

## **Acerca do impacto da administração transdérmica de um inibidor da NO-sintetase (L-NAME) – uma abordagem preliminar**

*About the impact of the transdermal application of a NO synthetase inhibitor (L-NAME) – a preliminary approach*

**Pedro Contreiras Pinto<sup>1</sup>, Tiago Félix<sup>1</sup>, Luís Monteiro Rodrigues<sup>2,1</sup>**

<sup>1</sup>Unidade de Dermatologia Experimental, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófon, Campo Grande 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia Experimental, Universidade de Lisboa (Fac. Farmácia), 1640-063, Lisboa, Portugal

pcontreiras@ulusofona.pt

---

### **Resumo**

O L-NAME, um dos inibidores do NO mais utilizados para o estudo da função microcirculatória na hiperémia cutânea, é normalmente administrado por microdiálise, uma técnica invasiva e traumática com reconhecidas limitações. Neste contexto, procurou-se avaliar, ainda que de forma preliminar, o interesse da aplicação transdérmica de L-NAME em experiências de indução de hiperémia local.

O estudo consistiu na aplicação (durante 2 horas) de um sistema oclusivo contendo L-NAME (40µl) a 10mM, ou 100mM e um controlo com água destilada, no antebraço de voluntários saudáveis (n=5). Após a oclusão os voluntários foram submetidos a um protocolo de aquecimento local da pele a 42°C durante 20 minutos, com a resposta hiperémica avaliada por Fluxometria de Laser Doppler (LDF). A análise estatística das várias concentrações de inibidor, envolveu a comparação das diferentes fases do estudo com o controlo através de estatística não paramétrica.

A aplicação de 100mM de L-NAME desencadeou a inibição de toda a resposta microcirculatória, o que constitui um bom indício para que esta metodologia continue a ser desenvolvida.

**Palavras chave:** L-NAME, transdérmico, LDF, temperatura, microcirculação

---

### **Abstract**

L-NAME, one of the most used NO inhibitors for microcirculatory function study purposes with cutaneous hyperemia, is usually administered by microdialysis, an invasive and traumatic technique with well known limitations. So, we've tried to evaluate, even if preliminarily, the interest of the transdermal application of L-NAME to local hyperemic experiments.

The experiments involved the topical application (for 2 hours) of an occlusive system containing L-NAME (40µl) at 10 mM or 100 mM and a distilled water control, in the healthy volunteer's forearm (n=5). After the occlusion, volunteers were submitted to a local heating protocol at 42°C during 20 minutes. The hyperemic response was evaluated by Laser Doppler Flowmetry (LDF). Results from the different concentrations involved were compared with the control by non parametric methods.

The application of 100 mM of L-NAME inhibits the microcirculatory response, a good indicator for further developments around this methodology.

**Key Words:** L-NAME, transdermal, LDF, temperature, microcirculation

---

Recebido em 01/10/2009

Aceite em 16/11/2009

Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2008; (6) 2: 246-252

Versão electrónica: <http://revistas.ulusofona.pt/index.php/revistasaude>

## Introdução

O estudo da hiperémia térmica após aquecimento local da pele, bem como dos mecanismos e funções dos diferentes mediadores envolvidos nessa resposta tem sido importante para o desenvolvimento de protocolos dinâmicos de diagnóstico, sobretudo não invasivos, da patologia vascular<sup>(1-5)</sup>. Estes protocolos são especialmente relevantes em situações correntes, como no acompanhamento das lesões microcirculatórias na diabetes<sup>(1,2,6)</sup>, ou no diagnóstico precoce de doenças vasculares, como na doença arterial periférica obstrutiva (PAOD)<sup>(4)</sup> e no síndrome de taquicardia postural (POTS)<sup>(5)</sup>.

