

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

93

FACULTAD DE MEDICINA

Papel del endotelio en la regulación de la
contractilidad del músculo liso
vascular

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
EN EL AREA DE FISILOGIA
P R E S E N T A:

MARIA CRISTINA PAREDES CARBAJAL

Director de Tesis:

DR. DIETER MASCHER GRAMLICH

México, D. F.
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi hija Andrea
Por la alegría de tenerla.

A Jorge
Por su comprensión y paciencia.

A Armando
Porque su recuerdo me acompaña siempre.

A mis padres y hermanos
Por el cariño y el apoyo que siempre me han brindado.

Al Dr. Dieter Mascher G.
Por su calidad humana e integridad como científico.

A Sonia, Selva, Tere y Marco
Por su amistad incondicional en los momentos más difíciles.

Agradecimientos

Al Dr. Dieter Mascher G. Por su asesoría académica en la realización de esta tesis y su siempre buena disposición para la revisión y corrección de la misma.

Al Sr. Manuel Sánchez N., Sra. Lidia Morales M. y Sra. Martha Cerrilla A. Por su ayuda técnica en la realización de esta tesis.

A todos los compañeros del Departamento de Fisiología que, de una forma u otra, me apoyaron en este período de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me fue brindado durante mis estudios de doctorado.

Por las valiosas sugerencias aportadas a esta tesis, agradezco a:

Dr. Horacio Vidrio L.
Dr. David E. García D.
Dr. Fermín Valenzuela G.
Dr. Miguel Luján E.
Dr. Marco A. Juárez O.
Dra. Rosalinda Guevara G.

ÍNDICE.

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
I.- INTRODUCCIÓN	1
A.- ANTECEDENTES	1
1.- El descubrimiento de la relajación dependiente del endotelio inducida por la acetilcolina.	1
2.- Papel del GMP cíclico en la relajación dependiente del endotelio.	5
3.- Papel del Ca^{2+} en la liberación del FRDE	6
4.- Papel del intercambio Na^+/Ca^{2+}	7
5.- Identificación del FRDE como óxido nítrico (NO)	7
6.- Mecanismos celulares que controlan la formación del NO en las células endoteliales.	8
7.- Incrementos en la concentración intracelular de calcio en las células endoteliales inducida por agonistas.	10
a.- Liberación del calcio desde los depósitos intracelulares. Papel de los segundos mensajeros.	11
b.- Papel de las corrientes iónicas en la estimulación de la biosíntesis del FRDE/óxido nítrico.	12
8.- La participación de factores hormonales en la modulación del tono vascular dependiente del endotelio.	25
B.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	28
1.- Análisis experimental del papel del Ca^{2+} en las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio.	28
2.- Análisis de la participación de factores hormonales en la modulación del tono vascular dependiente del endotelio.	31
C.- OBJETIVOS	33
II.- MATERIAL Y MÉTODOS.	35
1.- Preparación biológica	35
2.- Sistema de perfusión y control de la temperatura.	36
3.- Soluciones	36
4.- Sistema de registro	37
5.- Análisis de resultados	37
III.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL	39
IV.- RESULTADOS	47
A.- Parte I	
Caracterización de las respuestas vasomotoras inducidas por diversos agonistas.	47
1.- Efectos de la noradrenalina	47
2.- Efectos de la fenilefrina	47
3.- Efectos del carbacol	50
4.- Efectos de la histamina y del ATP	54
5.- Efectos del nitroprusiato de sodio	56
6.- Efectos de la hemoglobina	56

7.- Efectos del azul de metileno.	57
B.- Parte II	
Análisis experimental del papel del Ca^{2+} en las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio.	59
1.- Análisis del posible origen del Ca^{2+} en las contracturas inducidas por fenilefrina.	59
a).- Papel del influjo de Ca^{2+}	59
i).- Efectos de la modificación de la concentración extracelular de Ca^{2+}	59
ii).- Efectos del bloqueo de los canales de Ca^{2+}	59
*).- Efectos del Co^{2+}	61
**).- Efectos del Ni^{2+}	61
b).- Papel de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares	61
i).- Efectos de la neomicina:	63
ii).- Efectos de la procaína	63
iii).- Efectos de la aplicación simultánea de neomicina y procaína	66
2.- Análisis de las relajaciones dependientes del endotelio mediadas por los receptores a diversos agonistas.	66
a).- Papel del Inlujo de Ca^{2+}	66
i).- Efectos de la modificación en la concentración extracelular de Ca^{2+}	66
ii).- Efectos del bloqueo de los canales de Ca^{2+}	69
*) - Efectos del Co^{2+}	69
**).- Efectos del Ni^{2+}	73
b).- Papel de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares	73
i).- Efectos de la neomicina	73
ii).- Efectos de la procaína:	78
C).- Parte III	88
Análisis de la participación de factores hormonales en la modulación del tono vascular dependiente del endotelio.	88
1.- Análisis de los efectos de la exposición crónica a los estrógenos sobre las respuestas contráctiles inducidas por la fenilefrina y al carbacol.	88
A).- Curva dosis respuesta la fenilefrina	88
a).- Anillos con endotelio	88
b).- Anillos sin endotelio	92
B).- Curva dosis-respuesta al carbacol.	92
- Análisis de los efectos de la exposición aguda a los estrógenos sobre las respuestas contráctiles inducidas por la fenilefrina y el carbacol	95
a).- Curvas dosis respuesta a la fenilefrina.	95
b).- Curva dosis-respuesta al carbacol.	98
IV.- DISCUSIÓN.	101
V.- REFERENCIAS.	123

RESUMEN

En el presente estudio se analizaron dos problemas: I. El papel de los diferentes mecanismos que pueden producir, en las células endoteliales, un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, de esta manera, activar la sintasa del óxido nítrico; II.- Los efectos de los estrógenos en la modulación del tono vascular.

I.- Los agonistas que inducen, en las células endoteliales, la síntesis y la liberación de óxido nítrico (NO) producen, en dichas células, un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. Esta parte del estudio tuvo como objetivo analizar el papel de los diferentes mecanismos que pueden producir un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en la activación de la síntesis y la liberación del NO. Para ello se utilizó como modelo para evaluar la liberación del NO el efecto relajante del carbacol (10^{-5} M) en anillos de aorta de rata, con endotelio íntegro, precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M), el cual, contrastado con la respuesta al carbacol de anillos sin endotelio, es un indicador fisiológico confiable de la liberación del NO. En este modelo se analizaron los efectos de algunos bloqueadores del flujo transmembranal de Ca^{2+} y de algunas sustancias que inhiben la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares. En los experimentos con bloqueadores de canales de Ca^{2+} se obtuvieron los siguientes resultados: 1) ni el Ni^{2+} (180 μ M -5 mM) ni el Co^{2+} (3 mM), previnieron el efecto relajante del carbacol; 2) el Co^{2+} revirtió la relajación inducida por el carbacol, mientras que el Ni^{2+} no la revirtió. 3) en las preparaciones que habían sido expuestas al Co^{2+} o al Ni^{2+} se observó, durante las exposiciones subsiguientes al carbacol, una disminución marcada y duradera del efecto relajante de dicho agonista. Con las sustancias que inhiben la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, se obtuvieron los siguientes resultados: 1) la procaína (1 mM) previno o revirtió la relajación inducida por el carbacol, redujo significativamente la magnitud de la relajación inducida por la histamina y ralentizó la relajación inducida por el ATP; 2) la neomicina (5 mM), no incrementó la tensión basal y, tampoco, previno o revirtió la relajación inducida por el carbacol, la histamina o el ATP. Estos resultados sugieren que el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, inducido por el carbacol, la histamina o el ATP, se origina por la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, y que el flujo a través de la membrana plasmática es indispensable para volver a llenar los depósitos. Los resultados sugieren, también, que en la relajación inducida por el carbacol predomina la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

II.- Los efectos del tratamiento estrogénico crónico o agudo sobre las respuestas vasomotoras a la fenilefrina y al carbacol se analizaron en anillos aórticos, con y sin endotelio, provenientes de ratas ovariectomizadas. El tratamiento estrogénico crónico consistió en la administración subcutánea de una dosis única (1 μ mol) de estearato de estradiol. Para estudiar los efectos del tratamiento estrogénico agudo se registraron las respuestas, a la fenilefrina y al carbacol, de los anillos aórticos provenientes de ratas ovariectomizadas no tratadas, antes y después, de la adición de 17β -estradiol a las soluciones de perfusión. Para identificar las respuestas dependientes del endotelio cada experimento fue realizado simultáneamente en un par de anillos provenientes del mismo vaso, uno con endotelio y el otro sin endotelio funcional. Las respuestas contráctiles a la fenilefrina de los vasos con endotelio íntegro fueron atenuadas por el tratamiento estrogénico crónico, dicha atenuación fue mayor en presencia de indometacina y fue revertida por la aplicación del metil ester de la NO -nitro-L-arginina. Tanto el tratamiento estrogénico crónico como el agudo incrementaron la relajación dependiente del endotelio inducida por el carbacol en los anillos precontraídos con fenilefrina provenientes de ratas ovariectomizadas no tratadas. Los resultados sugieren que los estrógenos incrementan, en el endotelio de la aorta de la rata, la liberación basal tanto de óxido nítrico, como de un prostanoide vasoconstrictor e incrementan la liberación de NO mediada por receptor.

SUMMARY

Two problems were analyzed in this study: I.- The role of the several mechanisms that may increase $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells during agonist induced endothelial-dependent relaxation of vascular smooth muscle. II.- The effects of estrogens in the modulation of vascular tone.

I.- Agonists inducing the synthesis and release of NO in endothelial cells, produce, in these cells, also an increase in $[Ca^{2+}]_i$. The purpose of this part of the study was to analyze the role of the several mechanisms which may increase endothelial $[Ca^{2+}]_i$ during agonist-induced endothelium-dependent relaxation. Carbachol-induced relaxation of phenylephrine (10^{-5} M) precontracted aortic rings having a functional endothelium was used to evaluate NO release. In this model, the effects of some Ca^{2+} channel blockers and of some inhibitors of the release of intracellular stored Ca^{2+} were studied. Ca^{2+} channel blockers produced the following effects: 1).- Neither Ni^{2+} (180 μ M - 5mM) nor Co^{2+} (3mM) prevented the relaxant effect of carbachol; 2).- Co^{2+} reverted the relaxation induced by carbachol, while Ni^{2+} did not. 3).- Rings previously subjected to either Co^{2+} or Ni^{2+} showed a marked and prolonged decrease in response to subsequent challenges with carbachol. Inhibition of the release of intracellular stored Ca^{2+} , produced the following effects: 1).- Procaine (1 mM) prevented or reverted the carbachol-induced relaxation, decreased the magnitude of the histamine-induced relaxation and slowed the ATP-induced relaxation. 2.- Neomycin (5 mM) neither increased the basal tension nor prevented or reverted the carbachol-, histamine- or ATP-induced relaxations. These results suggest that the increase in endothelial $[Ca^{2+}]_i$ induced by either carbachol, histamine or ATP is caused by Ca^{2+} released from intracellular stores, the carbachol-induced relaxation being predominantly caused by Ca^{2+} induced Ca^{2+} release. The results suggest further, that Ca^{2+} influx across the sarcolemma is essential for replenishing intracellular stores after Ca^{2+} has been released.

The effects of either chronic or acute estrogenic treatment on the "in vitro" vasomotor responses to phenylephrine (10^{-9} - 10^{-5} M) and to carbachol (10^{-9} - 10^{-5} M) of aortic rings excised from ovariectomized rats were analyzed. Chronic estrogenic treatment consisted in a single subcutaneous dose of 1 μ mol estradiol 17-stearate. Effects of acute estrogenic treatment were evaluated by recording the responses of aortic rings excised from untreated ovariectomized rats both before and after the addition of 17β -estradiol to the superfusing solutions. In order to identify the endothelium-dependent responses each experiment was performed simultaneously on pairs of rings from the same aorta, one with and the other without functional endothelium. The contractile responses to phenylephrine of endothelium-intact vessels were attenuated by chronic estrogenic treatment; this attenuation was further increased by preincubation of the vessels with indomethacin and was reverted by N ω -nitro-L-arginine methyl ester. Either chronic or acute estrogenic treatment enhanced the carbachol-induced endothelium dependent relaxation of phenylephrine-precontracted rings. The results may be explained by assuming that estrogens increase the basal release of both nitric oxide and a cyclooxygenase-dependent vasoconstricting prostanoid as well as the receptor-mediated release of nitric oxide from the endothelium of the rat aorta.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

1.- EL DESCUBRIMIENTO DE LA RELAJACIÓN DEPENDIENTE DEL ENDOTELIO INDUCIDA POR LA ACETILCOLINA.

La capacidad de la acetilcolina y otros agonistas muscarínicos de producir vasodilatación en diferentes lechos vasculares *in vivo*, se conoce desde hace muchos años. Por esta razón se esperaba que los agonistas muscarínicos produjeran relajación de las contracciones espontáneas o inducidas por fármacos en preparaciones aisladas de vasos sanguíneos; sin embargo, tal relajación sólo había sido observada en una minoría de preparaciones probadas *in vitro*. Entre las preparaciones que no presentaban relajación, se encontraban las tiras helicoidales de aorta torácica de conejo, las cuales únicamente presentaban contracción dependiente de la dosis como respuesta a la acetilcolina o al carbacol, independientemente de si se encontraba en estado de reposo o si había sido contraída con algún agonista (Furchgott y col., 1953; Furchgott, 1955). La máxima magnitud de la contracción inducida por la acetilcolina variaba considerablemente, entre el 10 y el 50% de la máxima magnitud observada con la epinefrina (Furchgott y col., 1953).

Cabe hacer notar que las tiras helicoidales fueron desarrolladas originalmente para ser utilizadas con el dispositivo de registro de esa época, es decir, la palanca isotónica que permitía el registro de la actividad mecánica en quimógrafo. Después del reemplazo de la palanca y el quimógrafo, por los transductores de fuerza y el osciloscopio las tiras helicoidales aún fueron usadas por muchos años. En 1976 en el laboratorio de Furchgott se empezaron a usar los anillos de aorta en lugar de las tiras helicoidales para realizar estudios sobre receptores, ya que los anillos eran preparaciones fáciles de obtener y de montar en el dispositivo de registro. En 1978, durante un experimento diseñado para comparar la potencia de diferentes catecolaminas para activar los receptores beta adrenérgicos de la aorta del conejo, accidentalmente, se aplicó carbacol a un

anillo que ya había sido contraído con norepinefrina y el anillo sufrió una parcial relajación. Puesto que ésta era una respuesta completamente inesperada para los anillos de aorta de conejo, todos los anillos de ese experimento fueron expuestos al carbacol o a la acetilcolina, y todos presentaron una relajación parcial.

Rápidamente se llevaron a cabo experimentos adicionales para comparar las respuestas de las tiras helicoidales y los anillos de la misma aorta a esos agentes. Las tiras, presentaban únicamente la contracción esperada, mientras que los anillos presentaban relajación.

Después de la observación inicial de la relajación inducida por el carbacol o la acetilcolina en anillos de aorta de conejo, diferentes tipos de experimentos indicaron pronto, que las preparaciones aórticas perdían la capacidad de relajarse en respuesta a estos agentes si el endotelio de la preparación había sido frotado excesivamente contra una superficie extraña o, contra sí mismo durante su obtención (Furchgott y col. 1980a; Furchgott, 1982). Una vez establecida la relación entre la pérdida de la capacidad de relajación y la fricción del endotelio, llegó a ser común observar, tanto en los anillos como en las tiras, una relajación del 90 al 100% desde un nivel de tono moderado (comúnmente producido por norepinefrina), cuando eran expuestos a una concentración óptima (usualmente 1 μM) de acetilcolina.

El mecanismo por el cual la fricción de la capa endotelial de una preparación aórtica abolía la capacidad de relajarse en respuesta a la acetilcolina no fue claro inmediatamente. Entre los posibles mecanismos que se consideraron, está el que la fricción eliminaba las células endoteliales y que la presencia de tales células era indispensable para la relajación. Sin embargo, estudios histológicos iniciales de secciones transversales de anillos intactos o que habían sido frotados con alguna superficie, teñidos con hematoxilina, no mostraron un número, significativamente diferente de células endoteliales. Desafortunadamente, estos estudios preliminares estuvieron sujetos a varios errores técnicos, posteriormente, se observó con otra técnica (tinción con nitrato de plata), tanto con el microscopio de luz (Furchgott y col. 1980a) como también por medio de microscopía

electrónica (Furchgott y col. 1981a) que habla una relación directa entre la magnitud de la relajación inducida por la acetilcolina en las preparaciones aórticas y la fracción de células endoteliales presentes en dicha preparación. Otro procedimiento que también abolía la relajación inducida por la acetilcolina era la exposición de la íntima de un segmento de la aorta a la enzima colagenasa (Furchgott y col., 1980a).

La eliminación de las células endoteliales no interfería con la sensibilidad de estas preparaciones a los agentes constrictores (por ejemplo, la norepinefrina), si se tenía el cuidado de no estirar demasiado el tejido muscular liso durante el procedimiento de fricción o de no exponer la preparación demasiado tiempo a la colagenasa. El efecto contráctil de la acetilcolina a concentraciones altas, era mayor después de la eliminación de las células endoteliales, como era de esperarse, puesto que ya no había actividad relajante de esas células que se opusiera al efecto contráctil.

Posteriormente, se encontró que el papel obligatorio de las células endoteliales en la relajación inducida por la acetilcolina, no sólo era aplicable al caso de la aorta de conejo, sino también al caso de otras arterias, incluyendo una variedad de arterias del conejo, del perro, de la rata, del cobayo, y del humano (Furchgott y col., 1980a; Furchgott, 1981b; Cherry y col., 1982).

La acetilcolina era casi igualmente efectiva para relajar las contracciones de anillos aórticos del conejo inducidas por diferentes agentes vasoconstrictores, incluyendo a la norepinefrina, la fenilefrina, la histamina, la serotonina, la angiotensina II, y la prostaglandina $F_{2\alpha}$. Por otra parte, en las contracciones por alto K^+ o por la sustitución de la solución de Krebs ordinaria por una solución de Krebs- K_2SO_4 , la relajación máxima inducida por la acetilcolina siempre fue considerablemente menor (10-50 %), que aquella producida en las contracciones inducidas por la norepinefrina (Furchgott, 1981b).

Furchgott y col., (1980a) propusieron que las células endoteliales estimuladas por la acetilcolina (ACh) liberaban una sustancia que difundía al músculo liso subyacente para provocar una relajación. Esta sustancia fue

llamada Factor Relajante Derivado del Endotelio (FRDE); se descartó que se tratara de la prostaciclina, (prostaglandina vasodilatadora) puesto que la relajación inducida por la acetilcolina no era afectada por la adición de indometacina que previene la síntesis de dicha prostaglandina.

Para probar la hipótesis de la naturaleza humoral de la relajación dependiente del endotelio se desarrolló el siguiente procedimiento: a una tira transversal de aorta, a la cual se le habían eliminado por fricción las células endoteliales, se le registraba la actividad mecánica cuando era montada separadamente, o también cuando se montaba de tal manera que la superficie de su íntima estuviera contra la superficie de la íntima de otra tira aórtica longitudinal con células endoteliales presentes (*montaje en sandwich*). Debido a la orientación de sus células musculares, la tira longitudinal, sólo podía contribuir con cambios triviales a la tensión sobre el transductor de fuerza durante la contracción de la tira transversal. La acetilcolina, que no inhibía las contracciones de la tira transversal montada separadamente, siempre indujo una relajación importante de la misma, cuando era montada junto con la tira longitudinal en la forma arriba descrita (Furchgott y col., 1980a).

