

El estado hipovolémico modula la actividad y la expresión de la óxido nítrico sintetasa en el sistema cardiovascular

ANDREA L. FELLET, NOELIA D. ARRECHE, MARÍA G. SARAPPA, MYRIAM MAC LAUGHLIN, CRISTINA T. ARRANZ, NESMO YEYATI, ANA M. BALASZCZUK

Recibido: 07/12/2005

Aceptado: 22/12/2005

Dirección para separatas:

Prof. Dra. Ana M. Balaszczuk, PhD
Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia y
Bioquímica
Junín 956
C1113AAD Buenos Aires,
Argentina
Tel. 4964-8280 int. 312
Fax: 4964-8280 int. 309
e-mail: abalasz@ffyba.uba.ar

RESUMEN

Previamente mostramos que el pretratamiento con el inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), revierte la hipotensión y anula los cambios en la frecuencia cardíaca inducidos por la hemorragia.

Objetivo

Evaluar la actividad histoquímica (técnica NADPH-diaforasa) y la expresión (Western blot) de la óxido nítrico sintetasa en la aurícula derecha y en el ventrículo izquierdo de animales sometidos a una hemorragia del 20% de la volemia.

Material y métodos

Se conformaron cuatro grupos de animales (n = 14, por grupo): S (*sham*), H (hemorragia), SL-NAME (*sham* + L-NAME) (0,5 mg/kg/h IV = 100 µl/h) y HL-NAME (hemorragia + L-NAME). El sacrificio de los animales se realizó por decapitación a los 60 y a los 120 min posteriores al sangrado y se extrajo el corazón para su estudio.

Resultados

La pérdida de sangre aumentó la actividad de la NOS en la aurícula y en el ventrículo a los 60 y 120 min (aurícula: 8% y 21%, respectivamente; ventrículo: 21% y 45%, respectivamente) del sangrado. El análisis de Western blot con empleo de un anticuerpo antióxido nítrico sintetasa inducible reveló la presencia de dicha proteína en la aurícula y en el ventrículo a los 120 min del sangrado (654 ± 13 y 465 ± 9 unidades arbitrarias, respectivamente). La expresión de la óxido nítrico sintetasa endotelial aumentó en la aurícula y en el ventrículo a los 60 min (18% y 147%, respectivamente) en comparación con S, normalizándose a los 120 min de la hemorragia.

Conclusiones

El estado hipovolémico inducido por una hemorragia del 20% de la volemia está asociado con un patrón heterogéneo y dinámico de regulación de la actividad y de la expresión de la óxido nítrico sintetasa en el tejido cardíaco.

REV ARGENT CARDIOL 2006;74:43-49.

Palabras clave > Hemorragia - Óxido nítrico sintetasa - Hipotensión - Frecuencia cardíaca

Abreviaturas >

A	Absorbancia	L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
ANOVA	Análisis de la varianza de una variable	nNOS	Óxido nítrico sintetasa neuronal
EEM	Error estándar de la media	NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial	NOS	Óxido nítrico sintetasa
FC	Frecuencia cardíaca	PAM	Presión arterial media
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible		

INTRODUCCIÓN

La hemorragia aguda es la causa más frecuente de shock hipovolémico. La adaptación cardiovascular ante la pérdida de volumen sanguíneo depende no sólo del control dinámico del sistema nervioso autónomo, sino también de la magnitud de la hemorragia, de la velo-

cidad del sangrado y de la especie examinada. (1) El sistema del óxido nítrico (NO), uno de los múltiples sistemas que se estimulan durante la depleción aguda de volumen, participa en esa respuesta adaptativa. (2) Se ha descrito que el aumento de la producción de NO durante una hemorragia descompensada contribuye a la hiporreactividad vascular y, probablemente

te, a la alteración de la regulación autonómica de la función cardíaca en este estado. (3, 4) El NO se sintetiza endógenamente a partir de la L-arginina y del oxígeno molecular mediante una reacción que es catalizada por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintetasas (NOS): la NOS inducible (iNOS), la NOS endotelial (eNOS) y la NOS neuronal (nNOS). La expresión de las diferentes isoformas en el corazón es específica de célula. (5) La eNOS se ha identificado por inmunohistoquímica predominantemente en células endoteliales de la vasculatura coronaria y endocárdicas. Esta enzima también se expresa en los miocitos cardíacos y en células de los nódulos sinusal y auriculoventricular. (6) La nNOS se ha identificado en el ganglio parasimpático intracardiaco, (7) así como en neuronas de las regiones autonómicas cardíacas del cerebro. (8) La isoforma iNOS, independiente del calcio, se expresa en respuesta a endotoxinas y citocinas en ciertas situaciones clínicas, como el trauma y la sepsis. (9, 10) La iNOS, con dependencia del estímulo, puede expresarse en células infiltrantes inflamatorias, células de la microvasculatura coronaria, células endoteliales endocárdicas, músculo liso de la vasculatura coronaria, fibroblastos y en miocitos cardíacos. (11)