Em termos fisiológicos, na pele não glabra, as alterações no fluxo sanguíneo cutâneo, resultantes das variações de temperatura de aquecimento exterior parecem ser mediadas por reflexos neurogénicos, incluindo a produção local de óxido nítrico (NO)<sup>(7)</sup>, embora possam existir outros mediadores locais, que apesar dos numerosos estudos já efectuados não se encontram ainda totalmente identificados<sup>(7-12)</sup>. A 42°C, estes mecanismos desencadeiam uma resposta bifásica que gera um aumento rápido do fluxo vascular cutâneo nos primeiros 3 a 5 minutos, devido à activação dos receptores vaniloides tipo 1, seguida da libertação antidrómica de um neurotransmissor vasodilatador<sup>(7)</sup>. Após esta resposta inicial segue-se um decréscimo moderado e um aumento lento, que estabiliza numa fase de platô, 20 a 30 minutos após o início do aquecimento<sup>(8,10,13)</sup>. Esta fase parece resultar da libertação de mediadores locais, principalmente do NO<sup>(7,8,14-20)</sup>. Com temperaturas superiores, nomeadamente quando o aquecimento é realizado a 44°C, o perfil de resposta é substancialmente diferente, passando-se directamente para uma fase de platô sem formação do pico e vale iniciais<sup>(21)</sup>.

O estudo destes mecanismos celulares tem envolvido a utilização de inibidores da síntese do NO, nomeadamente o Nω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), um análogo da arginina que actua como inibidor reversível e inespecífico da NO sintetase reduzindo assim a produção de NO<sup>(22)</sup>. A administração destas moléculas é normalmente realizada sob a forma de perfusão por microdiálise<sup>(7-12)</sup>, uma técnica invasiva e dolorosa que interfere no próprio resultado final ao induzir um trauma que requer a utilização de analgésicos locais com acção vasodilatadora durante o procedimento<sup>(11)</sup>. A utilização de um sistema de administração por via transdérmica, menos invasivo, permitiria melhorar as condições do próprio estudo, reduzindo o trauma associado à microdiálise.

O objectivo do presente trabalho é pois o de iniciar o estudo da utilização do L-NAME por via transdérmica, em voluntários saudáveis, para avaliar o seu impacto global e o interesse desta estratégia para a análise da

## Introduction

The diagnosis of vascular pathology, its mechanisms and mediators involved, greatly benefited from thermal hyperemia studies after local cutaneous heating<sup>(1-5)</sup>. These studies have also been important to the development of dynamical, non invasive approaches which are specially relevant in current situations, such as the follow-up of diabetes microcirculatory lesions<sup>(1,2,6)</sup>, or for the diagnosis of Peripheral Arterial Obstructive Disease (PAOD)<sup>(4)</sup> or Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome (POTS)<sup>(5)</sup>.

Physiologically, the blood flow modifications induced by external heating in non glabrous skin seem to be mediated by neurogenic reflexes, including the local production of Nitric Oxide (NO)<sup>(7)</sup>. Other local mediators might be involved, but the numerous studies developed under this scope failed to identify them<sup>(7-12)</sup>. At 42°C, those mechanisms induce a biphasic response that produces a fast increase in skin vascular flow in the first 3 to 5 minutes, due to the activation of vanilloid type I receptors, followed by an antidromic release of a vasodilator neurotransmitter<sup>(7)</sup>. After the initial response there is a slow decrease (nadir) and a slow rise stabilizing in a plateau that occurs 20 to 30 minutes after the heating started<sup>(8,10,13)</sup>. This phase seems to be associated to the release of local mediators, specially NO<sup>(7,8,14-20)</sup>. When higher temperatures are applied, namely when the heating reaches 44°C, a different response is obtained. In this case, the curve will directly reach the plateau without the initial peak and nadir<sup>(21)</sup>.

The study of these cellular mechanisms has frequently involved inhibitors of NO sintetase, in particular Nω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), an arginine analogous that act as a reversible and unspecific inhibitor of the enzyme, reducing NO production<sup>(22)</sup>. The administration of these molecules is usually done by microdialysis<sup>(7-12)</sup> perfusion, an invasive and painful technique that interferes with the final result since it induces a certain degree of trauma that needs to be controlled by local anesthetics. Moreover it also determines a vasodilator effect<sup>(11)</sup>. The use of a less invasive administration strategy, such as transdermal administration, could improve the study conditions since it would reduce the trauma associated to microdialysis.

The objective of the present work is, therefore, to confirm the applicability of transdermal administration of L-NAME in healthy volunteers, in order to evaluate the global impact and the interest of this strategy for the analysis of the human microcirculatory function in vivo.

função microcirculatória in vivo.