Griffith y col. (1984), usando la técnica de bioensayo de perfusión en cascada, en la cual era posible variar el tiempo de tránsito de la solución entre las células endoteliales y la arteria del bioensayo, estimó la vida media del FRDE liberado por la acetilcolina en la aorta de conejo, en 6.3 ± 0.6 seg. Valores similares también fueron reportados por Cocks y col., (1985) para el FRDE liberado por la bradicinina en células endoteliales cultivadas de aorta de bovino, y por Rubanyi y col., (1985) para el FRDE liberado por la acetilcolina en el endotelio de la arteria femoral canina. Furchgott y col., (1986) encontraron que la vida media del FRDE de aorta de conejo era de 10.16 ± 1.6 seg. Por otro lado, Forstermann y col., (1984) estimaron una vida media más larga para el FRDE liberado por la acetilcolina del endotelio de la aorta de conejo (24 ± 3 seg). Ellos atribuyeron la vida media más larga en sus experimentos al hecho de que usaban una concentración menor de O_2 en las soluciones de perfusión.

A la descripción de la relajación dependiente del endotelio inducida por la acetilcolina siguieron, en poco tiempo, reportes sobre relajaciones dependientes del endotelio inducidas por otros agentes tales como el ionóforo de Ca^{2+} A23187, el trifosfato de adenosina (ATP), el difosfato de adenosin (ADP), la histamina, la substancia P, la bradicinina, la trombina, la vasopresina, el polipéptido intestinal vasoactivo, la colecistocinina, la melitina y los ácidos grasos saturados.

En parte, debido a las observaciones con el A23187, Furchgott (1981b), propuso que el incremento de los iones de calcio en cierta región de alguna enzima clave, sensible al Ca^{2+} , podría ser el paso inicial en las reacciones que mediaban la liberación del FRDE. Según la propuesta tal incremento podía generarse por la acción del A23187, actuando como ionóforo, o por la acetilcolina, al abrir canales de Ca^{2+} acoplados al receptor muscarínico en la membrana plasmática. Posteriormente, en otros laboratorios se demostró que se requería la presencia del Ca^{2+} en el medio extracelular para la estimulación de la liberación del FRDE por la acetilcolina y el A23187 (Singer y col., 1982; Griffith y col., 1986). También se encontró que en diversos vasos sanguíneos aislados, las células endoteliales liberaban continuamente, una pequeña cantidad del FRDE, el cual inhibía parcialmente el desarrollo de tensión en respuesta a diversos agentes vasoconstrictores (Lues y col., 1984; Godfraind y col., 1985; Martin y col., 1986; Bullock y col., 1986).

Por otra parte, se observó que la eliminación de las células endoteliales no alteraba la sensibilidad de diversas preparaciones vasculares a una variedad de agentes relajantes tales como la nitroglicerina, el nitroprusiato de sodio, la adenosina, el monofosfato de adenosina, el isoproterenol, la fotorrelajación, el factor natriurético auricular, el factor inhibitorio del músculo retractor del pene y la prostaciclina (Furchgott y col., 1980b; 1984b).

2.- Papel del GMP cíclico en la relajación dependiente del endotelio.

Murad y col., (1979), habían propuesto que los llamados nitrovasodilatadores, tales como el nitroprusiato, los nitratos orgánicos, la azida y los nitritos inorgánicos, activaban a la guanilato ciclasa indirectamente vía la

formación de óxido nítrico. Con base en este antecedente se postuló que el FRDE, al igual que los nitrovasodilatadores, estimulaba a la guanilato ciclasa del músculo liso vascular, causando un incremento en el monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), el cual de alguna manera inducía la relajación (Furchgott y col., 1981b).

La hipótesis, de que el FRDE liberado por la acetilcolina y otros relajantes dependientes del endotelio producía un incremento en el GMPc fue apoyada por los resultados de Rapoport y col. (1983) en la aorta de la rata; de Diamond y col., (1983) y Furchgott y col.,(1984b), en la aorta del conejo; Holzman (1982) en la arteria coronaria de bovino, y de Ignarro y col., (1984) en la arteria pulmonar de bovino. En ninguno de estos estudios sobre la relajación dependiente del endotelio se observó un cambio significativo en el contenido de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc).

Por otro lado, dos grupos de investigadores, en forma independiente, demostraron que el FRDE liberado de las células endoteliales de los vasos sanguíneos podía reaccionar directamente con la guanilato ciclasa citoplásmica y activar la síntesis del GMPc (Forstermann y col., 1986; Ignarro y col., 1986).

La producción de GMP cíclico en anillos de aorta con endotelio no estimulados disminuía, tanto en la ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular (Rapoport y col., 1984; Spedding y col., 1986), como en presencia del calmidazolium (inhibidor de la calmodulina), lo que sugirió que la producción de FRDE en las células endoteliales no estimuladas requería de Ca^{2+} y de calmodulina.

3.- Papel del Ca^{2+} en la liberación del FRDE

Furchgott y col. (1980a), demostraron que la liberación de FRDE era incrementada por el ionóforo del calcio A23187 y atenuada o abolida en soluciones libres de calcio.

Las células endoteliales estimuladas con bradicinina, en ausencia de Ca^{2+} extracelular, liberaban FRDE de manera atenuada y transitoria, indicando que estaba involucrado un factor diferente al Ca^{2+} extracelular el cual posiblemente era

el Ca^{2+} liberado desde depósitos intracelulares. Sin embargo, no ocurría otra liberación del FRDE mientras no se hubiera reincorporado el Ca^{2+} al medio extracelular (Peach y col., 1987). Estos resultados sugerían que el Ca^{2+} intracelular liberado al citosol no podía ser recapturado y que el Ca^{2+} de los depósitos intracelulares debía provenir del medio extracelular.

La presencia obligatoria del Ca^{2+} extracelular para la liberación del FRDE se aplicaba tanto a los agentes vasoactivos cuyos efectos eran mediados por receptor (Ach, ATP, sustancia P, bradicinina, y trombina), como a los que no actuaban a través de receptores (A23187, ácidos grasos saturados y timerosal). Se postuló que el Ca^{2+} funcionaba como un segundo mensajero en el acoplamiento entre la estimulación endotelial y la secreción del FRDE y la de PGI_2 (Peach y col., 1987).

4.- Papel del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Los reportes acerca de la participación del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ han sido contradictorios. Winquist y col. (1985) observaron que el análogo de la amilorida (inhibidor del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, entre otras propiedades), el diclorobenzamil, bloqueaba selectivamente la relajación inducida por el A23187 en la aorta de rata, mientras que Cocks y col (1988), también utilizando los análogos de la amilorida sugirieron que el bloqueo del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ estimulaba la liberación del FRDE. Los efectos farmacológicos de la amilorida y sus análogos, distintos a la inhibición del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, podrían explicar la diversidad de efectos sobre las relajaciones inducidas por agonistas dependientes del endotelio.

5.- Identificación del FRDE como óxido nítrico (NO)

Furchgott (1987) fue el primero en proponer que el FRDE podría ser óxido nítrico. Esta propuesta estaba basada en un estudio sobre las características de la relajación de la aorta de conejo producida por un factor relajante independiente del endotelio, el cual se generaba rápidamente por la acidificación de soluciones de nitrito de sodio. Este factor era presumiblemente el óxido nítrico, el cual se formaba durante la descomposición espontánea del ácido nitroso. El factor era lábil, como lo indicaba la transitoriedad de la relajación inducida por éste cuando

era añadido a la solución de Krebs-bicarbonato que perfundía un anillo de aorta, su efecto relajante era completamente bloqueado por la hemoglobina y sólo parcialmente por la metahemoglobina; su efecto relajante era inhibido por generadores de aniones superóxido y se prolongaba por la superóxido dismutasa. Todas estas características también las tenía el FRDE.

La identificación del FRDE como óxido nítrico (NO) o como una molécula que contenía un compuesto nitroso fue realizada tanto por pruebas químicas como por experimentos de bioensayo, al demostrar que el NO podía detectarse en el efluente de células endoteliales en cultivo y que el NO podía imitar las acciones del FRDE en el músculo liso y en las plaquetas (Palmer y col., 1987; Ignarro 1989; Myers y col., 1990).

Otros estudios habían sugerido que el nitrito y el NO producido en las células endoteliales de mamífero eran derivados de la L-arginina (Palmer y col., 1988). En homogenizados de células endoteliales porcinas se identificó un sistema enzimático dependiente del NADPH que convertía la L-arginina en NO y L-citrulina, el cual requería de un catión metálico divalente para su activación (Palmer y col., 1989).

MECANISMOS CELULARES QUE CONTROLAN LA FORMACIÓN DEL FRDE/NO EN LAS CÉLULAS ENDOTELIALES.

La formación del FRDE/NO ha sido demostrada en el endotelio y en otros tipos celulares de mamífero incluyendo a los macrófagos activados (Hauschildt y col., 1990; Iyengar y col., 1987), neutrófilos (Wright 1989), células neuronales (Knowless y col., 1989), células epiteliales de riñón, (Schroder y col., 1989), y células carcinomatosas (Amber y col., 1988).

Otros estudios han mostrado que el NO y la L-citrulina son sintetizados por la oxidación del grupo guanidino de la L-arginina por la sintasa del NO (Adams y col., 1989; Amber y col., 1988; Ando y col., 1988). Por medio de técnicas de biología molecular se han identificado al menos tres isoenzimas, tanto en términos

de su estructura como de la especificidad tisular de la expresión de su mRNA (Bredt y col., 1991; Sessa y col., 1992; Xie y col., 1992).

En las células endoteliales existe una enzima constitutiva, esta enzima ha sido clonada y su peso molecular es de 135 kDa (Lamas y col., 1992). La activación de esta enzima requiere de la elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} libre (Palmer y col., 1989; Mayer y col., 1989; Busse y col., 1990; Forstermann y col., 1991), sin importar si esta elevación es inducida por un estímulo dependiente de un receptor (como la acetilcolina, el ATP, o la bradicinina, entre otros), o por sustancias que no actúan a través de receptor como los ionóforos de Ca^{2+} , o el timerosal (Luckhoff y col., 1988; Mayer y col., 1989).

Una característica de esta isoenzima es un sitio de N-miristoilación, que causa su localización en la membrana celular (Sessa y col. 1992). La relevancia funcional de las formas membranales versus citosólicas es desconocida. Sin embargo, existen diferencias entre los mecanismos que inducen la formación espontánea del NO y la estimulada por agonistas, esto sugiere que en cada una de ellas, el origen del Ca^{2+} activador podría ser diferente (es decir, influjo a través de la membrana plasmática versus liberación desde depósitos intracelulares).

La activación de la sintasa constitutiva del óxido nítrico parcialmente purificada es potenciada por la calmodulina, esto llevó a la conclusión de que la dependencia del Ca^{2+} de la síntesis del óxido nítrico en el citosol endotelial es mediado por la calmodulina (Busse y col., 1990; Forstermann y col., 1991).

La enzima constitutiva, además de ser regulada por cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre y por la calmodulina, también es dependiente de la presencia de un cofactor, el dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina en su forma reducida (NADPH) (Mayer y col., 1989; Busse y col., 1990; Forstermann y col., 1991)

Durante el embarazo, la actividad de la sintasa del NO endotelial (NOS) se incrementa en la arteria uterina y en muchos órganos, además se ha observado este efecto en animales no preñados tratados con estradiol (Weiner y col., 1994).

El aumento en la producción de NO podría contribuir en la redistribución del gasto cardíaco que ocurre durante el embarazo.

INCREMENTO EN LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO EN LAS CÉLULAS ENDOTELIALES INDUCIDO POR AGONISTAS.

La hipótesis de que el Ca^{2+} funciona como un mensajero intracelular en la liberación del NO surgió de la observación de que el ionóforo de calcio, A23187 liberaba al NO mientras que la eliminación del Ca^{2+} extracelular inhibía tal liberación (Long y col. 1985; Griffith y col., 1986; Peach y col., 1987).

Cuando las células endoteliales son estimuladas por la unión de agonistas a su receptor respectivo, se genera una elevación en la concentración intracelular de calcio libre, la cual es considerada un mecanismo clave que dispara diferentes respuestas celulares, tales como la formación de dos autacoides, el NO y la PGI_2 . La medición del incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, ha sugerido que este incremento precede a la liberación del NO o de la prostaciclina, inducida por diferentes vasodilatadores dependientes del endotelio (Hallam y col., 1988; Luckhoff y col., 1988).

Las mediciones de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} en células endoteliales vasculares muestran un valor de reposo cercano a 10^{-7} M (Schilling y col., 1988; Hallam y col., 1986; Hallam y col. 1988; Luckhoff y col., 1988). La estimulación con agonistas, capaces de estimular la liberación tanto del NO como de la PGI_2 , induce un incremento bifásico en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cuya magnitud depende tanto de la preparación como de la concentración del agonista. El incremento inicial transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es atribuido a una liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares (Colden-Stanfield y col. 1987; Luckhoff y col., 1986) mediada por el segundo mensajero IP_3 , (Derian y col., 1986; Piroton y col., 1987a). Este incremento inicial es insensible a la eliminación del Ca^{2+} extracelular y a la depolarización, y es seguido por un incremento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cuya magnitud es intermedia entre el pico del aumento transitorio y los niveles de reposo, y se mantiene mientras se encuentre presente el agonista. Esta fase del

incremento depende de la presencia de Ca^{2+} extracelular y, al parecer, está asociada con un influjo transmembranal de Ca^{2+} (Colden-Stanfield y col., 1987; Hallam y col., 1988, 1989; Jacob y col., 1988; Jacob 1990; Luckhoff y col., 1986

Liberación del calcio desde los depósitos intracelulares. Papel de los segundos mensajeros.

La fase inicial de la elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inducida por agonistas, es debida a la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares y está acompañada de un incremento rápido de los fosfatos de inositol (Jaffe, y col., 1987; Resink, y col., 1987; Lo y col., 1987; Pollock y col., 1988).

Formación de fosfatos de inositol y diacilglicerol

En muchos tipos celulares la activación de una fosfolipasa C (PLC) hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-disfosfato (PIP_2) para producir los segundos mensajeros 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Una proteína G transductora acopla los receptores para la activación de la PLC y en algunos casos, este paso es sensible a la inhibición por la toxina pertussis. Una vez formado, el IP_3 causa liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares; el diacilglicerol activa a la proteincinasa C (Berridge, 1987)

En las células endoteliales se ha reportado la formación de IP_3 en respuesta al ADP y ATP (receptores P_2) (Forsberg y col., 1987; Piroton y col., 1987), a la bradicinina (receptores B_2) (Lambert y col., 1986; Derian 1986), al factor endotelial de crecimiento celular (Moscato y col., 1988), a la histamina (receptores H_1) (Lo y col., 1987; Pollock y col., 1988; Resink y col., 1987), a la trombina (Hallam y col., 1988; Moscato J., y col., 1987; Pollock W.K., y col., 1988), y a la melitina, un activador directo de la PLC (Loeb y col., 1988). También se ha encontrado una disminución simultánea en el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y un incremento en el diacilglicerol (Lambert y col., 1986; Moscato y col., 1987). La evidencia de que el diacilglicerol puede activar a la proteincinasa C puede ser inferido de las acciones de los ésteres de forbol en las células endoteliales (De Nucci y col., 1988; Demolle, y col., 1988; Demolle y col., 1988b; Lewis y col., 1987). La formación de IP_3 no depende de la elevación de calcio intracelular o de

la presencia del calcio extracelular (Hallam y col., 1988), sino que probablemente involucra una proteína G, puesto que la formación de IP_3 en respuesta al ATP (Piroton y col., 1987) (aunque no a la bradicinina, Lambert y col., 1986) es inhibida por la toxina pertussis.

El papel del 1,3,4,5-tetrakisfosfato (IP_4) como segundo mensajero en el control de la entrada de Ca^{2+} permanece en controversia. Experimentos en huevos de erizo de mar condujeron inicialmente a Irvine y col. (1986) a proponer que el IP_4 actúa sinérgicamente con el IP_3 , en la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares. Este sinergismo, reflejaría un acoplamiento entre canales de Ca^{2+} activados por IP_4 en la membrana plasmática, y canales de Ca^{2+} sensibles a IP_3 en el retículo endoplásmico, de manera semejante al acoplamiento, en el músculo esquelético, entre los canales de Ca^{2+} del tipo L en la membrana plasmática y, los receptores a la ryanodina en el retículo sarcoplásmico (los cuales muestran homología con los receptores al IP_3) (Irvine, 1990). Aunque el control sinérgico de la entrada de Ca^{2+} por el IP_4 y el IP_3 fue apoyado por experimentos realizados en células lagrimales de ratón (Morris y col. 1987) y en Ovocitos de *Xenopus* (De Lisle y col. 1992; Crossley y col., 1988), otros investigadores no pudieron reproducir esos efectos (Bird y col., 1991). Luckhoff y col. (1992), obtuvieron evidencia directa de que el IP_4 , pero no el IP_3 , modula la actividad de un canal permeable a cationes divalentes y dependiente de Ca^{2+} en la membrana plasmática de células endoteliales.

Papel de las corrientes iónicas en la estimulación de la biosíntesis del óxido nítrico.

El componente sostenido del incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} es abolido por la eliminación del Ca^{2+} extracelular o por la adición de bloqueadores de los canales del Ca^{2+} , tales como el Co^{2+} y el Mn^{2+} , lo que sugiere que esta fase resulta del influjo de Ca^{2+} (Carter y col., 1988; Hallam y col., 1986; Hamilton y col., 1987; Morgan-Boyd y col., 1987; Pollock y col., 1988; Rotrosen y col., 1986). El mecanismo del influjo de Ca^{2+} inducido por agonistas no es claro.

Se observó que la liberación del FRDE por las células endoteliales *in vitro* inducida por agonistas, disminuía en un medio con elevada concentración de K^+ (Furchgott, 1983b), y no era inhibida por antagonistas del Ca^{2+} , lo que sugería que los canales del Ca^{2+} dependientes del voltaje no estaban involucrados en el acoplamiento estimulación-secreción (Spedding y col., 1986; Jayakodi y col., 1987). Las evidencias de la ausencia de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en las células endoteliales cultivadas pueden resumirse de la manera siguiente:

1. Whorton y col. (1984), encuentran que en células endoteliales cultivadas los influjos de $^{45}Ca^{2+}$ inducidos por bradicinina eran insensibles al verapamil. Además, observaron que los antagonistas de los canales de Ca^{2+} no tenían efecto sobre los cambios en la fluorescencia del fura-2 inducida por el ATP y la bradicinina, en células endoteliales cultivadas de aorta de cerdo. Sin embargo, como muchos bloqueadores orgánicos de los canales de Ca^{2+} presentan dependencia del uso y del voltaje, estos investigadores pensaron que podía no haber sido alcanzada una adecuada inhibición en ausencia de la depolarización.