El NO es reconocido como un factor autacoide-paracrino involucrado en la modulación del control autonómico cardíaco. (12) Algunos trabajos mostraron que el inhibidor no selectivo de la NOS, N^c-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), induce un aumento sostenido de la frecuencia cardíaca (FC) en respuesta a la hemorragia. (13) Sin embargo, otros autores han descrito que la inhibición de la síntesis de NO atenúa la taquicardia y la excitación simpática inducida por una hemorragia aguda. (14)

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación del sistema del NO cardíaco en las alteraciones hemodinámicas asociadas con un estado hipovolémico inducido por una hemorragia aguda en ratas anestesiadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos (230-250 g). Los animales se mantuvieron en un ambiente con humedad y temperatura controlada con un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas. Los animales fueron alimentados con una dieta balanceada provista por Nutrimentos Purina, Buenos Aires, Argentina, y con agua *ad libitum* hasta el día de los experimentos. Todos los animales incluidos en los protocolos experimentales se trataron de acuerdo con los lineamientos y principios de la Disposición N° 6344-96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación.

Animales

Las ratas fueron anestesiadas con etiluretano (1,0 g/kg, ip). La temperatura corporal se monitorizó con un termómetro rectal y se mantuvo entre 36 y 38 °C durante todo el tiempo

experimental. La traqueotomía se practicó con un tubo de polietileno (PE-240) con el objetivo de mantener una ventilación pulmonar correcta. La medición de la presión arterial media (PAM) se realizó con una cánula inserta en la arteria femoral derecha conectada a un transductor de presión (Statham P23 ID, Gould Inst. Cleveland, OH) y se registró con un poligrafo (Physiograph E & M Co, Houston, TX). Los valores de FC se obtuvieron partir de la señal de presión pulsátil latido a latido mediante un tacógrafo preamplificador (S77-26 tachometer, Coulbourn Inst., Allentown, PA). Para la adquisición de datos se utilizó el programa Labtech Notebook (Laboratory Tech., Wilmington, MD). Se realizó la monitorización continua de los valores de la presión arterial media (PAM) y de la FC. Se canularon la vena femoral izquierda para la administración de la infusión continua de L-NAME (0,5 mg/kg/h IV = 100 µl/h) (15) y la arteria femoral derecha para practicar el sangrado. El shock hemorrágico fue inducido por una pérdida del 20% del volumen sanguíneo total, durante 2 min, a velocidad de flujo constante. El volumen de sangrado (20% de la volemia) se calculó individualmente a partir del volumen sanguíneo total correspondiente al peso corporal de cada animal.

Protocolo experimental

Se utilizaron cuatro grupos experimentales:

- 1) *Ratas sham (S)*. Luego de un período de estabilización de 30 min, se registraron los valores basales de PAM y FC durante 5 min. A continuación se registraron la PAM y la FC durante 120 min (n = 14).
- 2) *Efecto del L-NAME en ratas sham (S L-NAME)*. Luego de un período de estabilización de 30 min, se registraron los valores basales de PAM y de FC. A continuación se administró el L-NAME mediante una infusión hasta el final del período experimental. Los valores de PAM y de FC se registraron durante 120 min (n = 14).
- 3) *Ratas con hemorragia (H)*. Luego de un período de estabilización de 30 min, se registraron los valores basales de PAM y de FC durante 5 min. A continuación los animales fueron sometidos a una hemorragia del 20% de la volemia. Los valores de PAM y de FC se registraron durante 120 min (n = 14).
- 4) *Efecto del L-NAME en ratas con hemorragia (H L-NAME)*. Luego de un período de estabilización de 30 min, se registraron los valores basales de PAM y FC durante 5 min. A continuación se administró el L-NAME mediante una infusión hasta el final del período experimental. Luego de 10 min de iniciada la infusión con el inhibidor inespecífico de la NOS, los animales fueron sometidos a una hemorragia del 20% de la volemia. Los valores de PAM y de FC se registraron durante 120 min (n = 14).

Actividad histoquímica de la NOS

Se determinó la actividad NADPH-diaforasa como actividad total de la NOS en los grupos S y H (n = 5 por grupo). Un grupo de animales de S y H fueron sacrificados por decapitación a los 60 min y otro a los 120 min luego de la hemorragia. Se extrajeron la aurícula derecha y el ventrículo izquierdo, que posteriormente se fijaron en paraformaldehído al 4% (*buffer* fosfato 0,1 M, pH = 7,4). Los tejidos se criopreservaron en sacarosa 15% y se congelaron. Se cortaron en criostato secciones de tejido de 15 µm que luego se montaron en portaobjetos gelatinizados. A continuación, los cortes se incubaron con una solución con 1,2 mM de NADPH y 0,24 mM de azul de nitrotetrazolio (*buffer* fosfato con tritón X-100: 0,3%) durante 60 min a 37 °C. La observación de los cortes, la determinación de la absorbancia (A) y la toma de fotografías se realizaron con un microscopio Zeiss Axiophot acoplado a la cámara. El análisis de las imágenes obtenidas

de los cortes de tejido se efectuó con un analizador Kontron-ZEISS VIDAS-Analyzer.