## Material e Métodos

Após um questionário clínico detalhado seleccionaram-se 5 voluntários (2 homens e 3 mulheres, média de idades: 23.2 + 5.2 anos) não fumadores, normotensos, não sujeitos a medicação vasoactiva e sem patologias vasculares conhecidas, que deram o seu consentimento informado no decorrer de todo o projecto. Todos os procedimentos utilizados tiveram em conta a Declaração de Helsínquia<sup>(23)</sup> e emendas subsequentes, tendo sido previamente avaliado pela comissão científica interna institucional. Em cada voluntário foram definidas 3 zonas de avaliação no antebraço. Foram aplicados durante 2 horas, de acordo com o esquema de aleatorização, três pensos oclusivos (Finn Chamber Large de 18mm, Epitest Ltd, Finlândia) contendo 40µl de uma das seguintes soluções: Solução 1: Solução aquosa de L-NAME com 10 mM; Solução 2: Solução aquosa de L-NAME com 100 mM; Solução 3: Água destilada. As soluções foram preparadas a partir de uma solução mãe de L-NAME (Sigma, N5751), de acordo com as características químicas da molécula listadas na Tabela I.

## Material an Methods

5 healthy volunteers were selected (2 male, 3 female, mean age: 23.2 + 5.2 years old) following clinical evaluation, being non smokers, with normal blood pressure, taking no vasoactive medications and without any known pathology, giving their informed written consent. All procedures were in compliance with the Helsinki Declaration<sup>(23)</sup> and its subsequent amendments, and were previously supervised by the internal scientific committee.

In each volunteer 3 evaluation sites in the forearm were marked. Three occlusive systems (Finn Chamber Large de 18mm, Epitest Ltd, Finland) were applied during 2 hours, according to a randomization procedure, containing 40µl of one of the solutions: Solution 1: Aqueous solution of L-NAME (10 mM); Solution 2: Aqueous solution of L-NAME (100 mM); Solution 3: Distilled water. These solutions were prepared from a first solution of L-NAME (Sigma, N5751), according with the chemical characteristics of the molecule listed in Table I.

**Tabela 1-** Características químicas do L-NAME  
**Table 1-** L-NAME Chemical Characteristics

|   | <b>L - NAME</b>  |
|---|--|
| <b>Peso molecular</b><br><i>Molecular weight</i>      | 269,69 g   |
| <b>Solubilidade</b><br><i>Solubility</i>              | 50 mg/mL   |
| <b>Fórmula química</b><br><i>Chemical formula</i>     | C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> |
| <b>Estrutura química</b><br><i>Chemical structure</i> |  |

Após as 2 horas de oclusão, removeu-se o sistema oclusivo e registam-se os valores basais de perfusão por Fluoxometria de Laser Doppler (LDF, Periflux PF5010, Perimed Suécia), durante 5 minutos. Seguiu-se o aquecimento local da pele a 42°C, durante 20 minutos. O sistema de aquecimento encontrava-se incorporado no sistema de medição de LDF (PF5020, Perimed, Suécia). Todos os voluntários sofreram um período de aclimação prévio de 15 minutos em sala com temperatura e humidade relativa controladas antes da remoção da oclusão, de acordo com os procedimentos padrão de registo do fluxo de sangue por LDF<sup>(24)</sup>.

Para análise dos dados e efeitos de comparação definiram-se quatro momentos de avaliação:

- média dos valores de perfusão dos últimos 3 minutos antes de iniciar o aquecimento (**Basal**),
- média dos valores de perfusão na zona correspondente ao pico, 2.5 a 3.5 minutos após início o aquecimento (**Pico**),
- média dos valores de perfusão na zona correspondente ao vale, 4.5 a 5.5 minutos após aquecimento (**Vale**),
- médias dos valores de perfusão dos dois últimos minutos de aquecimento (**Final**).

A análise estatística envolveu a análise descritiva dos dados (média  $\pm$  desvio padrão) e a análise comparativa, utilizando testes não paramétricos para amostras emparelhadas (wilcoxon signed rank test), utilizando os programas SPSS versão 16.0 e MsExcel 2007. O nível de confiança adoptado foi de 95%.

## Resultados

A figura 1 ilustra a resposta obtida durante o aquecimento local da pele nos 5 voluntários. Esta figura apresenta um perfil de resposta bifásica típica, com valores basais equivalentes nas várias aplicações, seguindo-se uma subida rápida derivada do início do aquecimento a 42°C, ocorrendo um pico aos  $8.2 \pm 0.16$  min, uma ligeira descida, que ocorre aos  $9.78 \pm 0.64$  min e uma nova subida que estabiliza num platô (Figura 1).