2. La despolarización de la membrana por la elevación de la concentración extracelular de K^+ , producía una disminución en la captación de $^{45}Ca^{2+}$ (Johns y col., 1987) y una disminución del influjo de Ca^{2+} asociado a la fase sostenida del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, inducida por agonistas (Morgan-Boyd y col., 1987; Laskey y col., 1990).

3. No se había detectado una corriente entrante neta en respuesta a la despolarización de la membrana en las células endoteliales cultivadas, aún durante la perfusión con soluciones isotónicas de Ca^{2+} o de Ba^{2+} , o en presencia de los agonistas del canal de Ca^{2+} del tipo L como el BAY K8644 (Johns y col., 1987; Colden-Stanfield y col., 1987).

Para explicar el influjo de Ca^{2+} se consideraron, entonces, otras tres posibles vías a través de las cuales el Ca^{2+} extracelular podría entrar a la célula endotelial: a) canales de Ca^{2+} operados por receptor, b) canales catiónicos no selectivos o de fuga y c) canales de Ca^{2+} activados por el estiramiento. El influjo de Ca^{2+} a través de canales operados por receptor se propuso porque se

incrementaba el flujo de Ca^{2+} por el efecto de diferentes agonistas, incluyendo a la bradicinina, la histamina, y la trombina (Johns y col., 1987; Hallam y col., 1986). En células endoteliales cultivadas y con la técnica de fijación de voltaje, la trombina y la bradicinina producían una corriente iónica, correspondiente a un incremento en la conductancia de la membrana plasmática (Johns y col. 1987; Hallam y col., 1988). Cuando el Ca^{2+} intracelular era amortiguado (1-10 mM EGTA) esta corriente, inducida por tales agonistas, sólo se observaba en algunas de las células examinadas. La relación I/V de la corriente inducida por estos agonistas, era lineal, con un potencial de inversión cercano a 0 mV. Este hecho, y la variación de la amplitud de la corriente, al variar la concentración del Na^+ o la del Ca^{2+} extracelular, sugerían que los agonistas activaban canales catiónicos no selectivos. Los resultados obtenidos con registros de canales únicos apoyaban esta hipótesis (Johns y col., 1987; Lodge y col., 1988).

Sin embargo, surgía un gran número de interrogantes:

1. ¿Qué mecanismo (o mecanismos) estaba involucrado en el acoplamiento de la activación del receptor a la apertura del canal y el flujo de Ca^{2+} ?
2. ¿Podía el flujo de Ca^{2+} y de otros cationes divalentes ocurrir independientemente de la estimulación continua del receptor por agonistas? Es decir, ¿existía participación de los segundos mensajeros en la mediación del flujo de Ca^{2+} ?
3. Aunque se observaba un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en todas las células endoteliales íntegras y sanas, ¿por qué la corriente de membrana inducida por agonistas vasoactivos era observada únicamente en una pequeña población de células aisladas? ¿Se relacionaba esto con una heterogeneidad de las poblaciones celulares o con la existencia de una alteración en las propiedades de la membrana (pérdida funcional de canales) durante el procedimiento de aislamiento o de cultivo de las células?

Con respecto a la entrada de Ca^{2+} por el estiramiento, Lansman y col. (1987), reportaron un canal permeable al Ca^{2+} con una conductancia de 40 pS, en células endoteliales aórticas porcinas en solución salina fisiológica. La frecuencia

de apertura de estos canales, se incrementaba cuando se estiraba mecánicamente un segmento de la membrana al aplicar una presión negativa al interior de la pipeta. Estos investigadores estimaron una permeabilidad relativa (PCa/PNa) de 1.2 - 8.4 compatible con un canal catiónico relativamente no selectivo. Estos experimentos confirmaron la presencia de una corriente activada por el estiramiento, que se invertía aproximadamente 20 mV por arriba del potencial de reposo, con una conductancia de 45 pS y con una probabilidad de apertura que se incrementaba con la depolarización. Las características de los canales activados por el estiramiento eran definitivamente diferentes a los canales operados por receptor. No se han encontrado este tipo de canales activados por estiramiento en otro tipo de células endoteliales.

Bregestovski y col. (1989), con la técnica de fijación de voltaje en microáreas, encontraron que las células endoteliales cultivadas provenientes de vena umbilical humana, tenían un potencial de membrana en reposo de -27 ± 1.4 mV, no observaron corrientes dependientes de voltaje ni a nivel macroscópico, ni a nivel de canales únicos con potenciales de mantenimiento de -20 a -40 mV. Con la modalidad de célula completa, observaron que la histamina producía un aumento lento y prolongado de una corriente entrante, esta corriente estaba asociada con la despolarización y con una disminución de la resistencia de entrada. El ionóforo de calcio A23187, también inducía corrientes entrantes similares. En registros de canales únicos, también observaron corrientes inducidas tanto por la histamina como por el A23187. La conductancia del canal único era cercana a 20 pS con un tiempo medio de apertura de 5 ms y un potencial de inversión de 0 mV, en soluciones con concentraciones simétricas de potasio. El sodio intracelular bloqueaba las corrientes salientes. La actividad del canal dependiente de histamina requería de calcio externo. Concluyeron que la corriente entrante dependiente de histamina parecía involucrar la activación de canales catiónicos dependientes de calcio.

Olesen y col. (1988) y Busse y col. (1989) reportaron que la estimulación de células endoteliales con Ach (3 μ M) producía una hiperpolarización de la

membrana plasmática que alcanzaba su pico entre los 3 y 5 segundos y disminuía subsecuentemente con un curso temporal similar. La hiperpolarización era causada por una corriente saliente transitoria dependiente de Ca^{2+} (I_{oACh}), la cual era acarreada principalmente por K^+ . La Ach (1 μM y 10 μM) también producía incrementos en la concentración intracelular de Ca^{2+} , dependientes de la dosis. En presencia de atropina (1 y 3 μM) se abolían ambas respuestas a la Ach. Concluyeron que la I_{oACh} y el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eran dos manifestaciones de la estimulación de los receptores muscarínicos, y que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podría ser el evento primario, que conducía a una hiperpolarización secundaria de la membrana.

Cannell y col. (1989), en células endoteliales cultivadas de arteria pulmonar bovina, con la técnica de fijación de voltaje, y medición simultánea de la concentración intracelular de calcio con el indicador fluorescente de calcio, Indo-1, encontraron una relación corriente-voltaje no lineal, con una marcada rectificación entrante cercana al potencial de reposo. Este resultado no dependía de la presencia de agonistas. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reposo era sensible al potencial de membrana, disminuía con la depolarización. Para estos investigadores, los resultados eran consistentes con un modelo de una bomba simple de fuga y sugerían que en estas células no existían canales de calcio dependientes de voltaje. La bradicinina (10 μM) incrementaba la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la cual alcanzaba su máximo en aproximadamente 3 seg., y disminuía gradualmente después de varios minutos. Durante el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido por la bradicinina no había cambios en la relación corriente voltaje de la célula. Estos resultados, cuestionaban el papel de un canal catiónico no específico operado por receptor como mediador del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esta observación, acoplada con el retardo observado en la respuesta producida por el agonista sugería que estaba involucrado un sistema de segundos mensajeros en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los cambios en la relación corriente voltaje empezaban a ocurrir cerca de 30 seg. después de la aplicación del agonista. Para los autores estos cambios podían ser explicados por la activación de canales potasio de conductancia grande y de

canales catiónicos inespecíficos, con un potencial de inversión de 0 mV. El segundo tipo de canales podía mediar la fase de meseta de la respuesta producida por el agonista.

Hallam, (1989), encontró que la estimulación de células endoteliales de vena umbilical humana, por agonistas tales como la histamina o la trombina, promovía un influjo de Ca^{2+} , que causaba un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que era dependiente de la presencia continua tanto del agonista como del Ca^{2+} extracelular. Para este investigador, estos resultados implicaban que la estimulación de un influjo de cationes divalentes podía ser una consecuencia directa de la descarga de depósitos internos de Ca^{2+} más que una consecuencia directa de la presencia del agonista. Apoyaban su propuesta en los resultados de experimentos en los cuales utilizaron Mn^{2+} como indicador para analizar la entrada de Ca^{2+} , con el siguiente diseño experimental: descargaban los depósitos internos con una estimulación breve con histamina (100 μM) en una solución nominalmente libre de Ca^{2+} y si se bloqueaba tal estimulación, con la adición del antagonista H_1 , la mepiramina (20 μM), aún podía ser detectado un influjo de cationes divalentes.

Posteriormente, Jacob (1990), con un diseño experimental similar y en el mismo tipo de células endoteliales, encontró que si en una solución sin Ca^{2+} , una célula era estimulada con histamina (100 μM) por un período de 120 seg, con el propósito de descargar los depósitos internos de Ca^{2+} , y se exponía dicha célula a Mn^{2+} (50 μM), después de retirar la histamina, se observaba una entrada de Mn^{2+} . Este influjo no era afectado por una nueva adición de histamina y no se observaba si los depósitos eran llenados por la exposición de la célula al Ca^{2+} (1 mM) extracelular durante 180 seg, antes de la exposición al Mn^{2+} . El llenado de los depósitos internos por la exposición a 1 mM de Ca^{2+} y la entrada de Mn^{2+} eran bloqueados por Ni^{2+} (2 mM). Si los depósitos internos eran descargados por exposición a la histamina en una solución libre de Ca^{2+} y después eran llenados nuevamente por la exposición a Ca^{2+} , durante períodos variables el llenado de los depósitos internos dependía de la duración del período de llenado, es decir del

tiempo de exposición al Ca^{2+} . En estas condiciones la velocidad de entrada de Mn^{2+} variaba inversamente con el grado de llenado de los depósitos internos de Ca^{2+} . Con estos resultados, concluyeron que el Mn^{2+} entraba a las células endoteliales de la vena umbilical de humano, después de la estimulación por agonistas por una vía, que era controlada por el grado de llenado de los depósitos internos. Aunque, probablemente la entrada del Mn^{2+} no fuera exactamente por la misma ruta utilizada por el Ca^{2+} , propusieron que el Mn^{2+} entraba por una vía que era en parte la misma vía utilizada por el Ca^{2+} para llenar los depósitos internos; y que el elemento común de estas dos vías contenía el sitio en el cual, la entrada de cationes divalentes era controlada por el grado de llenado de los depósitos internos.

En células endoteliales aisladas, la histamina causa incrementos transitorios ("espigas") en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta a casi 1 μM , la frecuencia pero no la magnitud de estas espigas se incrementa con la concentración del agonista. En ausencia de Ca^{2+} extracelular las espigas decrecen progresivamente en magnitud y en frecuencia, cesando, aparentemente, antes de que los depósitos sean depletados (Jacob y col., 1988). Esto sugiere que el llenado de los depósitos intracelulares hasta un nivel crítico pudiera ser necesario antes de que estos puedan ser descargados.

Moritoki y col. (1994b), observaron que el ácido ciclopiazónico (CPA, inhibidor de la ATPasa del Ca^{2+}), en anillos de aorta de la rata contraídos con fenilefrina, produce una relajación dependiente del endotelio. Propusieron que el CPA podía estimular la síntesis de NO, al inhibir la ATPasa de Ca^{2+} indispensable para el llenado de los depósitos intracelulares, que la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} podía disparar un influjo de Ca^{2+} , el cual contribuía al incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} libre en las células endoteliales, y que tal incremento activaba a la sintasa del NO y consecuentemente la formación de NO.

Mehrke y col. (1990), en cultivos primarios de células endoteliales, obtenidas por dispersión enzimática de arterias coronarias de cobayo, encontraron

que el promedio del potencial de reposo de las monocapas era de -35 ± 9 mV. La aplicación de bradicinina (0.1 - 20 nM) durante 2 min induce una hiperpolarización transitoria de hasta 40 mV la cual es seguida por una despolarización sostenida de hasta 28 mV. La magnitud de la hiperpolarización disminuía cuando se elevaba la concentración extracelular de K^+ . La hiperpolarización producida por la primera exposición a la bradicinina, después de que había sido eliminado el Ca^{2+} del medio externo, tenía la misma amplitud que en presencia de dicho ión, pero su duración se reducía hasta aproximadamente un 72 %. La segunda aplicación, en ausencia de Ca^{2+} extracelular, sólo producía depolarización. Se podía volver a obtener la respuesta hiperpolarizante a la bradicinina al exponer transitoriamente (2 min) la preparación a una solución con Ca^{2+} . La hiperpolarización transitoria inducida por la bradicinina fue inhibida por la d-tubocurarina, un bloqueador de canales de K^+ activados por Ca^{2+} . La apamina (10 μ M) también redujo la hiperpolarización en un 15 %, aproximadamente. El ATP (1 μ M) produjo una hiperpolarización de amplitud similar a aquella inducida por la bradicinina, pero con una duración menor y una despolarización muy pequeña (< 5 mV) y no sostenida. La mayoría de las monocapas de células endoteliales coronarias respondía a la adenosina en forma similar a la bradicinina. Estos resultados sugieren que los vasodilatadores dependientes del endotelio inducen una liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares, mediada por segundos mensajeros, seguida por un incremento en el influjo de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. La hiperpolarización transitoria probablemente estaba relacionada con la apertura de canales de K^+ activados por Ca^{2+} y la despolarización sostenida podría estar relacionada con el cierre de canales de K^+ operados por segundos mensajeros.

Chen y col. (1990), en células musculares lisas vasculares, encontraron que la ACh ($>10^{-8}$ M), induce una hiperpolarización con dos componentes (uno transitorio, seguido por uno sostenido), pero sólo si estaba presente el endotelio intacto. Una reducción de la $[Ca^{2+}]_o$, inhibió el componente sostenido. En soluciones sin Ca^{2+} (adicionada con EGTA), sólo se produce el componente transitorio de la hiperpolarización, pero con una amplitud muy reducida. La

procaína (10^{-6} M) inhibió la hiperpolarización inducida por la ACh en una manera dependiente de la concentración; y con una concentración mayor de procaína (10^{-3} M) que causó una despolarización substancial de la membrana, la ACh no produjo cambios detectables del potencial de membrana. La cafeína (10^{-6} - 10^{-3} M) produce una hiperpolarización transitoria, independiente de la presencia o ausencia del endotelio, e inhibe el componente sostenido de la hiperpolarización inducida por la ACh más que el componente inicial. También el A23187 (10^{-8} M) hiperpolariza la membrana del músculo liso en una manera dependiente de la concentración, y esta hiperpolarización no es generada en soluciones libres de Ca^{2+} o en ausencia de células endoteliales. Estos investigadores concluyeron que, al parecer, en la arteria carótida de conejo, la hiperpolarización dependiente del endotelio inducida por la ACh tiene componentes independientes y dependientes del Ca^{2+} extracelular y que, cada uno está relacionado con un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inducido respectivamente por la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares y por el influjo de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. Propusieron además, que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podría provocar la liberación de un factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE).

Sakai (1990), encontró que la ACh producía hiperpolarización de la membrana de las células endoteliales de la aorta del conejo. Con la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa, observó que la ACh (10^{-6} M) induce una corriente saliente que es bloqueada por la atropina. La aplicación de pirenzepina (antagonista de los receptores M_1) o de AF-DX 116 (antagonista de los receptores M_2) inhibió levemente la corriente, mientras que la aplicación simultánea de estos dos bloqueadores la inhibió marcadamente. La aplicación de cafeína (2×10^{-2} M), ryanodina (10^{-5} M) o heparina (10^{-5} g/ml), también reduce la amplitud de esta corriente y el azul de metileno la inhibe completamente. El registro de canales únicos reveló que la ACh abre canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} con una conductancia de 9 pS. Estos resultados indican que las células endoteliales de la aorta del conejo presentan los subtipos de receptores

muscarínicos M_1 y M_2 y que la ACh activa canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} vía la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares.

Bossu y col. (1989 y 1992), utilizaron células endoteliales recién aisladas de capilar de bovino para examinar la entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje. Utilizaron la modalidad de registro en célula completa para analizar los procesos de activación e inactivación, y las modalidades de registro de parches no desprendidos y parches desprendidos evertidos (*inside out*) para analizar las conductancias elementales. Encontraron que todas las células mostraban actividad de canales de Ca^{2+} de bajo umbral, con las principales características de una corriente transitoria del tipo T y cuya conductancia unitaria fue de 8 pS. El 25% de las células mostraban una corriente adicional de tipo sostenido en presencia de 5 mM de $CaCl_2$ por arriba de -40 mV, la cual, se incrementaba por la aplicación de BAY K 8644 pero era insensible a la nicardipina. Se observaron dos tipos de canales sensibles al BAY K 8644 con una conductancia de 2.8 y 21 pS, respectivamente, (con 110 mM de $BaCl_2$, en la pipeta). Los canales con conductancia mayor eran canales del tipo L. Los de menor conductancia se activaban a potenciales más negativos y en promedio permanecían abiertos durante 16 mseg en condiciones control. En presencia de BAY K 8644, se observaron aperturas adicionales prolongadas (hasta de 100 ms, en comparación con la constante de tiempo de sólo 7.8 ms del modo lento de los canales tipo L). Estos investigadores designaron a este tipo de canales, como canales SB: de conductancia baja y sensibles a BAY K 8644. En presencia de nicardipina, la actividad de los canales SB no se modificó notablemente, en contraste con los canales tipo L, en los cuales fue abolida la actividad. Tampoco se modificaban las duraciones de las aperturas y de los cierres de los canales SB cuando se agregó nicardipina, después de una aplicación de BAY K 8644. Los autores propusieron que con concentraciones fisiológicas de cationes divalentes, por arriba de potenciales de membrana de -40 mV, se induce una actividad del tipo SB que genera la corriente sostenida de bajo umbral.

Yamamoto y col. (1992), propusieron que en la membrana de células endoteliales de la arteria pulmonar de la rata, existe un canal catiónico, selectivo al Ca^{2+} , pero también permeable al Na^+ y al K^+ , el cual tiene propiedades de rectificación entrante, posiblemente debido al Mg^{2+} intracelular; estos autores también propusieron que la histamina, pero no la acetilcolina, activa dicho canal catiónico y eleva la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Mendelowitz y col. (1992), utilizaron grupos de células endoteliales acopladas eléctricamente para estudiar, con la técnica de fijación de voltaje, una posible vía de influjo de Ca^{2+} activada por la bradicinina. Encontraron que la bradicinina activa una corriente entrante acarreada tanto por Na^+ como por Ca^{2+} , cuando el potencial de membrana es mantenido a un nivel de -60mV . La corriente es activada dentro de los primeros 3 seg de la aplicación de la bradicinina, y alcanza su máximo durante el primer minuto. Con el Ca^{2+} como ión extracelular permeante, la corriente permanece estable durante 1 a 3 min y después declina en un período de 5 a 8 min, en presencia continua del agonista. Sin embargo, cuando la corriente es acarreada por el Na^+ , se mantiene constante durante los 10 min que duró la observación. El potencial de inversión de la corriente activada por la bradicinina es cercano a 0mV , lo que sugiere la activación de un canal catiónico inespecífico. La corriente entrante a -60mV es en promedio $13 \pm 4.5\text{ pA}$ ($n=9$) en presencia de Ca^{2+} y $12.2 \pm 9.3\text{ pA}$ ($n=5$) en presencia de Na^+ . Tanto la corriente de Ca^{2+} , como la de Na^+ , son bloqueadas por $200\text{ }\mu\text{M}$ de lantano.