Western blot

Animales pertenecientes a los grupos S y H ($n = 5$ por grupo) fueron sacrificados por decapitación, a los 60 min y a los 120 min luego de producida la hemorragia, para la extracción de la aurícula derecha y el ventrículo izquierdo. Los tejidos se transfirieron de inmediato a un vaso de precipitado con *buffer* de homogeneización (50 mmol/L Tris, 0,1 mmol/L EDTA, 0,1 mmol/L EGTA, 1% tritón, 1 mmol/L PMSF, 1 μ mol/L pepstatina, 2 μ mol/L leupeptina; Roche Diagnostics). La cuantificación de las proteínas se efectuó con el método de Lowry. Se separaron cantidades iguales de las muestras de proteínas (45 μ g) en un gel 7,5% SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Munchen, Germany). Se prosiguió con una incubación primaria con anticuerpo policlonal de conejo anti las tres isoformas de la NOS (dilución 1:500: anti-NOS inducible, epítipo en el carboxilo terminal; anti-NOS endotelial, epítipo en el amino terminal y anti-NOS neuronal, epítipo en el amino terminal). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa de rabanita (dilución 1:5.000). Las muestras se revelaron por quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden) durante 2-4 min. La densidad de las bandas se determinó por densitometría con un escáner Hewlett-

Packard y un *software* de análisis Totallab (Biodynamics Corp., Seattle, WA).

Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). Para el análisis de los datos se utilizó el análisis de la varianza de una variable (ANOVA) seguido de una prueba de Bonferroni para múltiples comparaciones. Se utilizó la prueba de la *t* de Student para comparar los datos apareados o no apareados entre dos grupos. Se consideró significativo el 5% de probabilidad. Para el análisis estadístico se utilizó el programa de estadística GraphPad Prism versión 3.02 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Parámetros hemodinámicos

En condiciones basales, los valores de PAM (mm Hg) y de FC (lpm) no mostraron diferencias significativas en los cuatro grupos de animales estudiados ($S = 89 \pm 4$; 332 ± 7 ; S L-NAME = 94 ± 5 ; 326 ± 8 ; $H = 90 \pm 5$; 322 ± 6 ; H L-NAME = 93 ± 6 ; 328 ± 10 ; respectivamente) ($p = ns$). La Figura 1 (gráficos A, B, C y D) ilustra el curso temporal de la PAM en los cuatro grupos de animales estudiados. La infusión de L-NAME no modificó la PAM en el grupo S con respecto a los