Os resultados da figura mostram também o perfil de resposta dos 5 voluntários às várias soluções administradas. Verifica-se uma semelhança nos perfis de aquecimento após a administração da Solução 3 (água destilada) e da Solução 1 (L-NAME 10 mM). A resposta ao aquecimento após a aplicação da Solução 2 (L-NAME 100 mM) apresenta um perfil mais reduzido, mostrando um efeito de inibição.

After 2 hours of occlusion, the patches were removed and basal values of blood flow were recorded by Laser Doppler Flowmetry (LDF, Periflux PF5010, Perimed Sweden), during 5 minutes. A local skin heating at 42°C was then initiated during 20 minutes. The heating system was part of the measuring LDF system (PF5020, Perimed, Sweden). All volunteers experienced a previous 15 minutes acclimatization period in a temperature and relative humidity controlled room, according to the standard procedures for measuring blood flow by LDF<sup>(24)</sup>.

For data analysis and comparison purposes 4 evaluation periods were defined:

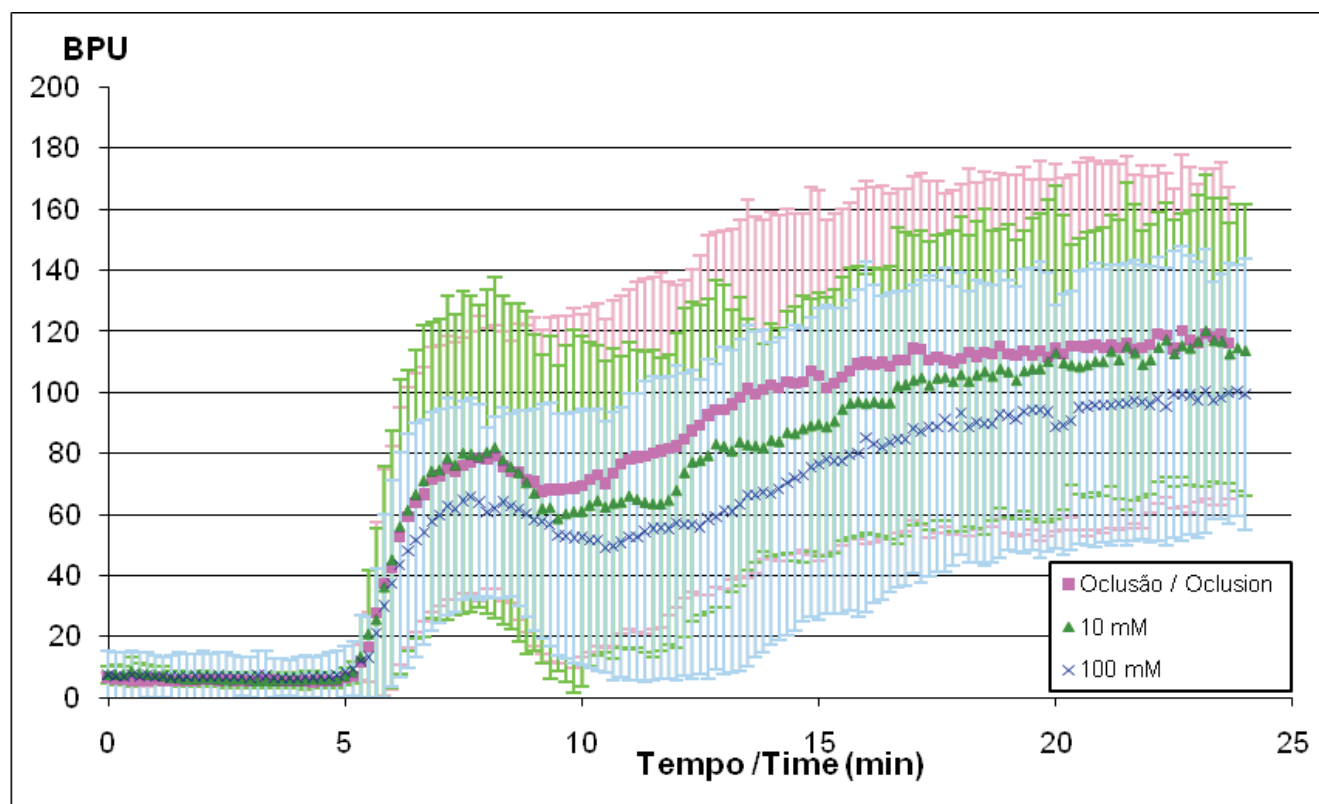
- mean values of blood flow during the last 3 minutes before heating started (**Basal**);
- mean values of blood flow during 2.5 and 3.5 minutes after the heating procedure (**Peak**);
- mean values of blood flow during 4.5 and 5.5 minutes after the heating procedure (**Nadir**);
- mean values of blood flow on the two last minutes of heating (**Final**).