Hosoki y col., (1994), reportaron que en células endoteliales la reducción en la concentración extracelular de Cl^- hasta 40 mM , o la exposición al antagonista del canal de Cl^- el ácido N-fenilntranílico previno selectivamente la elevación sostenida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por la histamina o el ATP, y que estas maniobras no afectaron la elevación sostenida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina. La elevación de la concentración extracelular de K^+ hasta 90 mM no tuvo influencia sobre la respuesta sostenida a la histamina o al ATP. Estos autores propusieron que la elevación sostenida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la

histamina o al ATP, era debida a la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular y que era sensible a la $[\text{Cl}^-]_e$.

Graier y col. (1992) demostraron que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la histamina en células endoteliales de vena umbilical de humano es debida principalmente a la activación de una corriente de membrana que permite la entrada de Ca^{2+} . Esta corriente es sensible al inhibidor de la entrada de Ca^{2+} inducida por agonistas, el SK&F 96365, el cual bloquea el incremento sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la histamina, así como también la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ y las corrientes de membrana. La inhibición de dichas respuestas a la histamina se acompaña de una reducción considerable en la formación y liberación del NO. Esto sugiere que en estas células, la biosíntesis y liberación del NO depende de la entrada de Ca^{2+} inducida por agonistas e involucra canales permeables al Ca^{2+} operados por receptor.

Groschner y col. (1994), estudiaron las respuestas de la membrana, a la estimulación con histamina en células endoteliales vasculares humanas, con la técnica de fijación de voltaje en las modalidades de parche perforado y de célula completa tradicional. En experimentos con parche perforado, la corriente inicial inducida por la histamina ($10 \mu\text{mol/L}$) se invirtió en la cercanía del potencial de equilibrio del K^+ y fue bloqueada por el tetrabutilamonio (TBA, 10 mmol/L). Además, registraron una corriente insensible al TBA que se desarrollaba lentamente en presencia de histamina. Esta corriente retardada, inducida por la histamina, se invirtió en la cercanía del potencial 0 y fue inhibida por el SK&F 96365 ($25 \mu\text{mol/L}$), un bloqueador de los canales de Ca^{2+} operados por receptor. Observaron efectos similares con la histamina con la modalidad convencional de célula completa. El componente retardado de la corriente inducida por la histamina, fue inhibido marcadamente por el bloqueador de canales de Cl^- , el ácido N-fenilntranílico (NPA, $100 \mu\text{mol/L}$), y un cambio de ocho veces en el gradiente de Cl^- , cambió el potencial de inversión de esta corriente en 30 mV. En soluciones sin Cl^- , la histamina indujo una corriente que era resistente al NPA y sensible al SK&F 96365, lo cual, de acuerdo con las mediciones del potencial de

inversión determinado con 20 mmol/L de Ca^{2+} extracelular, correspondió a una conductancia catiónica con una selectividad para el Ca^{2+} de 13 a 25 veces mayor que para el K^+ . Tanto el SK&F 96365 como el TBA, suprimieron marcadamente los incrementos en la concentración intracelular de Ca^{2+} libre, y los niveles de GMPc celular inducidos por la histamina, mientras que el NPA no modificó dichas variables. Estos resultados proporcionaron, según los autores, la primera demostración de que en las respuestas de la membrana de las células endoteliales, inducidas por la histamina, participaban tres distintas conductancias iónicas, es decir, que la histamina inducía una conductancia al Cl^- que aparentemente no estaba involucrada en la homeostasis del Ca^{2+} y la regulación de la biosíntesis del NO, mientras que, en paralelo, producía la activación simultánea de otras dos permeabilidades, una al K^+ inducida rápidamente y otra que se desarrollaba lentamente que mediaba la entrada de Ca^{2+} y la estimulación de la síntesis de NO endotelial.

LA PARTICIPACIÓN DE FACTORES HORMONALES EN LA MODULACIÓN DEL TONO VASCULAR DEPENDIENTE DEL ENDOTELIO.

La presencia de hormonas femeninas está asociada con una incidencia menor de padecimientos cardiovasculares. En la mujer premenopáusica existe un retraso en el desarrollo de padecimientos arteriales coronarios de aproximadamente 10 años con respecto a los hombres con características socioeconómicas similares (Becker 1992), pero la diferencia entre los hombres y las mujeres se estrecha después de los 50 años de edad (Bush, 1990). Además, las mujeres con hipertensión sistémica tienen una morbilidad y mortalidad más baja en comparación con los hombres hipertensos (Anastos y col., 1991; Sokolow y col., 1961). Está bien documentado, que las mujeres que reciben terapia substitutiva con estrógenos tienen una reducción del 40 al 50 % en el riesgo de presentar padecimientos arteriales coronarios (Henderson y col., 1986, Barrett-Connor y col., 1989; Ross y col., 1981). Aunque una parte importante de estos efectos ha sido atribuida al incremento en las lipoproteínas de alta densidad y a una disminución en las lipoproteínas de baja densidad (Bush y col., 1990; Gruchow y col., 1988; Walsh y col., 1991), se ha encontrado que el perfil lipídico sólo se modifica aproximadamente en un 50% en las mujeres tratadas con estrógenos, sugiriendo que están involucrados otros mecanismos (Bush y col., 1987). Por otro lado, se ha observado que las mujeres hipertensas presentan una presión sanguínea más baja en respuesta al ejercicio isométrico, con respecto a los hombres con características similares (raza, edad y valores de presión arterial media) y se ha sugerido que esto es debido a alteraciones en la reactividad vascular (Messerli y col., 1987).

La terapia con estrógenos parece ser benéfica en mujeres que padecen el síndrome cardíaco X, un padecimiento reconocido recientemente, que se caracteriza por una angina severa en la presencia de arterias coronarias normales. Este padecimiento está asociado a una insuficiencia ovárica (Sarrel y col., 1992) y a una deficiente respuesta hiperémica dependiente del endotelio (Sax y col., 1987). La administración de 17 β -estradiol por un período de 2 meses,

restaura la respuesta hiperémica a sus valores normales y mejora marcadamente los síntomas (Sarrel y col., 1992).

Varios estudios han reportado que, la administración de estradiol, incrementa las relajaciones dependientes del endotelio, de las arterias coronarias en respuesta a la estimulación con acetilcolina. Williams y col., (1990) utilizaron la técnica de angiografía cuantitativa en monos alimentados con una dieta rica en colesterol y demostraron que la infusión de acetilcolina constreñía las arterias de animales ovariectomizados, pero dilataba aquellas de un grupo de animales tratados con estrógenos. Aunque en el grupo de animales tratados con estrógenos estaba reducida la formación de placas ateroscleróticas, la modificación en la vasorreactividad no se correlacionaba con la magnitud del desarrollo de dichas placas. Estos hallazgos, han sido apoyados por estudios realizados en mujeres postmenopáusicas, en las cuales la administración de acetilcolina produce vasoconstricción, esto sugiere que existe una disfunción celular endotelial. La administración de concentraciones fisiológicas de 17β -estradiol o de esteroides sintéticos, como el etinil estradiol, por infusión intraarterial o intracoronaria potencia la vasodilatación inducida por la acetilcolina en las arterias coronarias, así como en la circulación del antebrazo (Gilligan y col., 1994; Reis y col., 1994). El estradiol, también incrementa la respuesta vasodilatadora al nitroprusiato de sodio en el antebrazo, pero no en la circulación coronaria (Gilligan y col., 1994), esto sugiere que el estradiol modula la sensibilidad del músculo liso vascular sólo en algunos lechos vasculares.

Existen evidencias de que los estrógenos y la progesterona modulan la producción o la actividad de las sustancias derivadas del endotelio, el NO, la endotelina-1 (ET-1), y los eicosanoides, entre otros.

Los anillos aórticos aislados, precontraídos con fenilefrina, provenientes de conejas comparados con aquellos provenientes de conejos, muestran una mayor relajación en respuesta al inhibidor de la inactivación del NO, la superóxido dismutasa, y una contracción mayor después de la inhibición de la síntesis del NO por la nitro-metyl-L-arginina (Hayashi y col., 1992). La ovariectomía anula esta

diferencia, sugiriendo que los niveles fisiológicos de las hormonas femeninas, estimulan la liberación basal del NO.

La arteria uterina de cobayo y los anillos aórticos de la rata muestran un incremento en la relajación inducida por la acetilcolina durante el embarazo (Bell, 1973; Weiner y col., 1991; Goetz y col., 1994). Estos efectos del embarazo son similares a aquellos observados con el tratamiento agudo y crónico con el estradiol, lo que sugiere que los cambios asociados con el embarazo están mediados, al menos en parte, por el estradiol.

El tratamiento crónico con 17β -estradiol también incrementa las relajaciones inducidas por la acetilcolina en anillos de arteria femoral de conejo y de aorta de ratas hipertensas espontáneas (Williams y col., 1988, Gisclard y col., 1988). Sin embargo, no todos los estudios apoyan que la vasodilatación inducida por el estradiol sea mediada por el NO; sólo en algunos estudios se ha reportado que en los anillos de arteria coronaria precontraídos, la relajación inducida por el estradiol se revierte por la inhibición del NO mientras que en otros estudios no se ha observado dicha reversión (Collins y col., 1994; Jiang y col., 1992).

Los hallazgos en diferentes especies, sugieren que el estradiol modula las relajaciones dependientes del endotelio en un gran número de lechos vasculares a través del incremento en la liberación del NO, que podría ser ocasionada por un incremento en la expresión de la sintasa del NO III (NOS III). Sin embargo, los efectos observados durante el embarazo no se reproducen completamente por el tratamiento con estradiol, y los efectos del estradiol no son tan generalizados como los observados durante el embarazo. Por lo tanto, al parecer están involucrados otros mecanismos, tales como el incremento en la sensibilidad o en la afinidad de los receptores endoteliales, o efectos sobre los pasos intermedios involucrados en la liberación del NO mediada por receptores, tales como la modulación de la activación de las proteínas G.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En el presente estudio se analizaron básicamente dos problemas. I.- El papel que juegan los diferentes mecanismos que pueden elevar la $[Ca^{2+}]_i$ en las células endoteliales en las relajaciones dependientes del endotelio inducidas por diversos agonistas. II.- Los efectos de los estrógenos en la modulación del tono vascular dependiente del endotelio.

Análisis experimental del papel del Ca^{2+} en las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio.

La activación de la isoforma endotelial de la sintasa de NO, requiere de la elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} libre ($[Ca^{2+}]_i$) (Palmer y col., 1989; Mayer y col., 1989; Busse y col., 1990; Forstermann y col., 1991), sin importar como se origina dicha elevación. Se ha demostrado que la estimulación de las células endoteliales con agonistas que inducen la síntesis/liberación del NO produce un incremento bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$ (Luckhoff y col., 1988; Hallam y col., 1986; Colden-Stanfield y col., 1987; Morgan-Boyd y col., 1987; Schilling y col., 1988; Hallam y col., 1988). El componente inicial transitorio refleja la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, mientras que el componente sostenido de este incremento, refleja un influjo transmembranal de Ca^{2+} desde el espacio extracelular (Colden-Stanfield y col., 1987; Luckhoff y col., 1986; Schilling y col., 1988). Aunque los mecanismos involucrados en la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares han sido ampliamente estudiados en una gran variedad de células no excitables, la identificación electrofisiológica y la caracterización de las vías del influjo transmembranal de Ca^{2+} permanecen en controversia. Se han identificado algunas características de estas vías a partir de estudios indirectos. Primero, el influjo puede ser bloqueado por algunos cationes inorgánicos, incluyendo al Ni^{2+} y al La^{3+} , los cuales producen una inhibición a concentraciones del orden mM y μ M, respectivamente (Colden-Stanfield y col., 1987; Pandol y col., 1987; Schilling y col., 1988; Kwan y col., 1990; Buchan y col., 1991). Segundo, la depolarización de la membrana plasmática por elevación del K^+ extracelular, o por aplicación de corriente con la técnica de fijación de voltaje, producen una

disminución del influjo de Ca^{2+} inducido por diversos agonistas en las células endoteliales (Sauvé y col., 1988; Schilling y col., 1989; Schilling, 1989; Luckhoff y col., 1990a,c). Tercero, algunos autores han reportado que el influjo de Ca^{2+} es insensible a los inhibidores o activadores orgánicos de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje derivados de las dihidropiridinas (nitrendipina o BAY K 8644) (Colden-Stanfield y col., 1987; Schilling y col., 1988). Sin embargo, también se ha reportado que en células endoteliales provenientes de capilares de la médula suprarrenal, el influjo de Ca^{2+} es sensible a dichos compuestos (Bossu y col., 1992). Cuarto, se ha reportado que el compuesto sintético SKF 96365 (bloqueador de canales de Ca^{2+} operados por receptor), inhibe los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por agonistas en las células endoteliales, en las plaquetas y en los neutrófilos (Merrit y col., 1990). Quinto, estudios recientes en células acinares pancreáticas (Muallem y col., 1989) y en células endoteliales aórticas de bovino (Thuringer y col., 1991) han mostrado que la alcalinización del medio extracelular estimula el influjo de Ca^{2+} inducido por agonistas. Y sexto, la vía del influjo inducido por agonistas, en las células endoteliales es permeable tanto al Ca^{2+} , como al Mn^{2+} , y al Ba^{2+} (Schilling y col., 1989; Kwan y col., 1990).

Estudios en neutrófilos (Smith y col., 1990) y células endoteliales (Schilling y col., 1991) sugieren que la inhibición de la fosfolipasa C atenúa, tanto la liberación de Ca^{2+} inducida por agonistas desde depósitos intracelulares, como el influjo de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. La estimulación del influjo de Ca^{2+} podría involucrar tanto una activación directa de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática por el IP_3 y/o por el IP_4 , o podría reflejar simplemente la capacidad de estos segundos mensajeros para depletar los depósitos internos de Ca^{2+} , como ha sido sugerido por el modelo capacitativo de Putney (1986, 1987, 1990). Los efectos de varios agentes, específicamente la 2,5-di-t-butilhidroquinona (BHQ), la tapsigargina y el ácido ciclopiazónico, apoyan esta última hipótesis. Estos agentes son inhibidores selectivos de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y/o del retículo sarcoplásmico y parecen depletar los depósitos intracelulares de Ca^{2+} sin producir un incremento en la hidrólisis de los

fosfoinosítidos (Goeger y col., 1988; 1989; Seidler y col., 1989; Takemura y col., 1989; Foder y col., 1989; Kass y col., 1989; 1990; Oldershaw y col., 1990). Diferentes estudios han mostrado que estos compuestos estimulan el influjo de Ca^{2+} en algunas células no excitables (Takemura y col., 1989; Foder y col., 1989; Kwan y col., 1990; Mason y col., 1991). Sin embargo, en otros estudios no se ha encontrado este efecto (Kass y col., 1989; Luckhoff y col., 1990b; Llopis y col., 1991). Por otro lado, no ha sido identificada convincentemente la vía de entrada de Ca^{2+} activada por la depleción de los depósitos intracelulares inducida por agonistas.

En relación al componente inicial transitorio de la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por diversos agonistas, éste se ha atribuido fundamentalmente a la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares inducida por IP_3 . Sin embargo, recientemente se demostró en células endoteliales la existencia de receptores a la ryanodina (Lesh y col., 1993) y la existencia de depósitos de Ca^{2+} funcionales sensibles a este compuesto (Ziegelstein y col., 1994). Esto sugiere que la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} pudiera participar, también, en la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares de Ca^{2+} inducida por diversos agonistas.

Por otro lado, aunque se acepta generalmente que la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} induce el influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, aún no es claro cual es la señal que desencadena dicho influjo, ni cual es la vía de entrada del Ca^{2+} desde el espacio extracelular al citoplasma. Por otro lado, tampoco ha sido dilucidado cual es el papel de cada uno de los diferentes mecanismos que pueden producir un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la activación de la síntesis y liberación del NO.

Finalmente, aunque se han estudiado los mecanismos que producen el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células endoteliales recién aisladas o cultivadas, hasta el momento no se ha realizado la correlación entre dichos mecanismos y las relajaciones dependientes del endotelio inducidas por los diversos agonistas.

Por lo anterior esta parte del estudio se propone contestar las siguientes interrogantes:

1.- ¿Cuál es el papel de los diferentes mecanismos que pueden originar en las células endoteliales el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, responsable de la activación de la sintasa del NO y de la relajación producida por el NO?

2.- ¿Activan los diversos agonistas que producen las relajaciones dependientes del endotelio los mismos mecanismos que producen el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ indispensable para activar la síntesis del NO?

Análisis de la participación de factores hormonales en la modulación del tono vascular dependiente del endotelio.

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que las mujeres en edad reproductiva tienen, en comparación con los hombres de la misma edad y con características socioeconómicas similares, un menor riesgo de padecer hipertensión arterial e infartos del miocardio (Kannel y col., 1976; Young y col., 1993). Esta diferencia tiende a desaparecer después de la menopausia o de la ovariectomía, y las mujeres posmenopáusicas tienen un riesgo mayor de desarrollar padecimientos vasculares coronarios que las mujeres premenopáusicas de edad similar (Colditz y col., 1987; Kannel y col., 1992). Por otro lado, la terapia hormonal substitutiva disminuye la incidencia de dichos padecimientos en mujeres posmenopáusicas o con ovariectomía (Barret-Connor y col., 1991; Stampfer y col., 1991). Los efectos benéficos de los estrógenos son aún mayores en las mujeres con padecimientos cardiovasculares preexistentes (Sullivan y col., 1988). Con base en estas observaciones epidemiológicas, se ha propuesto que los estrógenos tienen un papel protector que previene ciertos padecimientos cardiovasculares. En los últimos años se ha observado que el control vascular dependiente del endotelio se altera en etapas tempranas de la aterosclerosis (Ludmer y col., 1983; Forsterman y col., 1988) y, por lo tanto se ha sugerido que el endotelio pudiera participar en el efecto protector de los estrógenos (Gisclard y col., 1988; Williams y col., 1988). Los efectos de los estrógenos sobre las respuestas dependientes del endotelio de arterias aisladas

se han analizado en diferentes modelos experimentales (Gisclard y col., 1988; Miller y col., 1991; Keany y col., 1994). Las evidencias mostradas por dichos estudios apoyan la hipótesis de que los estrógenos modulan la liberación (y/o la acción) de sustancias vasoactivas del endotelio.

En el presente estudio se intentaron contestar principalmente dos interrogantes:

- 1.- ¿Modifica el tratamiento agudo o crónico con estrógenos las respuestas contráctiles de la aorta aislada de rata a la fenilefrina, agonista selectivo de los receptores α_1 adrenérgicos ?
- 2.- ¿Modifican los estrógenos la relajación dependiente del endotelio inducida por el carbacol en dicho vaso?

OBJETIVOS

El objetivo general del presente estudio fue analizar algunos aspectos del papel del endotelio en la modulación del tono vascular. Para lograr dicho objetivo el estudio fue dividido en tres partes:

Parte I

Caracterización de las respuestas vasomotoras inducidas por diversos agonistas.

En esta parte se repitieron algunos experimentos descritos en la literatura. Los objetivos de esta fase fueron: 1o.- confirmar que con el dispositivo experimental utilizado era posible reproducir los resultados reportados. 2o.- Determinar las condiciones experimentales óptimas para el tipo de preparación biológica utilizada.

Parte II

Análisis experimental del papel del Ca^{2+} en las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio.