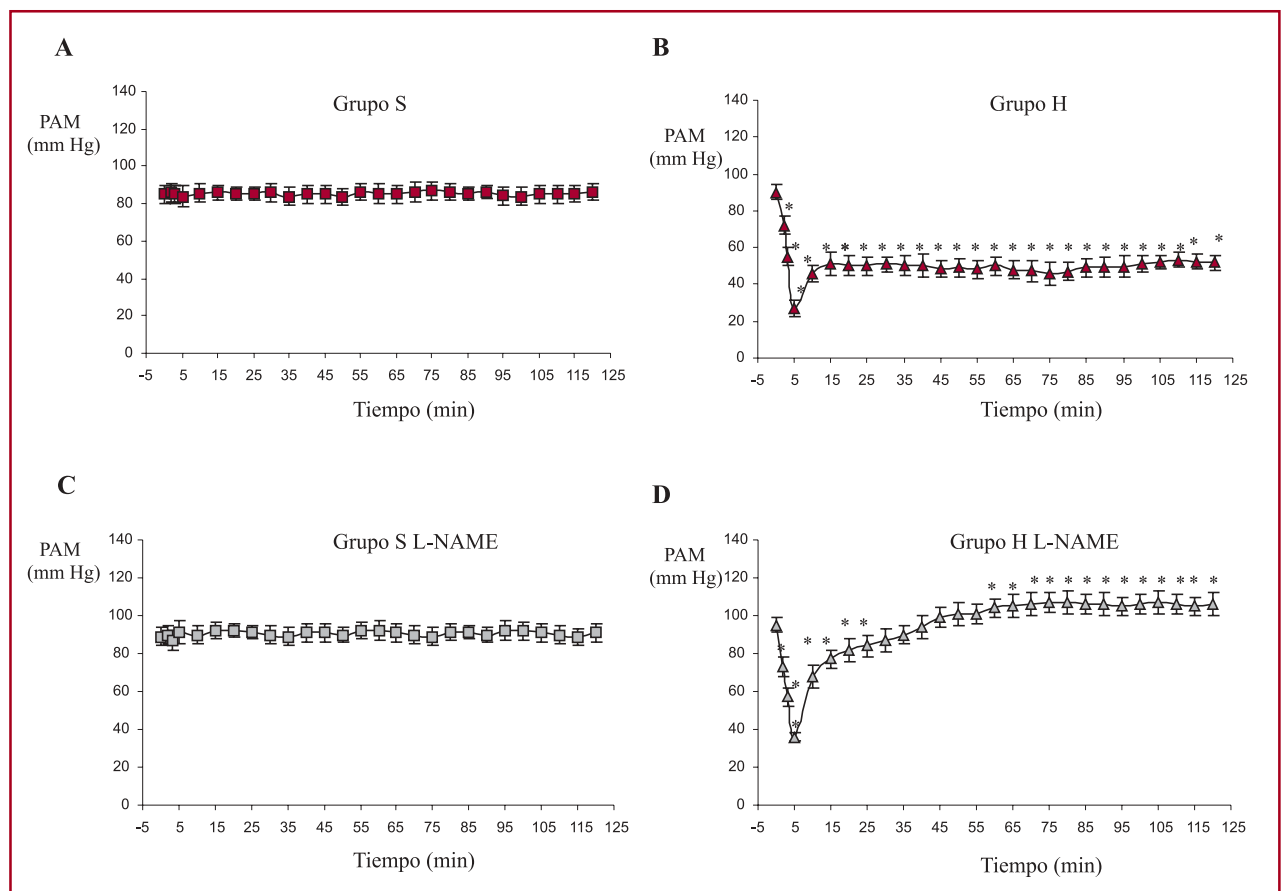


Fig. 1. Efecto del L-NAME sobre la presión arterial media (PAM). Ratas *sham* (S) y ratas hipovolémicas (H). ■ grupo S; ▲ grupo H; □ grupo N L-NAME; ▲ grupo H L-NAME. * $p < 0,01$ versus valores basales ($n = 14$ por grupo).

valores basales. La hemorragia provocó una disminución significativa de la PAM, tanto en el grupo H como en el grupo H L-NAME. En el grupo H, la PAM se estabilizó a los 15 min en valores cercanos a 50 ± 5 mm Hg (* $p < 0,01$ versus valores basales). La hipotensión se mantuvo a lo largo de todo el tiempo experimental. El pretratamiento con L-NAME no atenuó la hipotensión inmediata ocasionada por la hemorragia. A partir de los 30 min no se observaron diferencias significativas en los valores de PAM con respecto a los valores basales.

La Figura 2 (gráficos A, B, C y D) ilustra el curso temporal de la FC en los cuatro grupos de animales estudiados. La hemorragia indujo, luego de la esperada respuesta refleja, una bradicardia en la primera etapa, seguida de un incremento gradual de la FC en las fases más tardías (basal FC = 322 ± 6 ; FC 60 min = $352 \pm 7^*$; FC 120 min = $382 \pm 6^*$, * $p < 0,01$ versus valores basales). La infusión de L-NAME anuló los cambios en la FC inducidos por la hemorragia (basal

FC = 328 ± 10 , FC 60 min = 334 ± 15 , FC 120 min = 335 ± 17).

Actividad histoquímica de la NOS en el corazón

En la Tabla 1 se muestran los cambios en la actividad histoquímica de la NOS en los grupos S y H. La actividad de la NOS en la aurícula derecha y en el ventrículo izquierdo aumentó a los 60 min (8% y 21%, respectivamente) y a los 120 min (24% y 45%, respectivamente) luego de inducido el estado hipovolémico.

Western blot

En las Figuras 3 y 4 pueden observarse los resultados del análisis del Western blot. Los histogramas ilustran los valores promedio de los niveles proteicos de las diferentes isoformas de la NOS en los grupos S y H a los 60 y 120 min de producida la hemorragia. La pérdida aguda de sangre aumentó la expresión de la isoforma eNOS en la aurícula derecha a los 60 min en