Statistical analysis involved descriptive statistics (mean + sd) and comparison analysis, using non parametric tests for paired samples (Wilcoxon Signed Rank Test). All the statistics were performed using SPSS 16.0 and MS Excel 2007. A confidence level of 95% was adopted.

## Results

Figure 1 show the response obtained during skin local heating in all volunteers. Here the typical biphasic response is shown. From similar basal values a fast increase due to heating the skin at 42°C follows with a peak occurring at  $8.2 \pm 0.16$  minutes. Then there is a slight nadir occurring at  $9.78 \pm 0.64$  minutes and a new rise that stabilizes in a plateau (Figure 1).

The results also show the curves evolution for the several applications in all volunteers. There is a similarity between the heating response profiles following the administration of Solution 3 (distilled water) and Solution 1 (L-NAME 10 mM). Following the application of Solution 2 (L-NAME 100mM) there is a reduction in the curve values, meaning an inhibition effect.



**Figura 1-** Gráfico da evolução média ( $\pm$  desvio padrão) de valores de perfusão (BPU's) obtidos em 5 voluntários, durante as experiências de aquecimento local realizadas com L-NAME.

**Figure 1-** Graphic of the mean evolution ( $\pm$  sd ) of blood flow (BPU's) obtained in 5 volunteers during the local heating experiments performed with L-NAME

## Discussão

O recurso aos inibidores da NO sintetase, nomeadamente o L-NAME, um inibidor inespecífico da NO sintetase, para estudar a acção do NO na resposta da pele ao aquecimento local, é frequente, especialmente em técnicas de administração por microdialise<sup>(7-12)</sup>. No entanto, e apesar das dificuldades implicadas, não têm sido identificadas outras técnicas de aplicação destes inibidores, mais simples e cómodas, utilizando por exemplo a via transcutânea.

O protocolo desenvolvido visou a comparação da resposta da pele após a administração de L-NAME a 10mM e 100mM por via transdérmica. A dose de 10mM é uma dose padrão nos estudos com microdialise<sup>(19)</sup>, existindo mesmo alguns autores que demonstraram que doses de 5mM, 10mM ou 20mM apresentavam o mesmo grau de inibição<sup>(25)</sup>. Por outro lado sabe-se que a pele é uma barreira à administração de substâncias, o que justifica um aumento da dose administrada de L-NAME para 100 mM.

Alguns autores demonstraram também que uma parte da resposta inicial ao aquecimento local da pele está

## Discussion

The use of NO sintetase inhibitors, in particular the unspecific inhibitor of NO sintetase L-NAME, is common, specially to study the skin's response to local heating by microdialysis<sup>(7-12)</sup>. Despite all of the technical constraints involved, no other simple or comfortable techniques were made available using, for instance, the transcutaneous administration route.

The present study compared the skin's response to the transdermal administration of L-NAME in different concentrations (10 and 100 mM). 10 mM is the standard dosis used in microdialysis studies<sup>(19)</sup>, but several authors suggested that the 5, 10 and 20 mM implied the same degree of inhibition<sup>(25)</sup>. On the other end it is known that the skin is a very effective barrier to the penetration of substances, which justified the increase of the L-NAME dose to 100 mM.

Some authors have also demonstrated that the initial part of the response to skin's local heating depends from the cell's intrinsic NO and that the second part of the biphasic response depends from the generation of new NO by the NO sintetase enzyme<sup>(20)</sup>. The administration

dependente da existência de NO intrínseco na célula e que a segunda parte da resposta bifásica depende da geração de novo NO por parte da NO sintetase<sup>(20)</sup>. Ao administrar um inibidor da enzima diminui-se a presença de NO intrínseco e a capacidade de gerar novo NO.