Esta parte fue dividida en dos fases:

1.- Caracterización de las contracturas inducidas por la fenilefrina

El objetivo de esta fase fue analizar el posible origen del Ca^{2+} responsable del desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina.

2.- Análisis de las relajaciones dependientes del endotelio mediadas por los receptores a diversos agonistas.

El objetivo de esta fase del proyecto fue analizar los posibles mecanismos que producen el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ necesario para inducir la liberación del NO, y consecuentemente, la relajación.

Parte III

Análisis de la participación de factores hormonales en la modulación del tono vascular dependiente del endotelio.

Los objetivos de esta parte fueron:

1.- Analizar los efectos de la exposición crónica o aguda a los estrógenos sobre las respuestas contráctiles inducidas por la fenilefrina.

2.- Estudiar los efectos de la exposición aguda o crónica a los estrógenos sobre la relajación dependiente del endotelio inducida por el carbacol.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Preparación biológica

Los experimentos fueron realizados en anillos de aorta de ratas Wistar, macho o hembra, con pesos comprendidos entre 250 a 300 g.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediata exsanguinación. Después de hacer una toracotomía, la aorta torácica fue extraída y colocada en una cámara de disección con solución de Tyrode aireada continuamente. El tejido conectivo adherido al vaso, fue eliminado bajo observación con un microscopio de disección. Se tuvo extremo cuidado de no tocar la íntima del vaso con el fin de evitar dañar el endotelio. De la parte central de la arteria se obtuvieron anillos de aproximadamente 2 mm de ancho. Para cada experimento se seleccionaron dos anillos, a uno de los cuales se le dañó mecánicamente el endotelio. Los anillos fueron trasladados a una cámara de perfusión continua, donde cada uno fue montado verticalmente entre dos ganchos de acero inoxidable; de cada par de estos ganchos, uno estaba fijo a la cámara de perfusión, mientras que el otro estaba unido a un transductor isométrico de fuerza (Grass FT03). Montadas las preparaciones en dicho dispositivo, se les aplicó una tensión basal de 2 g. En estas condiciones se dejaron, para su estabilización, por un período de 60 min., a una temperatura de 37°C. La tensión era registrada continuamente, y en caso necesario reajustada nuevamente a 2 g.

El dispositivo experimental utilizado permitió exponer a los dos anillos a las mismas condiciones experimentales e identificar los efectos producidos sobre el músculo liso vascular y aquellos donde estaba involucrado el endotelio.

Como modelo para estudiar la liberación de NO se utilizó el efecto relajante del carbacol (10^{-5} M) en los anillos con endotelio íntegro precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M), el cual contrastado con la respuesta al carbacol de los anillos sin endotelio, es un indicador fisiológico confiable de la liberación del NO.

En los experimentos donde se analizaron los efectos del tratamiento estrogénico, se utilizaron ratas hembras no preñadas a las cuales se les practicó una ovariectomía bilateral, bajo anestesia con pentobarbital sódico (32

mg/Kg.i.p.). Después de la cirugía se les administró penicilina cristalina (400,000 U/kg i.m.) como profilaxis y se dejaron recuperar por un período de ocho días. Después de esto los animales se distribuyeron al azar en dos grupos, animales tratados y animales no tratados. Las ratas del grupo de animales no tratados fueron utilizados 10 a 14 días después de la cirugía. Las ratas del grupo de animales tratados recibieron una dosis única por vía subcutánea de 1 μ mol de 17-estearato de estradiol disuelto en 0.3 ml. de aceite de ricino. Estudios previos han mostrado (Vázquez-Alcántara y col., 1985; 1989) que tres días después de administrar como dosis única (0.1-1.0 μ mol) estearato de estradiol a ratas ovariectomizadas, los niveles séricos de 17 β -estradiol se restablecen a valores cercanos a aquellos medidos durante el estro en ratas no preñadas, y permanecen en estos niveles por 30 a 60 días. Las ratas de este grupo fueron utilizadas 11-13 días después del tratamiento. Todos los animales fueron colocados en cajas individuales con libre acceso al alimento y al agua y expuestos a ciclos de 12 h de luz-obscuridad.

2.- Sistema de perfusión y control de la temperatura

La cámara de perfusión consistía en un cilindro de plástico con un volumen de aproximadamente 0.5 ml. Las soluciones de perfusión llegaban a la cámara por gravedad desde reservorios colocados a una altura de aproximadamente 60 cm, a través de tubos de polietileno los cuales, después de atravesar un baño termostático, desembocaban en el fondo de la cámara. Este método de perfusión reduce los artefactos mecánicos producidos durante los cambios de solución. La solución se drenaba, por rebosamiento, hacia un canal unido al borde superior de la cámara y dentro del cual se colocaba una mecha de celulosa; esto permitía mantener constante el nivel de la solución en la cámara. La velocidad de flujo fue de aproximadamente 2 ml por min., lo que aseguraba un recambio rápido de la solución.

3.- Soluciones

Las soluciones de perfusión utilizadas fueron preparadas el día del experimento a partir de soluciones madre, preparadas con sales de grado

analítico. La composición milimolar de la solución de Tyrode normal fue: NaCl: 137; KCl: 2.7; MgCl₂: 0.69; NaHCO₃: 11.9; NaH₂PO₄: 0.4; CaCl₂: 1.8; Glucosa: 10.

En algunos experimentos se modificó la concentración de Ca²⁺ en la solución de Tyrode entre nominalmente 0 mM (es decir, sin adición de CaCl₂) y 1.8 mM. Las soluciones fueron aereadas con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ hasta alcanzar un pH de 7.4 y se mantuvieron continuamente aereadas durante la perfusión

En los experimentos en los cuales se utilizó Co²⁺ o Ni²⁺ se substituyó el amortiguador (NaHCO₃ y NaH₂PO₄) por 5 mM de Tris-Hidroximetil Amino-Metano (THMAM) o por 10 mM de HEPES. Estas soluciones fueron aereadas con O₂ al 100 %, y el pH se ajustó con HCl o NaOH, respectivamente.

Cuando se utilizó indometacina, ésta fue disuelta previamente en una solución madre de carbonato de sodio al 4%; de dicha solución se tomó el volumen requerido para alcanzar la concentración deseada en las soluciones de perfusión (generalmente 10⁻⁵ M).

Cuando se utilizó 17β-estradiol, éste fue disuelto previamente con dimetilsulfóxido. Esta sustancia no provocaba efecto alguno sobre las respuestas contráctiles de las preparaciones.

4.- Sistema de registro

La respuesta mecánica de los anillos aórticos fue medida mediante un transductor electromecánico de tipo isométrico (Grass Modelo FTO3-C), amplificada con un preamplificador de DC (Grass Modelo 7P1) y graficada en un sistema poligráfico (Grass Modelo 79D).

5.- Análisis de resultados

Las respuestas contráctiles inducidas por los diversos vasoconstrictores son expresadas como el incremento en gramos de la tensión por arriba de la tensión basal. Cuando se realizaron curvas dosis respuesta a diferentes vasoconstrictores la magnitud de las respuestas contráctiles fue expresada como el porcentaje de la tensión máxima desarrollada por los anillos sin endotelio en respuesta a dicho fármaco.

La relajación inducida por los diferentes vasodilatadores es expresada como el porcentaje de la disminución de la tensión con respecto a la tensión máxima desarrollada en respuesta a la fenilefrina (10^{-5} M).

Todos los datos son expresados como la media \pm E.S. El PD_2 (-Log de la concentración molar promedio del agonista que produce el 50 % de la respuesta máxima), fue determinada con el programa computacional Graph Pad Prism. Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó la prueba de t de Student para grupos pareados y no pareados. El número de experimentos para cada grupo fue como mínimo de 4.

Con excepción de los experimentos en los cuales se analizaron los efectos del tratamiento crónico con estrógenos, en este estudio cada preparación fungió como su propio control para evaluar los efectos de una determinada maniobra experimental. Además al final de cada experimento (y después de un período de lavado de por lo menos 30 min en solución de Tyrode) se exploraban las respuestas de los anillos a la fenilefrina (10^{-5} M), y al carbacol (10^{-5} M). La magnitud de estas respuestas se comparó con la magnitud de las respuestas a estos fármacos al inicio del experimento con la finalidad de corroborar la reversibilidad de los efectos de las diferentes maniobras y de evaluar el grado de deterioro de la preparación.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Todos los experimentos se iniciaron con la siguiente secuencia de maniobras:

Después de colocar los anillos en el dispositivo de registro se perfundieron con solución de Tyrode, por un período mínimo de 60 min. Durante este período, si era necesario, se ajustaba la tensión a 2 g. Este período servía para asegurar la estabilización de las preparaciones.

Después del período de estabilización, las preparaciones eran expuestas secuencialmente a la fenilefrina y al carbacol. Para tal efecto, se cambiaba la perfusión con solución de Tyrode, durante un período de 10 min, a una perfusión con solución de Tyrode que contenía, fenilefrina (10^{-5} M) y, después de esto, a una perfusión con solución de Tyrode que contenía además de la fenilefrina, carbacol (10^{-5} M). La relajación, hasta casi la tensión basal, inducida por el carbacol en los anillos contraídos previamente con fenilefrina, era tomada como evidencia de la preservación de un endotelio funcionalmente intacto, mientras que la falta de dicha relajación, confirmaba la ausencia de un endotelio funcional.

Al terminar el período de exposición al carbacol, la preparación era perfundida nuevamente con solución de Tyrode por un período de 30 min. para asegurar la eliminación de los agonistas y sus efectos.

Parte I

Caracterización de las respuestas vasomotoras inducidas por diversos agonistas:

En esta serie de experimentos se analizaron los efectos de diferentes sustancias sobre las respuestas contráctiles de los anillos. En general, los experimentos consistieron en la determinación de las curvas dosis respuesta acumulativas a cada una de las sustancias utilizadas.

1.- Efectos de la noradrenalina (NA).- Para estudiar los efectos de la noradrenalina se determinaron las curvas dosis-respuesta acumulativas de los anillos aórticos con y sin endotelio a este agonista de los receptores adrenérgicos α_1 y α_2

- 2.- **Efectos de la fenilefrina.** Se obtuvieron curvas dosis-respuesta a este agonista selectivo de los receptores adrenérgicos α_1 .
- 3.- **Efectos del carbacol.** Se obtuvieron curvas dosis-respuesta al carbacol, agonista no selectivo de los receptores muscarínicos, en los anillos contraídos previamente con fenilefrina (10^{-5} M).
- 4.- **Efectos del nitroprusiato de sodio.** Se determinaron curvas dosis-respuesta a este fármaco en los anillos precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M).
- 5.- **Efectos de la histamina.** Se determinaron curvas dosis-respuesta a este fármaco en los anillos precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M).
- 6.- **Efectos del ATP.-** Se determinaron curvas-dosis respuesta a este agonista purinérgico en los anillos precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M).
- 7.- **Efectos de la hemoglobina (Hb) y del azul de metileno.** Para corroborar su efecto inhibitorio sobre las respuestas dependientes del endotelio, en esta serie de experimentos se aplicó la Hb o el azul de metileno a una concentración de 10^{-7} M, en ambos casos, durante la perfusión con solución de Tyrode y, se realizaron, en presencia de estas sustancias, curvas dosis-respuesta a diversos agentes vasoconstrictores y al carbacol.

Parte II

Análisis experimental del papel del Ca^{2+} en las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio

1.- Caracterización de la contracturas inducidas por la fenilefrina.

Para analizar los posibles mecanismos que inducen el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ necesario para activar la contracción del músculo liso vascular se utilizó como modelo experimental la respuesta contráctil a la L-fenilefrina, (agonista selectivo de los receptores α_1), considerando que ésta activaría la contracción del músculo liso vascular sin inducir simultáneamente, en las células endoteliales, la liberación (mediada por receptores) de sustancias vasoactivas. Esta consideración se basó en los reportes que demostraron la ausencia de receptores adrenérgicos α_1 en el endotelio (Cocks, y col., 1983). Los posibles mecanismos

que inducen el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, se analizaron en experimentos en los cuales se determinaron los efectos sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina de diversos fármacos que bloquean en forma selectiva uno de dichos mecanismos. Los resultados de esta parte del estudio se utilizaron, además, como punto de referencia para la interpretación de los efectos producidos por estos mismos fármacos sobre la relajación inducida por el carbacol, la histamina y el ATP.

a.- Papel del influjo de Ca^{2+} :

Para analizar el papel del influjo de Ca^{2+} se realizaron los siguientes experimentos:

i).- Análisis de los efectos de la modificación de la $[Ca^{2+}]_e$ en el medio externo.

Se estudió el efecto de la modificación de la $[Ca^{2+}]_e$ (entre nominalmente 0 y 1.8 mM) sobre la magnitud y el curso temporal de la contractura inducida por fenilefrina.

ii).- Análisis de los efectos del Co^{2+}

Para analizar la posible participación del influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} se utilizó el Co^{2+} (3 mM), porque se ha reportado que a esta concentración dicho ión bloquea en forma reversible diferentes tipos de canales de Ca^{2+} en una gran variedad de tejidos, diferentes al endotelio (Hagiwara y col., 1967; Kohlhardt y col., 1973).

iii).- Análisis de los efectos del Ni^{2+}

Para analizar la posible participación de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje del tipo T en el influjo de Ca^{2+} , se utilizó el Ni^{2+} (180 y 360 μM). Se ha demostrado que el Ni^{2+} en concentraciones del orden micromolar, bloquea selectivamente los canales de Ca^{2+} del tipo T (Fox y col., 1987; Blacburn y col., 1990). A concentraciones mayores el Ni^{2+} bloquea, además, otros canales de Ca^{2+} tales como los del tipo L (Narahashi y col., 1985).

b.- Papel de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares.

La liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares puede llevarse a cabo por dos mecanismos: la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 y la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

Liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 .

Muchas moléculas extracelulares al unirse a sus receptores en la membrana, producen respuestas intracelulares al activar a la fosfolipasa C (PLC) (Rana y col., 1990; Majerus y col., 1992). La PLC activada cataliza la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) lo que genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol. El diacilglicerol es el activador fisiológico de la proteincinasa C (PKC), y el IP_3 induce la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. Esta bifurcación de la señal constituye la piedra angular de un mecanismo de transducción transmembranal que regula una gran cantidad de procesos celulares. El aislamiento directo de las proteínas y los estudios de clonación han revelado la existencia de múltiples isoenzimas de la PLC en los tejidos de mamíferos. Las diferentes formas de PLC parecen ser activadas por diferentes receptores y diferentes mecanismos, e interactuar diferentemente con mecanismos inhibitorios, tales como aquellos mediados por la proteincinasa dependiente de AMPc (PKA) y por la PKC.

Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

La capacidad del calcio para abrir canales de liberación en el retículo sarcoplásmico, vía *liberación de calcio inducida por calcio* (CICR), ha sido demostrada en el músculo esquelético en fibras desnudas (Ford y col., 1970; Endo y col., 1970), en vesículas de retículo sarcoplásmico (Miyamoto y col., 1982) y en canales de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico incorporados a bicapas celulares (Smith y col., 1986); en el músculo liso (Chen, y col., 1993, Khoji y col., 1993, Saiag y col., 1994); en el músculo cardíaco (Vites, y col., 1994) y en neuronas (Usachev y col., 1993).

En la siguiente serie de experimentos se realizaron maniobras diseñadas para analizar el papel de los diferentes mecanismos que pueden liberar Ca^{2+} desde depósitos intracelulares en el desarrollo de tensión inducido por la

fenilefrina. Para este fin, se utilizaron como herramientas experimentales dos fármacos, la neomicina y la procaina que inhiben respectivamente la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 y la mediada por Ca^{2+}

i).- Análisis de los efectos de la neomicina.

Para analizar el posible papel de la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 se utilizó la neomicina (5 mM). Se ha demostrado que este fármaco inhibe a la fosfolipasa C (PLC) y por lo tanto, al bloquear la formación de IP_3 , impide indirectamente la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 (Balda y col., 1991; Suyama y col., 1994; Hamada y col., 1993).

La neomicina fue aplicada de acuerdo con los siguientes protocolos: i): 10 min antes de la aplicación de la fenilefrina en solución de Tyrode con 1.8 mM de Ca^{2+} , ii): 10 min antes de la aplicación de la fenilefrina en una solución de Tyrode nominalmente sin Ca^{2+} y iii): durante el desarrollo de la contractura inducida por la fenilefrina.

ii).- Análisis de los efectos de la procaina.

En esta serie de experimentos se analizó la participación de la liberación de Ca^{2+} , inducida por Ca^{2+} . Para este fin se utilizó la procaina (1 mM). Se ha demostrado que este fármaco, es un bloqueador efectivo de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} al bloquear los canales de liberación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético (Oyamada y col., 1993; Takahashi, 1994; Sukhareva y col., 1994; D. Zacharova y col., 1993; Adachi y col., 1994), del músculo liso (Chen, y col., 1993, Khoi y col., 1993, Salag y col., 1994) y del músculo cardíaco (Vites, y col., 1994) y en neuronas (Usachev y col., 1993).

Se utilizaron los mismos protocolos de aplicación que para la neomicina.

2.- Análisis de las relajaciones dependientes del endotelio mediadas por los receptores a diversos agonistas.

Se ha reportado que las relajaciones dependientes del endotelio requieren de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular ((Peach y col., 1987). Sin embargo, no se ha aclarado el papel que juegan los diferentes mecanismos que pueden generar el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que es necesario para inducir la

síntesis/liberación del NO. Para analizar los posibles mecanismos que participan en dicho incremento de la $[Ca^{2+}]$, se realizó la siguiente serie de experimentos.

a.- Papel del influjo de Ca^{2+} .

i).- Análisis de los efectos de la modificación de la $[Ca^{2+}]$ en el medio externo.

Para analizar el papel del Ca^{2+} en el medio extracelular en las relajaciones inducidas por el carbacol, en los anillos precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M) se disminuyó progresivamente la concentración de dicho ión en la solución relajante una vez que la relajación había alcanzado su valor máximo.

ii).- Análisis de los efectos del Co^{2+} .

Para analizar el papel del influjo transmembranal de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} en las relajaciones dependientes del endotelio se utilizó el Co^{2+} (3 mM). Se estudió el efecto de este ión sobre las relajaciones inducidas por el carbacol (10^{-5} M), la histamina (10^{-3} M) o el ATP (10^{-4} M) en los anillos precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M) de acuerdo con los siguientes protocolos: *)- aplicación simultánea del Co^{2+} y el agonista relajante, **)- aplicación del Co^{2+} cuando la relajación inducida por el agonista había alcanzado aproximadamente el 50% de su valor máximo y ***)- aplicación del Co^{2+} cuando la relajación había alcanzado su valor máximo.

iii).- Análisis de los efectos del Ni^{2+} .

La posible participación de canales de Ca^{2+} del tipo T se analizó mediante la aplicación de Ni^{2+} (180 y 360 μ M) con los mismos protocolos utilizados con el Co^{2+} . El Ni^{2+} , a concentraciones del orden micromolar, es un bloqueador específico de ese tipo de canales.

b.- Papel de la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares.

i).- Análisis de los efectos de la neomicina.