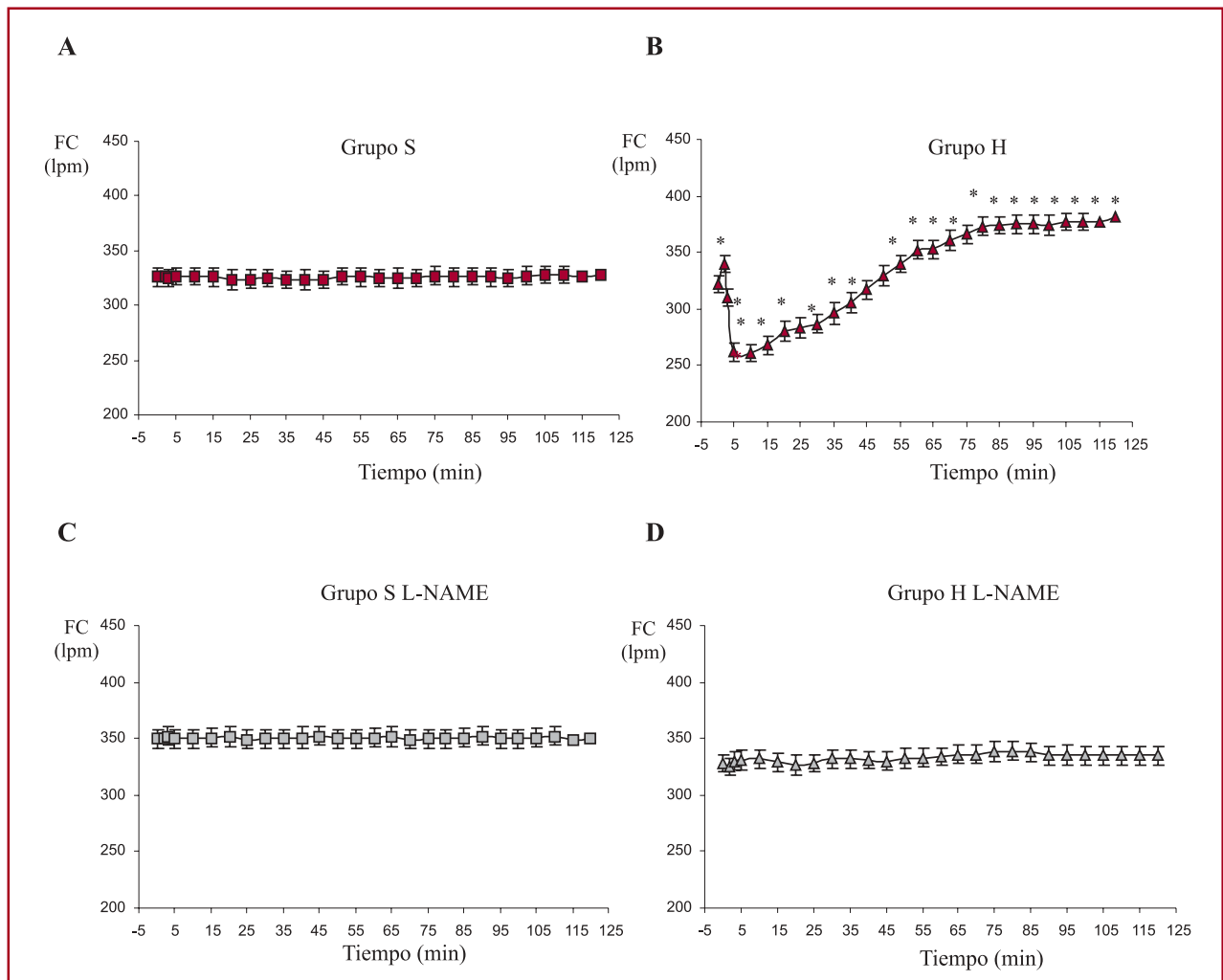


Fig. 2. Efecto del L-NAME sobre la frecuencia cardíaca (FC). Ratas sham (S) y ratas hipovolémicas (H). ■ grupo S; ▲ grupo H; □ grupo N L-NAME; ▲ grupo H L-NAME. * $p < 0,01$ versus valores basales (n = 14 por grupo).

Tabla 1. Actividad NADPH-diaforasa a los 60 y 120 min posteriores a una hemorragia del 20% de la volemia en la aurícula derecha y el ventrículo izquierdo. Ratas *sham* (S) y ratas hipovolémicas (H)

	Grupo S 60 min (A)	Grupo H 60 min (A)	Grupo S 120 min (A)	Grupo H 120 min (A)
Aurícula derecha	0,186 ± 0,006	0,201 ± 0,005*	0,190 ± 0,004	0,235 ± 0,002*
Ventrículo izquierdo	0,119 ± 0,009	0,144 ± 0,005*	0,124 ± 0,004	0,180 ± 0,004*

A: Absorbancia. *p < 0,01 versus grupo S.

