por el cual la dexametasona promueve hipertensión arterial incluye varios factores, entre los que se destacan tanto un aumento de la reactividad vascular a los vasoconstrictores endógenos^{18,19} como una disminución de la síntesis de sustancias vasodilatadoras²⁰. Por otra parte, la disminución en la ganancia de peso corporal observada en este estudio está probablemente relacionada con el efecto catabólico de la dexametasona sobre el músculo esquelético y tejido graso^{18,21}.

En nuestro estudio, las ratas cirróticas presentaron niveles plasmáticos aumentados de endotoxina, lo que sugiere, que en este modelo experimental, la endotoxemia puede ser un estímulo para la expresión de la ONS inducible y consecuente aumento de la producción de ON. Sin embargo, la administración de un inhibidor selectivo de la expresión de esta isoforma, como la dexametasona, no modificó la circulación hiperdinámica asociada a la cirrosis. Estos resultados han sido similares a los obtenidos por otros autores tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* realizados en diferentes modelos experimentales de hipertensión portal^{22, 24}. Recientemente, García Pagan y cols. demostraron que la administración de dexametasona durante 7 días no modificaba el estado hiperdinámico en ratas con hipertensión portal prehepática²². Estas evidencias fueron confirmadas en estudios que demostraron un aumento de la expresión del ARNm y actividad de la ONS III en arteria mesentérica superior y aorta torácica sin cambios en la actividad y/o expresión de ARNm de ONS II^{22, 24}. El análisis global de estos datos sugiere que, aun cuando no puede descartarse la participación de la isoforma II, el aumento de la síntesis de ON en la hipertensión portal puede ser una consecuencia directa de la activación de la sintasa endotelial constitutiva. Es por eso que se ha sugerido que factores que se encuentran aumentados en la cirrosis, como la fuerza de rozamiento de la sangre sobre el endotelio y la liberación de vasoconstrictores endógenos, pueden ser los responsables de la activación de la ONS III²⁵. Estos hallazgos sugieren fuertemente que el aumento de la formación de ON puede ser más una consecuencia que una causa de la vasodilatación sistémica y esplácnica que se asocia a la cirrosis. Futuros estudios permitirán definir el papel que juega esta vía enzimática en la patogenia de las alteraciones hemodinámicas asociadas a la hipertensión portal.

Bibliografía

1. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
2. Pizcueta MP, Pique 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: 184-90.
3. Lee F, Albillos A, Colombato LA, Groszmann RJ. The role of nitric oxide in the vascular hyporesponsiveness to methoxamine in portal hypertensive rats. *Hepatology* 1992; 16: 1043-8.
4. Albornoz L, Bandi JC, Sanchez S, et al. Papel del óxido nítrico en las alteraciones de la hemodinámica sistémica y esplácnica en un modelo experimental de hipertensión portal. *Medicina (Buenos Aires)* 1994; 54: 17-24.
5. Pizcueta MP, Pique JM, Fernández M, et al. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 1992; 103: 1909-15.
6. Lee SS, Girod C, Baillon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile-duct ligated rats: effects of pentobarbital sodium. *Am J Physiol* 1986; 251: G176-G180.
7. Knowles RG, Salter M, Brooks SL, Moncada S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Bioch Biophys Res Comm* 1990; 172: 1042-8.
8. Knowles RG, Merrett M, Salter M, Moncada S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J* 1990; 270: 833-6.
9. Benoit JN, Womack WA, Hernández L, Granger DN. Forward and backward flow mechanisms of portal hypertension: relative contributions in the rat model of portal vein stenosis. *Gastroenterology* 1985; 89: 1092-6.
10. Benoit JN, Zimmerman B, Premen AJ, Go WLW, Granger DN. Role of glucagon in splanchnic hyperemia of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1986; 251: G674-7.
11. Sanchez S, Bandi JC, Mastai R. Blood flow measurements by the reference sample method with microsphere injection into the aorta: an accurate and easy approach. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200: 375-7.
12. Levin J, Tomasulo PA, Oser RS. Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J Lab Clin Med* 1970; 75: 903-6.
13. Forstermann U, Closs EI, Pollock J, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31.
14. Ishii K, Chang B, Kerwin JF, Huang ZJ, Murad F. N-nitro-L-arginine: a potent inhibitor of EDRF formation. *Eur J Pharmacol* 1990; 176: 219-244.
15. Rees DD, Palmer RMJ, 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: 746-52.
16. Sieber C, Groszmann RJ. Nitric oxide mediates hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1992; 103: 235-9.
17. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337: 776-8.
18. Tonolo G, Fraser R, Connell JM, Kenyon C. Chronic low dose infusion of dexamethasone in rats: effects on blood pressure, body weight and plasma atrial natriuretic peptide. *J of Hypertension* 1988; 6: 25-31.
19. Kalimi M. Role of antiglucocorticoid RU486 on dexamethasone induce hypertension in rats. *Am J Physiol* 1989; 256: E682-5.
20. Handa M, Kondo K, Suzuki H, Saruta T. Dexamethasone hypertension in rats: role of prostaglandins and pressor sensitivity to norepinephrine hypertension 1984; 6: 236-41.
21. Konagaya M, Bernard PA, Max SR. Blockade of glucocorticoid receptor binding and inhibition of dexamethasone-induced muscle atrophy in the rat by Ru 38486, a potent glucocorticoid antagonist. *Endocrinology* 1986; 119: 375-80.
22. Fernández M, García Pagán JC, Casadevall M, et al. Evidence against a role for inducible nitric oxide synthase in the hyperdynamic circulation of portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995; 108: 1487-95.
23. Cahill P, Foster C, Redmond E, Gingalewski C, Wu Y, Sitzmann J. Enhanced nitric oxide synthase activity in portal hypertensive rabbits. *Hepatology* 1995; 22: 598-606.
24. Sogni P, Smith A, Gadano A, Lebrec D, Higenbottam T. Induction of nitric oxide synthase II does not account for excess vascular nitric oxide production in experimental cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1120-7.
25. Sterling R, Sanyal A, Schubert M. Nitric oxide and portal hypertension. *Gastroenterology* 1997; 112: 1767-8.