Para analizar la posible participación de la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 en las relajaciones dependientes del endotelio, inducidas por el carbacol, la histamina o el ATP se utilizó la neomicina (5 mM). Los efectos de este bloqueador se estudiaron de acuerdo con los siguientes protocolos *) aplicación de la

neomicina cuando la relajación inducida por el agonista había alcanzado a su valor máximo; **) aplicación simultánea del agonista relajante y de la neomicina y ***) Aplicación del agonista relajante en presencia de la neomicina.

ii).- Análisis de los efectos de la procaína.

Para analizar la participación de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , en las relajaciones dependientes del endotelio inducidas por el carbacol, la histamina o el ATP, se estudió el efecto de la procaína sobre dichas relajaciones. La procaína fue aplicada con el mismo protocolo utilizado con la neomicina.

Parte III

Análisis de la participación de factores hormonales en la modulación del tono vascular dependiente del endotelio.

En esta parte del estudio se analizaron los efectos del tratamiento estrógeno, crónico, o agudo, sobre las curvas dosis respuesta a la fenilefrina y al carbacol, en anillos aórticos provenientes de ratas ovariectomizadas.

En cada experimento se registró inicialmente la respuesta contráctil de los anillos a dosis acumulativas crecientes del agonista adrenérgico α_1 (curva dosis respuesta a la fenilefrina), una vez que el desarrollo de tensión en respuesta a la concentración más alta de fenilefrina había alcanzado su valor máximo, se cambiaba la solución de perfusión por una que además de fenilefrina, contenía dosis crecientes (10^{-9} - 10^{-5} M) de carbacol (curva dosis respuesta al carbacol).

1.- Análisis de los efectos de la exposición crónica a los estrógenos sobre las respuestas contráctiles inducidas por la fenilefrina y al carbacol.

En esta serie de experimentos se determinaron las dos curvas dosis respuesta sucesivas a la fenilefrina y al carbacol (10^{-9} - 10^{-5} M, en ambos casos), tanto en ausencia como en presencia del inhibidor de la ciclooxigenasa, la indometacina (10^{-5} M), en anillos extraídos de ratas del grupo de animales tratados o del grupo de animales no tratados (n=6 para cada grupo).

2.- Análisis de los efectos de la exposición aguda a los estrógenos sobre las respuestas contráctiles inducidas por la fenilefrina y al carbacol.

En esta serie de experimentos se obtuvieron curvas dosis respuesta a la fenilefrina y al carbacol, en la presencia de indometacina (10^{-5} M), en vasos extraídos de animales no tratados, tanto antes como después (40-60 min.) de la adición de 17β -estradiol (10^{-9} M) a la solución de perfusión.

En ambas series de experimentos las curvas dosis respuesta también fueron obtenidas en la presencia tanto de indometacina como del inhibidor competitivo de la sintasa del óxido nítrico, el metil éster de la ω -nitro-L-arginina (L-NAME, 300 μ M; n=6 para la primera serie de experimentos y 4 para la segunda serie).

RESULTADOS

Parte I

Caracterización de las respuestas vasomotoras inducidas por diversos agonistas.

Efectos de la noradrenalina

En los anillos aórticos con endotelio intacto, así como en aquellos donde había sido removido mecánicamente el endotelio, la noradrenalina (NA), produjo un desarrollo de tensión, cuya magnitud era dependiente de la dosis. Se observó que en los anillos sin endotelio, la curva dosis respuesta a dosis crecientes acumulativas (3×10^{-9} - 10^{-6} M) era desplazada significativamente ($p < 0.05$), hacia la izquierda en relación a la curva correspondiente de los anillos con endotelio (Fig. 1). El PD_2 fue de 8.19 ± 0.10 ($n=8$) en preparaciones sin endotelio y de 7.65 ± 0.08 ($n=8$) en preparaciones con endotelio intacto. Esta diferencia se explica por la presencia de receptores α_2 en el endotelio cuya activación induce la liberación del NO. La tensión máxima desarrollada por los anillos sin endotelio siempre fue mayor que la desarrollada por los anillos con endotelio. La indometacina (10^{-5} M), no alteró las respuestas a la NA de los anillos con o sin endotelio.

Efectos de la fenilefrina

La fenilefrina produjo un desarrollo de tensión dependiente de la dosis, similar a aquel producido por la noradrenalina (Fig. 2). Sin embargo, aunque la curva dosis respuesta a la fenilefrina de los anillos sin endotelio también está desplazada significativamente ($p < 0.05$) hacia la izquierda, con respecto a la de los anillos con endotelio, no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en la tensión máxima (aproximadamente 2-3 g) desarrollada por ambos grupos de anillos. El PD_2 fue de 7.70 ± 0.04 , ($n=10$) para las preparaciones con endotelio y 8.07 ± 0.01 ($n=10$) para las preparaciones sin endotelio. La indometacina (10^{-5} M) no alteró las respuestas a la fenilefrina de las preparaciones con o sin endotelio.

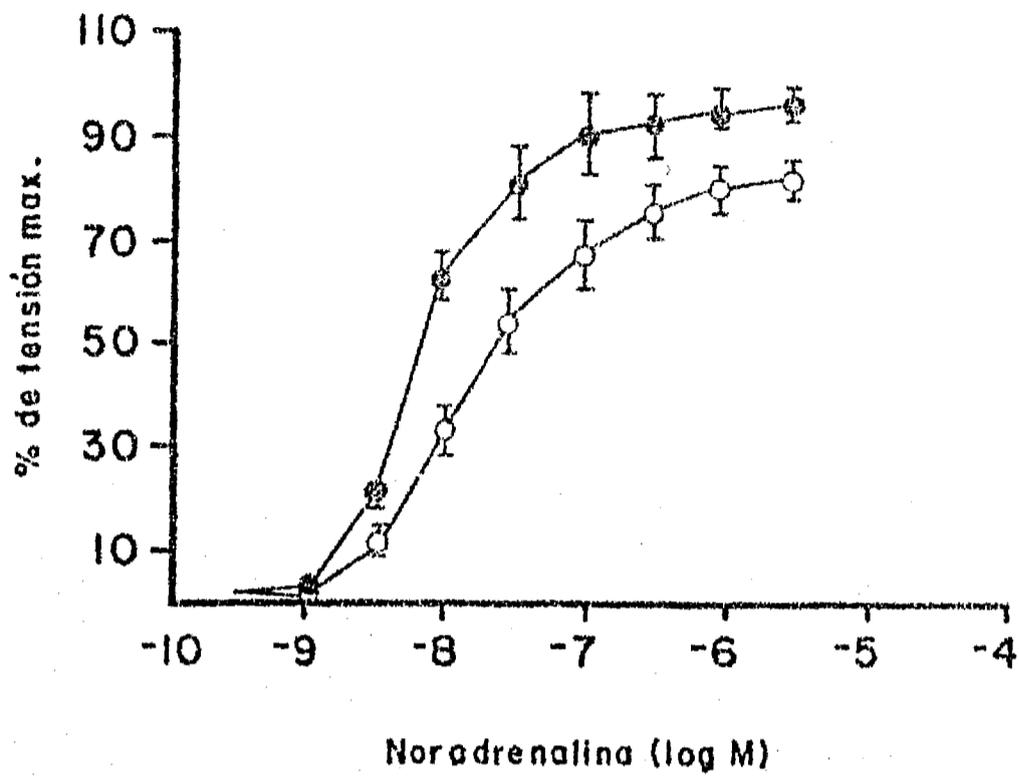


Figura 1.- Curva dosis respuesta a la noradrenalina (NA) (3×10^{-9} - 3×10^{-5} M) de anillos aórticos con (○) y sin endotelio (●). Los datos son expresados como el porcentaje de la tensión máxima desarrollada en respuesta a la NA a la concentración de 3×10^{-6} M por los anillos sin endotelio. Cada punto representa la media \pm E.S., n= 8.

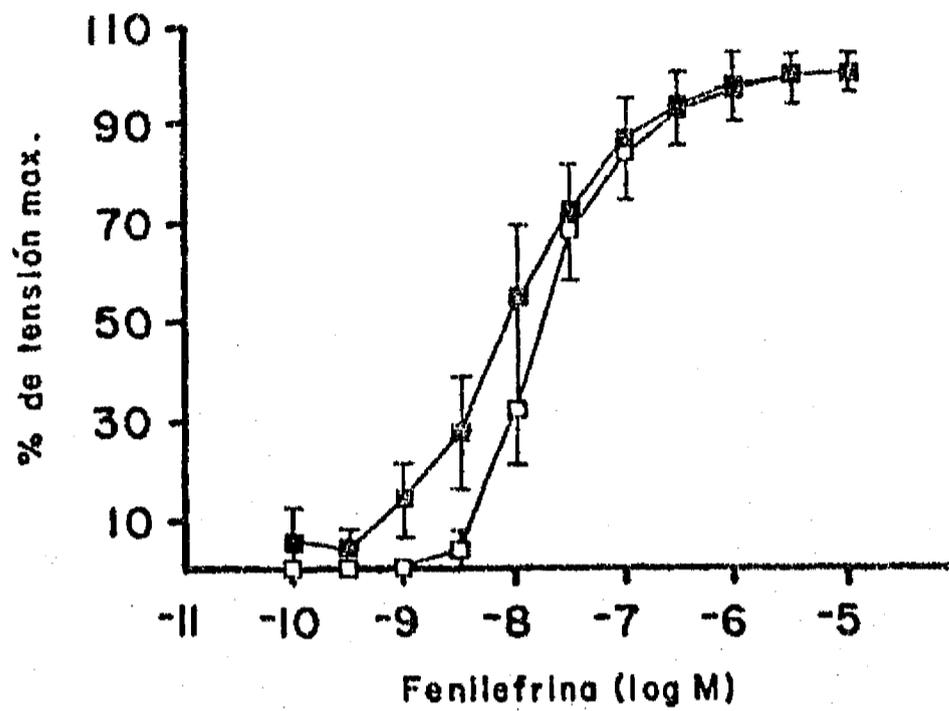


Figura 2.- Curva dosis respuesta a la fenilefrina (10^{-10} - 3×10^{-5} M) en anillos aórticos con (□) y sin endotelio (■). Los datos son expresados como el porcentaje de la tensión máxima desarrollada por los anillos sin endotelio en respuesta a la fenilefrina a una concentración de 3×10^{-5} M. Cada punto representa la media \pm E.S., n=10.

En el desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina se pudieron identificar, generalmente, dos fases. Durante la primera fase el incremento de la tensión fue rápido, de tal manera que en un período breve (5 - 10 seg) se desarrolló de 60 a 80 % del total de la tensión inducida por una determinada dosis de fenilefrina. Durante la segunda, la tensión siguió aumentando lentamente hasta alcanzar el valor máximo para la dosis correspondiente (Fig. 3). En algunos casos esta fase duró hasta 15 min. y una vez alcanzada la tensión máxima, ésta permaneció estable mientras estuviera presente el agonista (hasta por varias horas). Por otra parte, cuando se suspendió la exposición al agonista y se lavó la preparación en solución de Tyrode se observó una relajación lenta hasta el valor de la tensión basal. Cuando después del lavado con solución de Tyrode, durante un período de por lo menos 30 min., se expuso la preparación otra vez a la fenilefrina ésta indujo una respuesta contráctil muy similar en curso temporal y magnitud, a la observada previamente. Este comportamiento se repetía con cada exposición (y subsecuente lavado) a la fenilefrina (Fig. 16A).

Efectos del carbacol

En los anillos con endotelio contraídos previamente con fenilefrina, el carbacol produjo una respuesta relajante, cuya magnitud fue dependiente tanto del grado de integridad funcional del endotelio, como de la concentración del agonista. En promedio, la relajación máxima observada fue del $95 \pm 0.33\%$ ($n=10$) de la tensión máxima producida por la fenilefrina. En las preparaciones a las cuales se les había lesionado el endotelio no se observó relajación alguna en respuesta al carbacol (Figura 3). La Figura 4 muestra las curvas dosis respuesta al carbacol en anillos con y sin endotelio precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M). El PD_2 , fue de 6.84 ± 0.16 ($n=10$). La relajación inducida por el carbacol era inhibida por la atropina, de una manera que dependía de la dosis.

La relajación inducida por el carbacol (10^{-5} M) en anillos con endotelio precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M) tuvo, generalmente, un curso temporal bifásico. Se inicia con una disminución rápida de la tensión, hasta un valor equivalente al 70 % de la tensión máxima inducida por la fenilefrina. Esta fase

inicial duró de 30 seg a 1 min. aproximadamente, y fue seguida por una disminución más lenta de la tensión hasta valores muy cercanos a los de la tensión basal. Esta última fase se completó en aproximadamente 2-5 min. y el anillo permanecía subsecuentemente relajado mientras duraba la exposición al carbacol (Fig. 3). Si el carbacol era retirado del medio, la preparación comenzaba a desarrollar nuevamente tensión, y al cabo de varios min (aproximadamente 2-5) ésta alcanzaba el nivel que tenía antes de la aplicación de dicho fármaco.

En la Figura 16A se puede observar que la relajación inducida por el carbacol es muy reproducible cuando después de un período de lavado en solución de Tyrode de por lo menos 30 min., se induce nuevamente una contractura con fenilefrina.

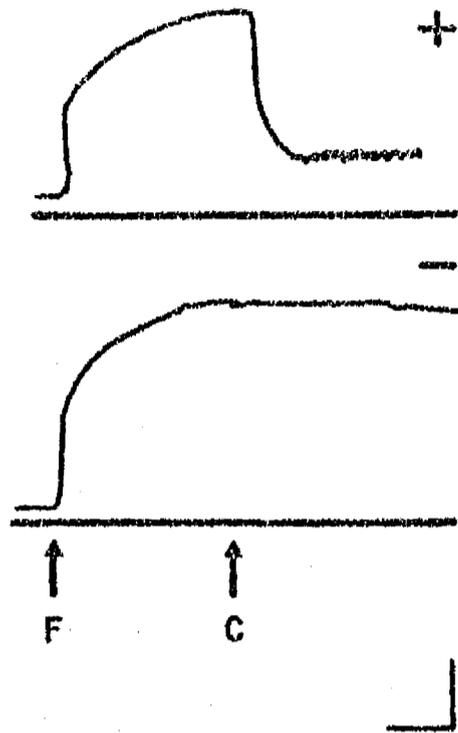


Figura 3 Efectos de la fenilefrina (F) (10^{-5} M) y del carbacol (C) (10^{-5} M) en anillos aórticos con (+) y sin (-) endotelio. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 10 experimentos.

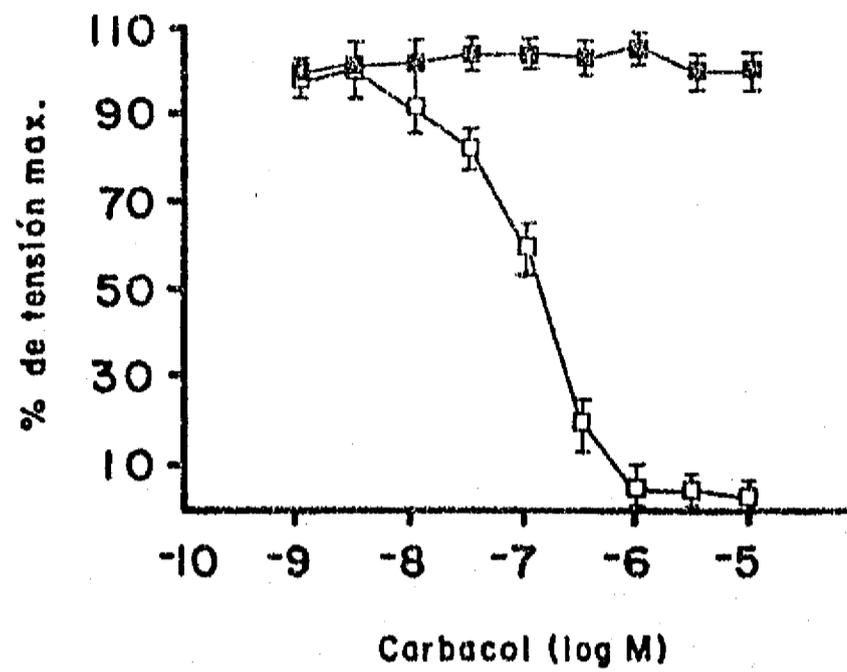


Figura 4.- Curva dosis respuesta al carbacol (10^{-9} M - 10^{-5} M) de anillos aórticos con (□) y sin endotelio (●), contraídos previamente con fenilefrina (10^{-5} M). Los datos son expresados como el porcentaje de la disminución de la tensión máxima desarrollada en respuesta a la fenilefrina, cada punto representa la media \pm E.S., n=10.

Efectos de la histamina y del ATP

La histamina y el ATP también tuvieron un efecto relajante en los anillos con endotelio contraídos previamente con diferentes vasoconstrictores. La magnitud de tal relajación dependía tanto del grado de integridad funcional del endotelio como de la dosis del agonista (resultados no mostrados). La relajación máxima en respuesta a la histamina se observó con una concentración de 10^{-3} M, mientras que la relajación máxima en respuesta al ATP se produjo con una concentración 10^{-4} M.

La relajación inducida por la histamina, a diferencia de aquella inducida por el carbacol, sólo alcanzó, como máximo, entre el 50 y el 80 % de la tensión máxima desarrollada en respuesta al vasoconstrictor aplicado. Además, la relajación fue transitoria, de tal manera que al cabo de varios minutos (2 - 5) la tensión regresaba nuevamente al valor máximo.

La relajación inducida por el ATP (10^{-4} M) en los anillos con endotelio, alcanzó como regla general, el 100 % de la tensión máxima desarrollada en respuesta al vasoconstrictor aplicado, y, en contraste con el carácter transitorio de la relajación observada con la histamina, se mantenía mientras estuviera presente el agonista. En las preparaciones sin endotelio, el ATP producía una relajación cuya amplitud no sobrepasaba el 30 % de la tensión máxima desarrollada en respuesta al vasoconstrictor aplicado. Los trazos superiores de la Figura 5 ilustran las relajaciones inducidas por el carbacol, la histamina y el ATP en un mismo anillo con endotelio precontraído con fenilefrina (10^{-5} M).

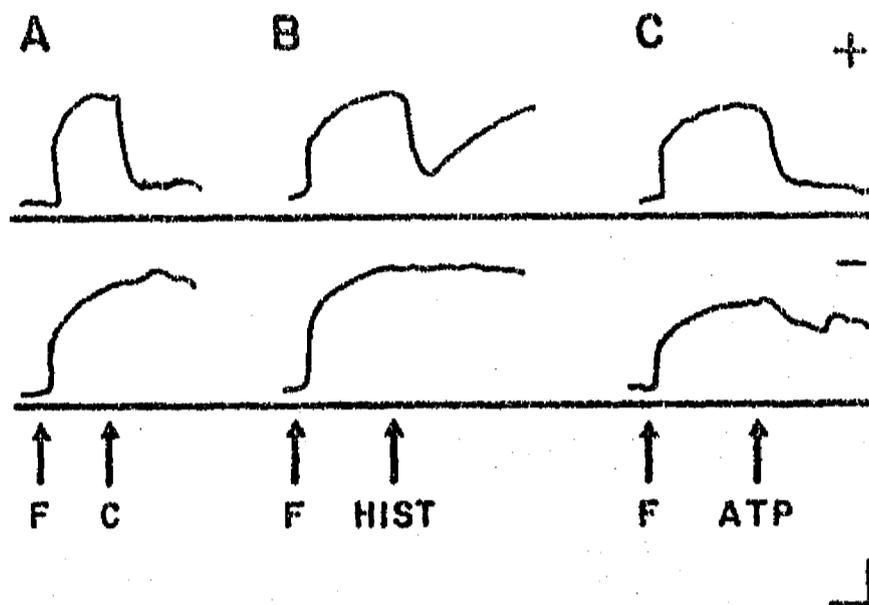


Figura 5.- Respuestas relajantes inducidas por el carbacol (A, 10^{-5} M), la histamina (B, 10^{-3} M), y el ATP (C, 10^{-4} M), en anillos aórticos con endotelio (+) y sin (-) endotelio, contraídos previamente con fenilefrina (10^{-5} M). Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbacol; hist, histamina; ATP, trifosfato sódico de adenosina. Calibración: vertical, 571 mg ; horizontal, 2 min.