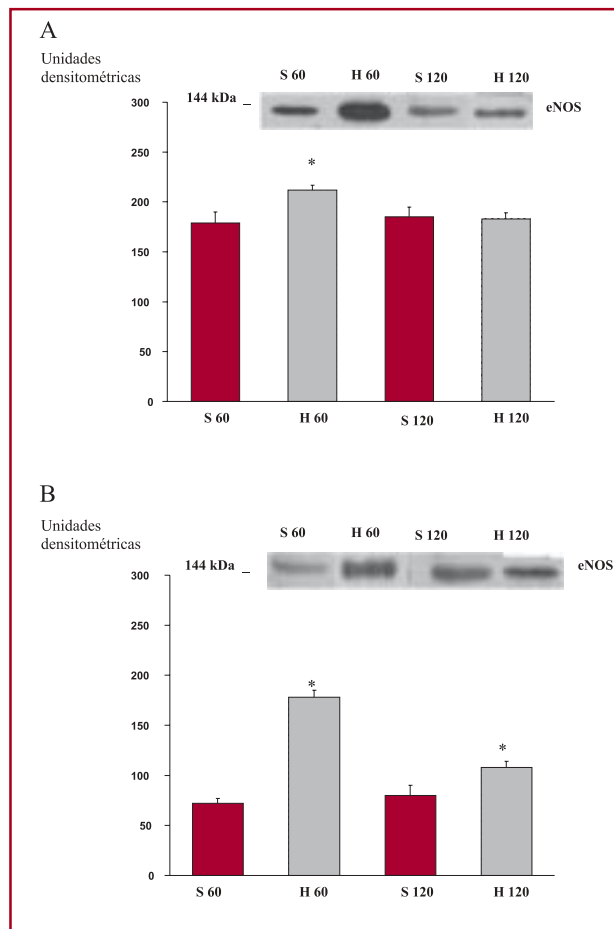


Fig. 3. Western blots representativos de la NOS endotelial a los 60 y 120 min posteriores a una hemorragia del 20% de la volemia, en la aurícula derecha (gráfico A) y en el ventrículo izquierdo (gráfico B). Ratas *sham* (S) y ratas hipovolémicas (H). ■ grupo S; □ grupo H. * p < 0,01 versus grupo S (n = 5 ratas/grupo).

comparación con S. No se observaron cambios en los niveles de esta isoforma a los 120 min posteriores al sangrado (p = ns) (Figura 3, panel A). La Figura 3 (panel B) muestra los cambios de la expresión de la isoforma en el ventrículo izquierdo. La hemorragia indujo un incremento en la expresión de la NOS endotelial a los 60 y 120 min en comparación con S. En la Figura 4 se muestra la presencia de la isoforma inducible de la NOS, tanto en la aurícula derecha como en el ventrículo izquierdo a los 120 min del sangrado en comparación con el grupo S (Figura 4, gráficos A y B).

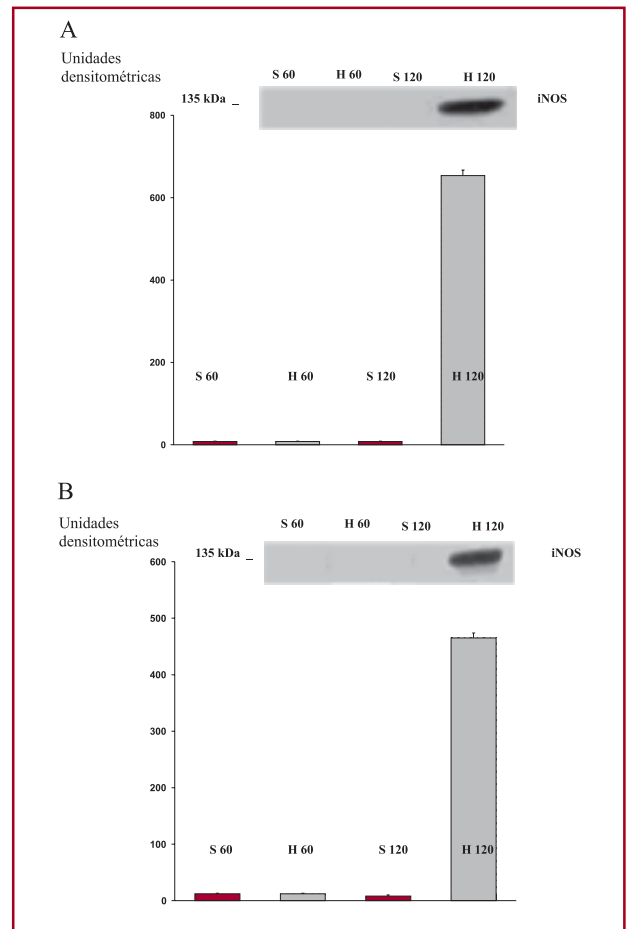


Fig. 4. Western blots representativos de la NOS inducible a los 60 y 120 min posteriores a una hemorragia del 20% de la volemia, en la aurícula derecha (gráfico A) y en el ventrículo izquierdo (gráfico B). Ratas *sham* (S) y ratas hipovolémicas (H). ■ grupo S; □ grupo H. * p < 0,01 versus grupo S (n = 5 ratas/grupo).