A figura 1 permite verificar que a administração da Solução 2 (L-NAME 100 mM) desencadeia uma inibição de toda a curva de resposta à temperatura, o que está de acordo com estes resultados prévios e permite garantir que o L-NAME foi absorvido por via transdérmica actuando no endotélio dos vasos. Esta inibição ocorre ao longo de todo o aquecimento o que parece significar que o tempo de oclusão escolhido é suficiente para desencadear a redução do NO constitutivo inicial, gerando assim uma diminuição da fase inicial da curva. A administração da Solução 1 não desencadeou esta inibição, sendo o perfil semelhante ao do controlo com água destilada, sugerindo que a dose que chega ao vaso não é suficiente para inibir a enzima, não alterando a resposta da célula.

Estes resultados sugerem que a via transdérmica pode ser utilizada para a administração de L-NAME, constituindo-se como uma interessante alternativa para este efeito, á microdiálise.

### Conclusões

O estudo demonstrou que uma dose de 10mM de L-NAME administrada por via transdérmica não é suficiente para inibir a enzima responsável pela formação de NO no vaso sanguíneo, enquanto uma dose de 100 mM já permite esta inibição. Os protocolos subsequentes de administração de L-NAME por via transdérmica deverão por isso considerar este aspecto de forma a garantir uma inibição adequada que permita o estudo dos mecanismos relacionados.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os voluntários que cooperaram no desenvolvimento do estudo.

### Referências / References

- [1]. Rossi M.; Carpi, A.; Galetta, F.; Franzoni, F.; Santoro, G.; The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases; *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2006, 60:437–442.
- [2]. Nazarro, P.; Vulpis, V.; Schirosi, G.; Serio, G.; Battista, L.; Lucivero, V.; Livrea, P.; Federico, F.; Microvascular impairment is associated with insulin resistance in euglycemic mild hypertensives; *Am J Hypertens*; 2008, 21(4):432-7.
- [3]. Rossi, M.; Carpi, A.; Galetta, F.; Franzoni, F.; Santoro, G.; Skin vasomotion investigation: A useful tool for clinical evaluation of microvascular endothelial function?; *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 2008, 62: 541-545.
- [4]. Rossi, M; Carpi, A.; Skin microcirculation in peripheral arterial obliterative disease; *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 2004, 58: 427–431

of an enzyme inhibitor will reduce both the presence of intrinsic NO and the capacity to generate new NO.

Figure 1 allows us to verify that the administration of Solution 2 (L-NAME 100 mM) induces the inhibition of the response curve, which is consistent with previous observations and proves that L-NAME reached the vessel endothelium by the transdermal route. This inhibition, which occurs throughout the heating, seems to demonstrate that the chosen occlusion time is sufficient to reduce the initial intrinsic NO, reducing the initial part of the curve. The administration of Solution 1 did not start this inhibition, and the curve profile was similar to that obtained with the distilled water control, suggesting that the dose reaching the blood vessels was incapable to inhibit the enzyme and therefore did not induce any modification in the cell response.

Results indicate that the transdermal route can be used as an administration technique of L-NAME, meaning a potentially interesting alternative to microdialysis.

### Conclusion

The study shows that the transdermal application of a 10 mM dosis of L-NAME is not sufficient to inhibit the NO formation enzyme in the blood vessels. However the 100 mM dosis induces the expected response. Further development of L-NAME transdermal administration related protocols shall, therefore, consider this concentration to guarantee an adequate inhibition to study the involved mechanisms.

### Acknowledgments

The authors wish to thanks to volunteers and all cooperating to the study's development.