Efectos del nitroprusiato de sodio

El nitroprusiato de sodio (NP) produjo una respuesta relajante dependiente de la dosis en los anillos con o sin endotelio contraídos previamente con diferentes vasoconstrictores. La curva dosis respuesta al NP (10^{-9} - 10^{-5} M) de los anillos sin endotelio se encontró desplazada hacia la derecha de la de los anillos con endotelio (resultados no mostrados). El PD_2 fue de 7.76 ± 11 (n=8) para los anillos sin endotelio y de 8.61 ± 18 (n=8) para los anillos con endotelio. La magnitud de la relajación de los anillos sin endotelio en respuesta a las concentraciones más elevadas de NP fue muy variable. En los anillos con endotelio la relajación inducida con la concentración de 10^{-6} M fue del 100 % mientras que, en las preparaciones sin endotelio alcanzaba en promedio el 80 % de la tensión máxima desarrollada en respuesta al vasoconstrictor aplicado.

Efectos de la hemoglobina

La hemoglobina (Hb) (10^{-7} M) causó inhibición de las respuestas relajantes dependientes del endotelio atribuidas a la liberación del NO. La adición de Hb a la solución de Tyrode, generó en los anillos con endotelio íntegro, un desarrollo de tensión equivalente a aproximadamente el 15% de la tensión máxima desarrollada por dichos anillos en respuesta a la fenilefrina (10^{-5} M). En las preparaciones con endotelio la Hb desplazó la curva dosis respuesta a la NA, o a la serotonina (5-HT), hacia la izquierda e incrementó la tensión máxima, de tal manera que las respuestas contráctiles se asemejaban a aquellas de las preparaciones sin endotelio (no ilustrado). Cuando la Hb era aplicada durante una contractura inducida por NA o por 5-HT, los anillos con endotelio desarrollaban aproximadamente un 20 % de tensión adicional (no ilustrado). Por otra parte, la Hb sólo produjo un desplazamiento no significativo, hacia la izquierda de la curva dosis respuesta a la fenilefrina, en los anillos aórticos con endotelio (Fig. 6). En presencia de Hb los anillos con endotelio precontraídos con NA, 5-HT o fenilefrina respondieron al carbacol con una relajación, de magnitud mucho menor que la observada en ausencia de Hb ($10 \pm 1.4\%$ n=10 de la tensión máxima desarrollada en respuesta a los diferentes vasoconstrictores). Los efectos

inhibitorios de la hemoglobina sobre las respuestas dependientes del endotelio eran reversibles y después de 30 min de lavado de la preparación en solución de Tyrode, la recuperación era completa (resultados no mostrados).

Efectos del azul de metileno.

La adición de azul de metileno (10^{-7} M) a la solución de Tyrode produjo en los anillos con endotelio un desarrollo de tensión equivalente al 20 ± 2.9 % ($n=8$) de la tensión máxima desarrollada por los anillos sin endotelio en respuesta a la noradrenalina (10^{-5} M). El azul de metileno produjo en los anillos con endotelio un desplazamiento hacia la izquierda de la curva dosis respuesta a la NA y a la 5-HT. En los anillos con endotelio contraídos previamente con NA (10^{-5} M) o 5-HT (10^{-5} M) el azul de metileno indujo un desarrollo de tensión adicional del 34.3 ± 6.2 % ($n=8$) de la tensión máxima desarrollada en respuesta a dichos vasoconstrictores. En presencia de azul de metileno se inhibió casi por completo la relajación inducida por el carbacol en los anillos con endotelio. Los efectos del azul de metileno fueron esencialmente irreversibles ya que persistieron aún después de períodos prolongados de lavado con solución de Tyrode (resultados no mostrados).

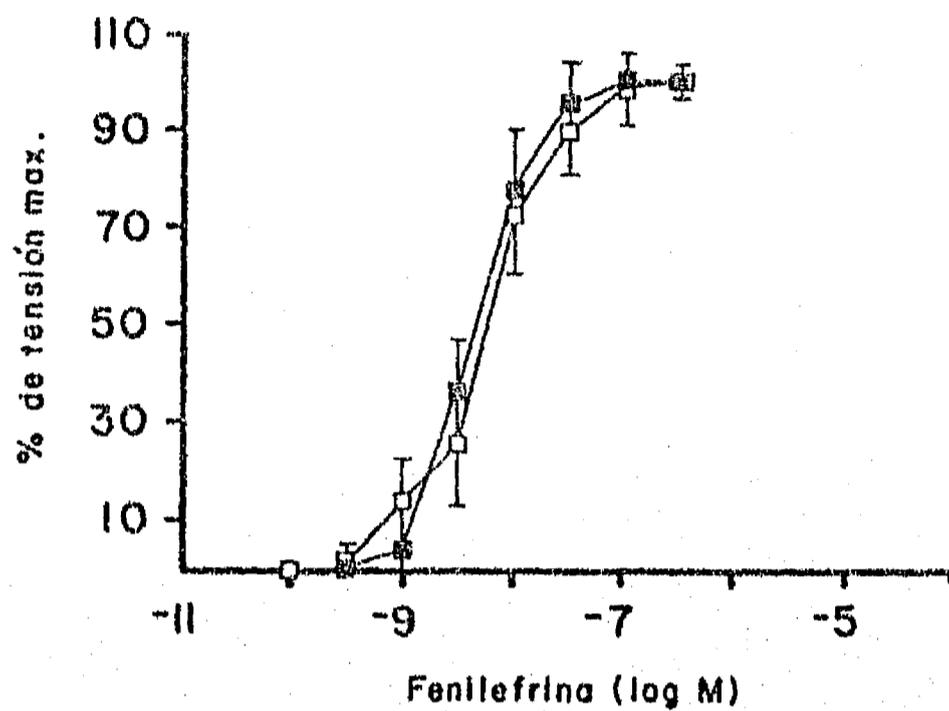


Figura 6.- Efectos de la hemoglobina (Hb) (10^{-5} M) sobre la curva dosis respuesta a la fenilefrina (10^{-10} - 10^{-5} M) de anillos aórticos con endotelio (■) y sin endotelio (□). Los datos son expresados como el porcentaje de la tensión máxima desarrollada en respuesta a la fenilefrina a una concentración de 10^{-5} M por los anillos sin endotelio. Cada punto representa la media \pm E.S., $n=10$.

Parte II

Análisis experimental del papel del Ca^{2+} en las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio.

1.- Análisis del posible origen del Ca^{2+} en las contracturas inducidas por la fenilefrina.

Papel del influjo de Ca^{2+}

a).- Efectos de la modificación de la concentración extracelular de Ca^{2+} .

Como se ilustra en la Figura 7, la modificación de la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular (entre nominalmente 0 y 1.8 mM), modificó tanto la magnitud como el curso temporal de la respuesta contráctil a la fenilefrina. Además, se observó una gradual disociación de las dos fases del desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina. Esta disociación se hacía más aparente a medida que disminuía más la concentración extracelular de este ión. Al eliminar "nominalmente" el Ca^{2+} del medio, sólo se observó el componente inicial transitorio del desarrollo de tensión (véase también Figuras 10, 11, y 12). Tal efecto inhibitorio fue revertido cuando se reincorporó el Ca^{2+} a las soluciones de perfusión.

b).- Efectos del bloqueo de los canales de Ca^{2+}

Los resultados descritos en el inciso previo mostraron que tanto el desarrollo como el mantenimiento de la tensión inducida por la fenilefrina dependían de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular. Estos hallazgos sugieren que un influjo de Ca^{2+} a través de la membrana citoplásmica participa de manera importante en las contracturas inducidas por la fenilefrina.

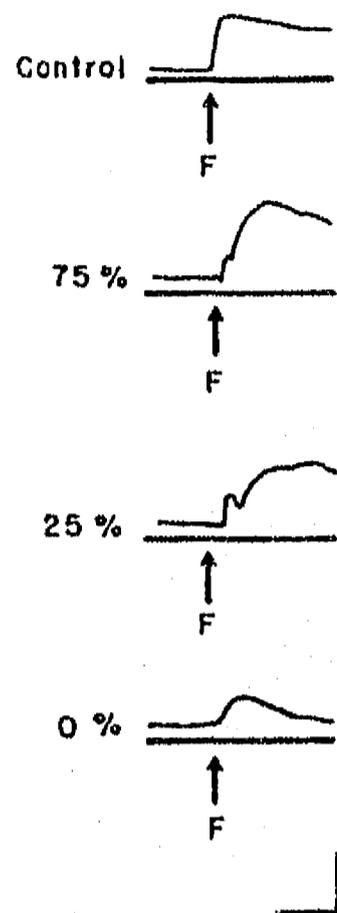


Figura 7.- Efectos de la modificación de la concentración extracelular de calcio sobre el desarrollo de tensión inducido por fenilefrina (10^{-5} M) en un anillo aórtico con endotelio. A la izquierda se indica el porcentaje de la concentración de Ca^{2+} en el medio de perfusión en relación a la concentración de Ca^{2+} en el control (1.8 mM). Las flechas indican el momento en que se aplicó la fenilefrina (F). Calibración: vertical, 1142 mg; horizontal, 2 min.

i).- Efectos del Co^{2+}

La adición de Co^{2+} (3 mM) a la solución de Tyrode produjo en las preparaciones con endotelio un desarrollo de tensión equivalente a aproximadamente el 15 % de la tensión máxima desarrollada en respuesta a la fenilefrina. Por otro lado, se observó (tanto en los anillos con endotelio como en los anillos sin endotelio) que en presencia de Co^{2+} (3 mM) la fenilefrina (10^{-5} M), sólo indujo un desarrollo transitorio de tensión, similar a aquel producido por la fenilefrina en un medio sin Ca^{2+} (Fig. 8). La aplicación de Co^{2+} durante el desarrollo de la contractura inducida por la fenilefrina, produjo una relajación lenta hasta el nivel de la tensión basal que no depende de la presencia del endotelio (véase Figura 14C). Estos efectos del Co^{2+} fueron revertidos después de un período de lavado de 30 min aproximadamente.

ii).- Efectos del Ni^{2+} :

La respuesta contráctil a la fenilefrina no se modificó por la presencia de Ni^{2+} a concentraciones de 180 y 360 μM . Por otra parte, a concentraciones de 3 y 5 mM, el Ni^{2+} tuvo efectos similares a aquellos observados en presencia de Co^{2+} (3 mM) (resultados no mostrados).

Papel de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares

En la siguiente serie de experimentos se realizaron maniobras diseñadas para analizar el papel de los diferentes mecanismos que pueden liberar Ca^{2+} desde depósitos intracelulares en el desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina. Para este fin, se utilizaron como herramientas experimentales dos fármacos, la neomicina y la procaína que inhiben respectivamente la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 y la mediada por Ca^{2+} .

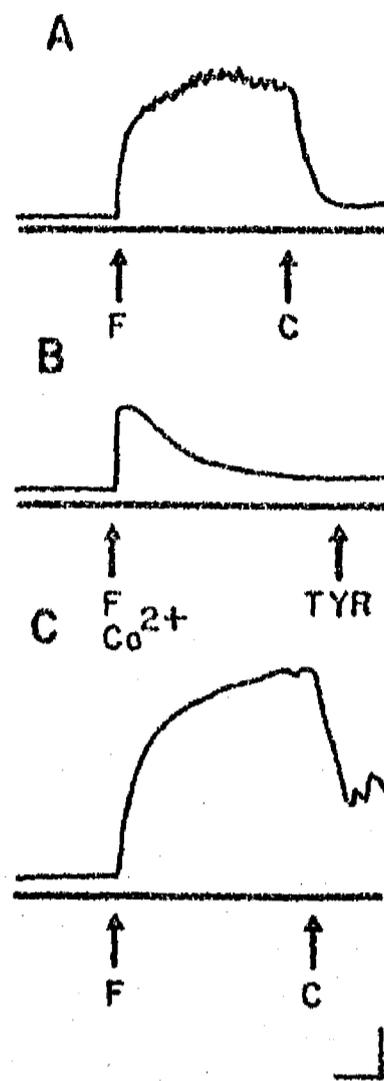


Figura 8.- Efectos del Co^{2+} (3 mM) sobre el desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina (10^{-5} M) en un anillo con endotelio. A).- Control, B).- Respuesta a la fenilefrina en presencia del Co^{2+} . C).- Recuperación después de lavado prolongado con solución de Tyrode. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos. F, fenilefrina; C, carbacol; TYR, Tyrode. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal 2 min. Los registros ilustrados son un ejemplo representativo de 4 experimentos.

a).- Efectos de la neomicina:

Cuando la neomicina fue aplicada durante la fase tónica de la contractura, se produjo una relajación de aproximadamente el 70 %, de la tensión máxima desarrollada, la cual no fue dependiente de la presencia del endotelio y persistió mientras estuviera presente este fármaco (véase Figura 21); al retirar la neomicina de las soluciones de perfusión, las preparaciones desarrollaban nuevamente tensión hasta el nivel previo a su adición (Fig. 9). En presencia de neomicina (5 mM) la fenilefrina (10^{-5} M), produjo un desarrollo de tensión sostenido, cuya magnitud alcanzaba sólo aproximadamente el 80 % de la tensión máxima alcanzada en ausencia de neomicina (véase Figura 22). El desarrollo transitorio de tensión inducido por la fenilefrina, en ausencia de Ca^{2+} externo, fue inhibido importantemente por la neomicina (5 mM), (Fig. 10). Estos efectos fueron revertidos después de un período de lavado de 30 min.

b).- Efectos de la procaína

La procaína (1 mM) no produjo efectos significativos sobre la contractura inducida por la fenilefrina (10^{-5} M) cuando se adicionaba a las soluciones de perfusión antes (10 min) de la aplicación del agonista. Sin embargo, en algunas preparaciones con o sin endotelio, cuando la procaína era aplicada durante la fase sostenida de la contractura inducida por la fenilefrina, se observó una relajación equivalente a aproximadamente el 30% de la tensión desarrollada. Esta relajación no fue sostenida sino que presentaba oscilaciones. Estos efectos fueron revertidos al retirar el fármaco del medio. Por otro lado, la procaína inhibió parcialmente el desarrollo transitorio de tensión inducido por la fenilefrina en ausencia de Ca^{2+} (Fig. 11). Esta inhibición fue revertida después de un período de lavado de 30 min.

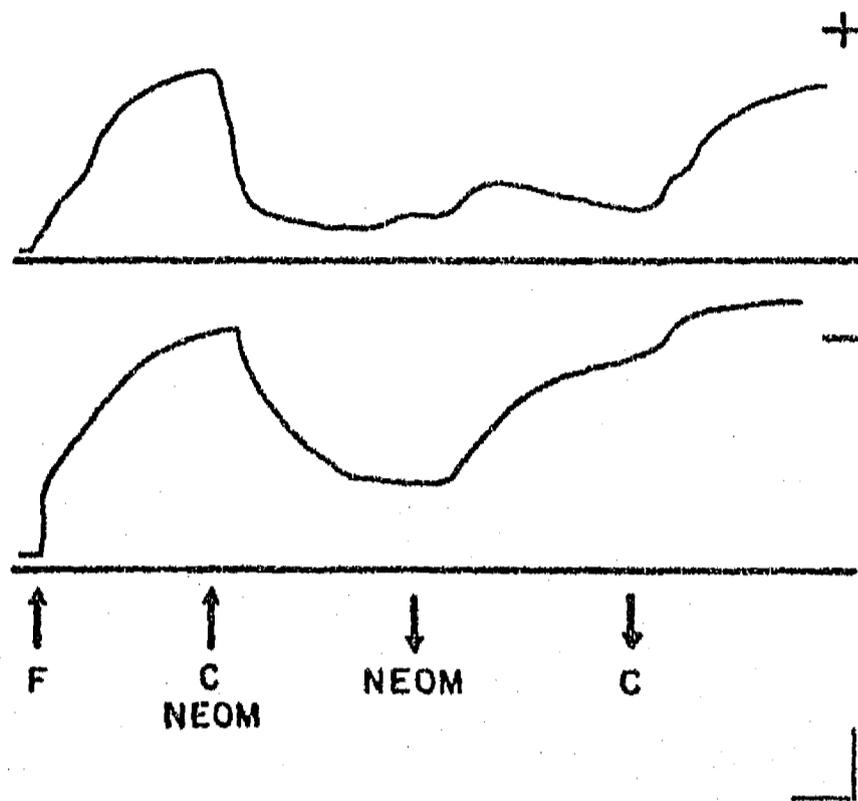


Figura 9.- Efectos de la neomicina (NEOM) (10^{-5} M) y el carbacol (C) (10^{-5} M) sobre el desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina (F) (10^{-5} M) en anillos de aorta con (+) y sin (-) endotelio. Las flechas hacia arriba indican el momento en que fueron aplicados los fármacos y las flechas invertidas indican el momento en que fueron retirados del medio. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros ilustrados son un ejemplo representativo de 4 experimentos.