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que la pérdida aguda de sangre induce una activación dependiente del tiempo de las diferentes isoformas de la NOS en el tejido cardíaco. Este patrón dinámico de activación estaría relacionado con las alteraciones hemodinámicas observadas durante el estado hipovolémico en ratas anestesiadas.

Los animales de los diferentes grupos presentaron condiciones hemodinámicas basales similares. La

pérdida del 20% de la volemia indujo un descenso rápido y significativo (68%) de la presión arterial. El estado hipotensivo se mantuvo durante todo el tiempo experimental. La inhibición del sistema del NO no modificó la hipotensión inmediata (61%), pero ocasionó la rápida recuperación de la PAM. Estos hallazgos sugieren que la hipotensión inmediata sería independiente del sistema del NO. Sin embargo, luego de los 5 minutos de producido el sangrado, el NO modularía la respuesta vascular sistémica a través de su acción vasodilatadora en el músculo liso vascular. Además, no descartamos la participación de otros factores neurohormonales (catecolaminas, endotelinas, vasopresina, sistema renina-angiotensina) que se activan en respuesta a una pérdida aguda de sangre. (16, 17)

Al evaluar la respuesta cronotrópica, se ha encontrado que el estado hipovolémico indujo luego de la inmediata y esperada taquicardia refleja una bradicardia breve seguida por un incremento gradual y progresivo de la FC a los 60 y 120 minutos (10% y 16%, respectivamente). El pretratamiento con L-NAME anuló los cambios observados en la FC inducidos por la pérdida de sangre. La inhibición del sistema del NO alteraría el control autonómico de la FC en nuestro modelo experimental. En los últimos años se ha demostrado que el NO actuaría presinápticamente facilitando el tono vagal (18) y disminuyendo la FC luego de la taquicardia refleja en ratas sometidas a una hemorragia. La falta del cronotropismo positivo a los 60 y 120 min posteriores al sangrado podría deberse a una acción directa, o bien a un efecto secundario que resultaría de la ausencia del estado hipotensivo luego de la inhibición de la vía de producción del NO.

Es conocido que el corazón participa de una manera trascendente en la respuesta de adaptación ante la hipotensión inducida por el estado hipovolémico. La pérdida de sangre constituye un estímulo estresante para el sistema cardíaco, con disminución de la precarga y de la perfusión tisular. (19) En este trabajo hemos mostrado, mediante el análisis histoquímico, que el shock hipovolémico indujo un aumento de la actividad del sistema del NO en la aurícula derecha y en el ventrículo izquierdo, tanto a los 60 min como a los 120 min de realizado el sangrado. Este aumento de actividad de la enzima se correlacionó con aumentos en los niveles proteicos de la enzima en la aurícula y en el ventrículo. Nuestros resultados mostraron que el estado hipovolémico inducido por hemorragia se acompaña de una activación dinámica de las diferentes isoformas de la NOS en el corazón. Se observó una sobreexpresión de la isoforma endotelial a los 60 min posteriores al sangrado, seguida de un notorio incremento a los 120 min de la iNOS. El aumento de la producción de NO, en ambos tejidos, sería de origen endotelial en las fases más tempranas (60 min) luego de la pérdida de sangre. Sin embargo, el shock hemorrágico indujo, en las etapas más tardías (120

min), la activación de la isoforma inducible en ambos tejidos estudiados. Los mecanismos que promueven la activación de la isoforma constitutiva de la NOS cardíaca en el estado hipovolémico es poco conocida. Se ha descrito que el shock hemorrágico está asociado en las etapas más tempranas con un aumento de la liberación de varias sustancias endógenas, entre las cuales podrían mencionarse las bradisininas, el trifosfato de adenosina y la serotonina. Estas sustancias estimularían la producción de NO a partir de la isoforma endotelial. (20) La sobreactivación de la isoforma inducible en las fases más tardías del shock hemorrágico podría deberse a la liberación del factor de necrosis tumoral alfa, de interleucina 1, aumento en la síntesis de especies reactivas del oxígeno, y de otras endotoxinas. (21)

En resumen, los hallazgos del presente estudio muestran por primera vez que una activación dinámica, heterogénea y dependiente del tiempo de la NOS cardíaca estaría involucrada en las alteraciones hemodinámicas que se observan luego de la pérdida aguda del 20% del volumen sanguíneo. La inhibición del sistema del NO en las etapas más tardías del shock hemorrágico modulando la respuesta taquicardizante podría constituir una herramienta terapéutica beneficiosa en este estado hipovolémico.

SUMMARY

Hypovolemic State Modulates Nitric Oxide Synthase Activity and Expression in the Cardiovascular System

Background

We have previously demonstrated that pre-treatment with the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N^G-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME), reverted hypotension and minimized hemorrhage-induced heart rate changes.