- [5]. Medow, M.S.; Minson, C.T.; Stewart, J.M.; Decreased Microvascular Nitric Oxide–Dependent Vasodilation in Postural Tachycardia Syndrome; *Circulation*; 2005, 112:2611–2618.
- [6]. Vinik, A.I.; Erbas, T.; Park, T.S.; Pierce, K.K.; Stansberry, K.B.; Methods for Evaluation of Peripheral Neurovascular Dysfunction; *Diabetes Technology & Therapeutics*; 2001, 3(1):29–50.
- [7]. Kellogg, D. L. Jr.; In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges; *J Appl Physiol*; 2006, 100: 1709–1718.
- [8]. Kellogg, D.L. Jr; Liu, Y.; Kosiba, I. F.; O'Donnell, D.; Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans; *J Appl Physiol*; 1999, 86:1185–1190.
- [9]. Pergola P.E.; Kellogg, D.L. Jr; Kosiba, W.A.; Solomon, D.E.; Role of sympathetic nerves in the vascular effects of local temperature in human forearm skin; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 1993, 265: H785–H792.
- [10]. Minson, C.T.; Berry L. T.; Joyner, M. J.; Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating; *J Appl Physiol*; 2001, 91: 1619–1626.
- [11]. Gooding, K.M.; Hannemann, M.M.; Tooke, J.E.; Clough, G.F.; Shore, A.C.; Maximum Skin Hyperaemia Induced by Local Heating: Possible Mechanisms; *J Vasc Res.*; 2006, 43:270–277.
- [12]. Wilkins, B.W.; Holowatz, L.A.; Wong, B.J.; Minson, C.T.; Nitric oxide is not permissive for cutaneous active vasodilatation in humans; *J Physiol.*; 2003, 548.3 963–969.
- [13]. Golay, S.; Haeberli, C.; Delachaux, A.; Liaudet, L.; Kucera, P.; Waeber, B.; Feihl, F.; Local heating of human skin causes hyperemia without mediation by muscarinic cholinergic receptors or prostanoids; *J Appl Physiol*; 2004, 97: 1781–1786
- [14]. Kellogg, D. L. Jr.; Zhao, J. L.; Wu, Y.; Endothelial nitric oxide synthase control mechanisms in the cutaneous vasculature of humans in vivo; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 2008, 295: H123–H129.
- [15]. Kellogg, D.L.Jr.; Crandall, C.G.; Liu, Y.; Charkoudian, N.; Johnson, J.M.; Nitric oxide and cutaneous active vasodilation during heat stress in humans; *J. Appl. Physiol.*; 1998, 85: 824–829.
- [16]. Shastry, S.; Minson, C.T.; Wilson, S.A.; Dietz, N.M.; Joyner, M.J.; Effects of atropine and L-NAME on cutaneous blood flow during body heating in humans; *J. Appl. Physiol.*; 2000, 88: 467–472.
- [17]. Lenasi, H.; Strucl, M.; The effect of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition on cutaneous microvascular reactivity; *Eur J Appl Physiol*; 2008, 103(6):719–26.
- [18]. Charkoudian N.; Skin Blood Flow in Adult Human Thermoregulation: How It Works, When It Does Not, and Why.; *Mayo Clin Proc.*; 2003, 78:603–612.
- [19]. Hodges, G.J.; Kosiba, W.A.; Zhao, K.; Johnson, J.M.; The involvement of norepinephrine, neuropeptide Y, and nitric oxide in the cutaneous vasodilator response to local heating in humans; *J Appl Physiol.*; 2008, 105: 233–240.
- [20]. Houghton, B.L.; Meendering, J.R.; Wong, B.J.; Minson, C.T.; Nitric oxide and noradrenaline contribute to the temperature threshold of the axon reflex response to gradual local heating in human skin; *J Physiol.*; 2006, 572.3 811–820.
- [21]. Rodrigues, L.M.; Pinto, P.C.; Moniz, S.J.; Assessment of the effect of temperature on the dynamics of cutaneous microcirculatory response; *Rev Lus C&T Saude*; 2008, 5:61–67.
- [22]. Khavandgar, S.; Homayoun, H.; Dehpour, A.R.; Mediation of nitric oxide in inhibitory effect of morphine against electroshock-induced convulsions in mice; *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; 2003; 74(4), 795–801.
- [23]. Goodyear, M.D.; Krleza-Jeric, K.; Lemmens, T.; The Declaration of Helsinki; *BMJ*; 2007, 29: 33.
- [24]. Serup, J., Cutaneous Blood Flow and Erythema: Standardization of measurements, in *Bioengineering of the skin: Cutaneous Blood Flow and Erythema*, Berardesca, E., Elsner, P, Maibach H., editors, CRC Press, 1995, 57–63
- [25]. Klede, M.; Clough, G.; Lischetzki, G.; Schmelz, M.; The Effect of the Nitric Oxide Synthase Inhibitor N-Nitro-L-Arginine-Methyl Ester on Neuropeptide-Induced Vasodilation and Protein Extravasation in Human Skin; *Journal of Vascular Research*; 2003, 40:105–114.