Study Aim

To evaluate the histochemical activity (NADPH-diaforase method) and expression (Western blot) of NOS in right atrium (A) and left ventricle (V) of animals subjected to a 20% loss of the total blood volume.

Methods

We included four groups of animals ($n = 14$ per group): 1) (S) sham; 2) (H) hemorrhage (20% blood loss); 3) (SL-NAME) sham + pretreatment with L-NAME; and 4) (HL-NAME) hemorrhage and pretreatment with L-NAME. Animals were sacrificed by decapitation 60 and 120 min after bleeding, and their hearts were extracted.

Results

Blood loss increased histochemical NOS activity in A and V at 60 and 120 min (A 8% and 24%; V 21% and 45%, respectively). Inducible anti-NOS antibody Western blot analysis showed increased protein in A and V 120 min after blood loss (654 ± 13 and 465 ± 9 arbitrary units, respectively). A and V endothelial NOS expression increased at 60 min (18% and 147%, respectively) compared to S, showing a normal value 120 min after blood loss.

Conclusion

The hypovolemic state induced by a 20% loss of total blood volume is associated with an heterogeneous and dynamic regulatory pattern of the activity and expression of NOS in heart tissue.

Key words > Hemorrhage - Nitric oxide synthase - Hypotension - Heart rate

BIBLIOGRAFÍA

- Schadt JC, Ludbrook J. Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am J Physiol* 1991; 260:H305-18.
- Goldstein B, Mickelsen D, Want A, Tipton R, Cox C, Woolf PD. Effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester on autonomic modulation of heart rate variability during hypovolemic shock. *Crit Care Med* 1999;27:2239-45.
- Thiemermann C, Wu CC, Szabo C, Perretti M, Vane JR. Role of tumour necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in a rat model of endotoxin shock. *Br J Pharmacol* 1993;110:177-82.
- Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Cardiac and regional haemodynamics, inducible nitric oxide synthase (NOS) activity, and the effects of NOS inhibitors in conscious, endotoxaemic rats. *Br J Pharmacol* 1995;116:2005-16.
- Schwarz P, Diem R, Dun NJ, Forstermann U. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. *Circ Res* 1995;77:841-8.
- Seki T, Hagiwara H, Naruse K, Kadowaki M, Kashiwagi M, Demura H, et al. In situ identification of messenger RNA of endothelial type nitric oxide synthase in rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218:601-5.
- Yoshida K, Toda N. NADPH diaphorase-positive neurons in the intracardiac plexus of human, monkey and canine right atria. *Brain Res* 1996;724:256-9.
- Patel KP, Zhang K, Zucker IH, Krukoff TL. Decreased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in hypothalamus and brainstem of rats in heart failure. *Brain Res* 1996;734:109-15.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res* 1998;83:1271-8.
- Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1995;270:14582-6.
- Han X, Shimoni Y, Giles WR. An obligatory role for nitric oxide in autonomic control of mammalian heart rate. *J Physiol* 1994; 476:309-14.
- Secher NH, Jacobsen J, Friedman DB, Matzen S. Bradycardia during reversible hypovolaemic shock: associated neural reflex mechanisms and clinical implications. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992;19:733-43.
- Koch MA, Hasser EM, Schadt JC. Influence of nitric oxide on the hemodynamic response to hemorrhage in conscious rabbits. *Am J Physiol* 1995;268:R171-82.
- Minami N, Imai Y, Nishiyama H, Abe K. Role of nitric oxide in the development of vascular alpha 1-adrenoreceptor desensitization and pressure diuresis in conscious rats. *Hypertension* 1997;29:969-75.
- Fujisawa Y, Mori N, Yube K, Miyanaka H, Miyatake A, Abe Y. Role of nitric oxide in regulation of renal sympathetic nerve activity during hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol* 1999;277:H8-14.
- Moreno C, Lopez A, Llinas MT, Rodriguez F, Lopez-Farre A, Nava E, et al. Changes in NOS activity and protein expression during acute and prolonged ANG II administration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R31-7.
- Fujisawa Y, Mori N, Yube K, Miyanaka H, Miyatake A, Abe Y. Role of nitric oxide in regulation of renal sympathetic nerve activity during hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol* 1999;277:H8-14.
- McDonough KH, Giaimo M, Quinn M, Miller H. Intrinsic myocardial function in hemorrhagic shock. *Shock* 1999;11:205-10.
- Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* 1988;12:530-48.
- Vaagenes P, Gundersen Y, Opstad PK. Rapid rewarming after mild hypothermia accentuates the inflammatory response after acute volume controlled haemorrhage in spontaneously breathing rats. *Resuscitation* 2003;58:103-12.