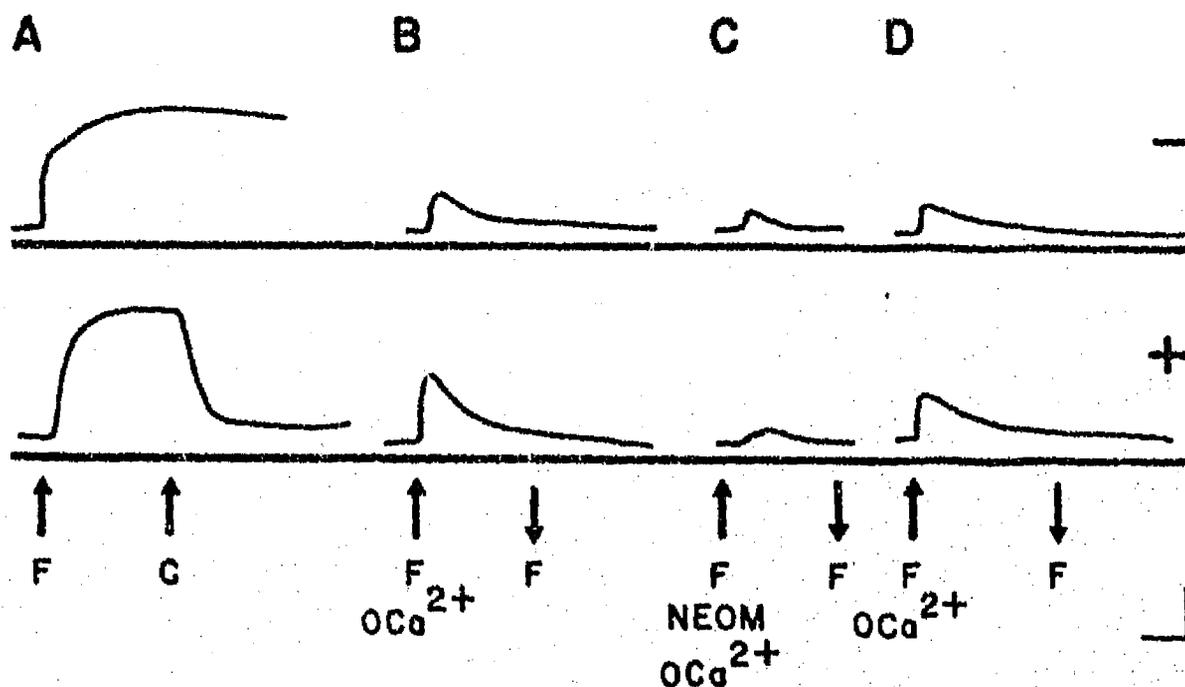


Figura 10.- Efectos de la neomicina (5 mM) sobre el desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina (10^{-5} M) en un medio sin Ca^{2+} en anillos con (+) y sin (-) endotelio. A) efectos producidos por la fenilefrina (10^{-5} M) y el carbacol (10^{-5} M) en presencia de Ca^{2+} en la solución de Tyrode. B) desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina en una solución de Tyrode sin Ca^{2+} , C) respuesta a la fenilefrina en presencia de neomicina, en un medio sin Ca^{2+} y D) desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina en un medio sin Ca^{2+} después de retirar la neomicina. Las flechas hacia arriba indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbacol; neom, neomicina. Las flechas invertidas indican el momento en que se retiraron los fármacos. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal 2 min. Registro representativo de 4 experimentos.

c).- Efectos de la aplicación simultánea de neomicina y procaína.

La adición simultánea de neomicina (5 mM) y procaína (1 mM) abolió en los anillos con endotelio y sin endotelio la respuesta contráctil transitoria inducida por la fenilefrina (10^{-5} M) en ausencia de Ca^{2+} . Después de eliminar la neomicina y la procaína del medio y lavar durante un período de 30 min con una solución de Tyrode con Ca^{2+} , la respuesta contráctil transitoria a la fenilefrina en ausencia de Ca^{2+} , se recuperó (Fig. 12).

2.- Análisis de las relajaciones dependientes del endotelio mediadas por los receptores a diversos agonistas.

Con el fin de analizar el papel de los posibles mecanismos que contribuyen al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ necesario para la síntesis del NO en las células endoteliales, se realizó la siguiente serie de experimentos. En éstos, se analizó, por una parte, el papel del influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, y por la otra el papel de la liberación de Ca^{2+} inducida por el IP_3 , o por la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

Papel del influjo de Ca^{2+}

a).- Efectos de la modificación en la concentración extracelular de Ca^{2+} cuando la relajación inducida por el carbacol había alcanzado su valor máximo la reducción gradual en la concentración de Ca^{2+} en el medio externo produjo una inhibición de dicha relajación. Esta inhibición fue tanto mayor cuanto menor fue la concentración del Ca^{2+} externo (Fig. 13). Estos efectos fueron revertidos al incrementar la $[Ca^{2+}]$ del medio externo a su valor previo.

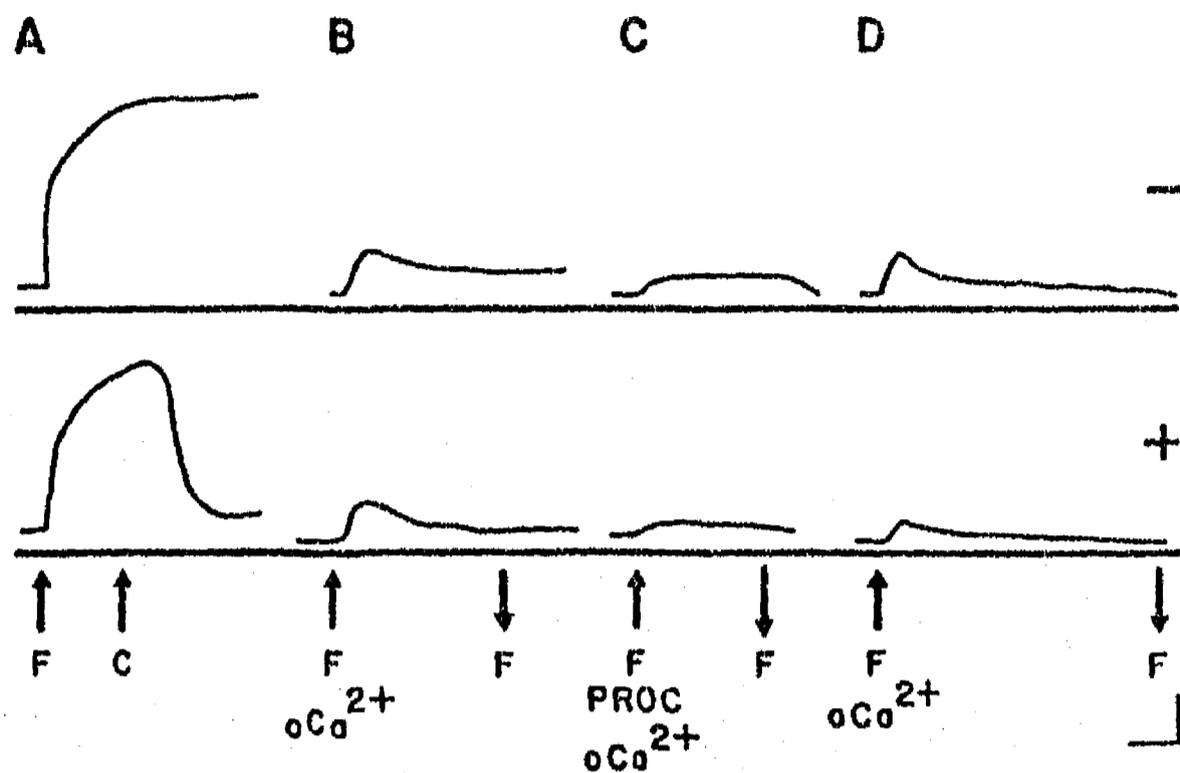


Figura 11.- Efectos de la procaína (1 mM) sobre el desarrollo de tensión inducido por fenilefrina (10^{-5} M) en anillos aórticos con (+) y sin (-) endotelio, en un medio sin Ca^{2+} . A) Efectos de la fenilefrina (10^{-5} M) y del carbacol (10^{-5} M), en una solución de Tyrode normal, B) desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina en una solución de Tyrode sin Ca^{2+} , C) aplicación de la fenilefrina en presencia de procaína, en un medio sin Ca^{2+} y D) desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina en un medio sin Ca^{2+} después de retirar la procaína. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbacol. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

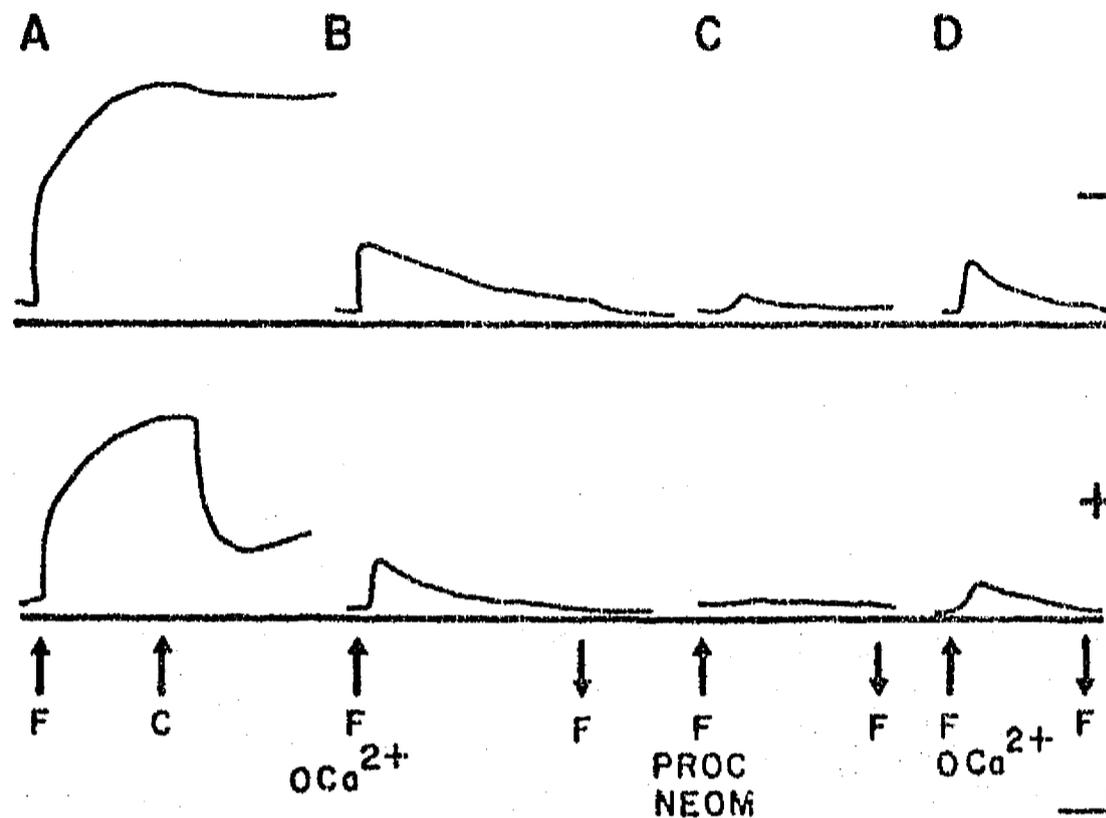


Figura 12.- Efectos de la aplicación conjunta de la procaína (1 mM) y de la neomicina (5 mM) sobre el desarrollo de tensión inducido por fenilefrina (10^{-5} M) en anillos con (+) y sin (-) endotelio, en un medio sin Ca^{2+} . A) efectos de la fenilefrina y del carbacol (10^{-5} M) en una solución de Tyrode normal. B) desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina en una solución de Tyrode sin Ca^{2+} C).- aplicación de la fenilefrina en presencia de procaína y de neomicina en un medio sin Ca^{2+} , D) desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina en un medio sin Ca^{2+} después de retirar la procaína y la neomicina. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbacol; PROC, procaína; NEOM, neomicina. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Registro representativo de 4 experimentos (n=4).

b) - Efectos del Co^{2+} :

Para analizar el posible papel de los canales de Ca^{2+} en la relajación dependiente del endotelio, se analizaron los efectos del Co^{2+} (3 mM) sobre este proceso. La aplicación de Co^{2+} cuando la relajación inducida por el carbacol (10^{-5} M) en los anillos con endotelio había alcanzado su valor máximo, produjo un desarrollo transitorio de tensión, cuya amplitud fue similar a la tensión máxima inducida por la fenilefrina (10^{-5} M) (Fig. 14B). La adición de Co^{2+} durante la fase sostenida de la contractura inducida por la fenilefrina, produjo una relajación lenta (Fig. 14C). La aplicación de carbacol cuando la relajación inducida por el Co^{2+} había alcanzado aproximadamente el 50%, no produjo cambio alguno ni en la magnitud ni en el curso temporal de dicha relajación (Fig. 15B).

Por otro lado, se observó que los anillos con endotelio que habían sido expuestos previamente al Co^{2+} presentaban una disminución marcada de la respuesta relajante al carbacol. Este efecto inhibitorio residual del Co^{2+} fue muy duradero, y sólo revertió parcialmente después de períodos muy prolongados (más de 2 horas) de lavado (Fig. 16C).

La aplicación de Co^{2+} durante la relajación máxima inducida por la histamina (10^{-3} M) produjo un desarrollo transitorio de tensión similar a aquél observado cuando el Co^{2+} fue aplicado durante las relajaciones inducidas por el carbacol (Fig. 17). En los anillos con endotelio que habían sido expuestos previamente al Co^{2+} se observó una inhibición muy duradera (de varias horas) de la respuesta relajante a la histamina, tal y como se describió para la relajación inducida por el carbacol. Por otra parte, el Co^{2+} no tuvo efectos significativos sobre las relajaciones inducidas por el ATP (Fig. 18).

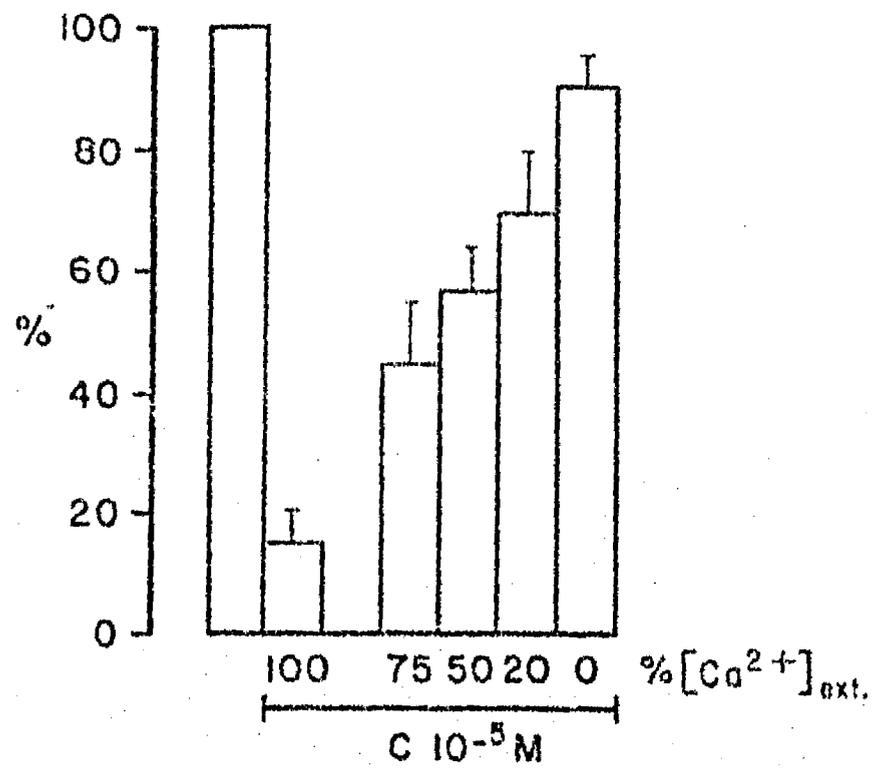


Figura 13.- Efectos de la modificación de la concentración de calcio en el medio extracelular sobre la relajación inducida por el carbacol (C, 10^{-5} M), en anillos aórticos con endotelio, contraídos previamente con fenilefrina (10^{-5} M). Las ordenadas representan el porcentaje de la tensión máxima desarrollada y las abscisas representan el porcentaje de la concentración extracelular de calcio en relación a su concentración en la solución de Tyrode (1.8 mM). Los datos representan la media \pm E.S., n=4.

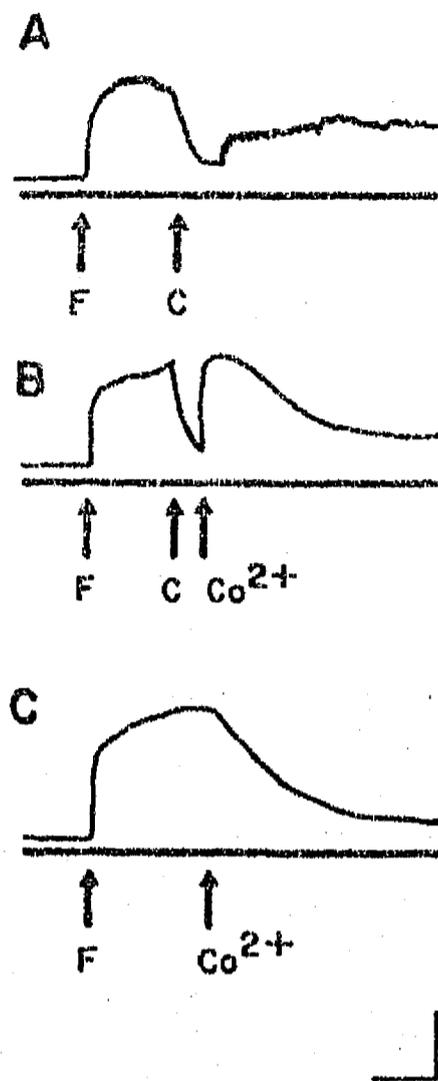


Figura 14.- Efectos del Co^{2+} (3 mM) sobre la relajación inducida por el carbacol (10^{-5} M) en un anillo con endotelio contraído previamente con fenilefrina (10^{-5} M). A) control, B) efectos del Co^{2+} sobre la relajación inducida por el carbacol. y C) efectos del Co^{2+} sobre el desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbacol. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

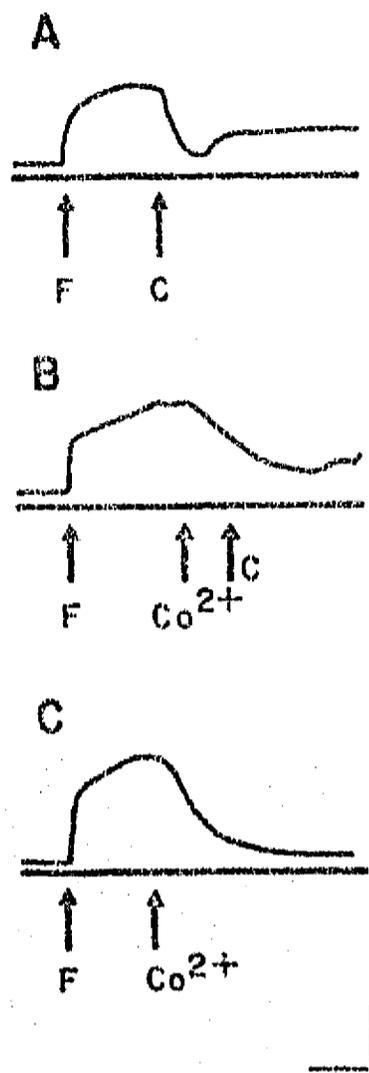


Figura 15.- Ausencia de efectos del carbacol (10^{-5} M) sobre la relajación inducida por Co^{2+} (3 mM) en un anillo con endotelio contraído previamente con fenilefrina (10^{-5} M). A) Efectos de la fenilefrina (10^{-5} M) y del carbacol (10^{-5} M) en solución de Tyrode B) aplicación del carbacol cuando la relajación inducida por el Co^{2+} alcanzó el 50 % de la tensión máxima. C) Aplicación de Co^{2+} durante la contractura inducida por la fenilefrina. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbacol. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Registros representativos de 4 experimentos.

La aplicación de Co^{2+} (3 mM) durante la relajación máxima inducida por el nitroprusiato de sodio (10^{-7} M), produjo un desarrollo transitorio de tensión similar al observado cuando se aplicó durante la relajación inducida por el carbacol, pero de menor magnitud (equivalente al 50 % de la tensión máxima desarrollada en respuesta a la fenilefrina) (Fig. 19B). Este efecto sólo se observó en los anillos con endotelio, y únicamente durante la primera exposición al Co^{2+} (véase Fig. 19C).

c).- Efectos del Ni^{2+} :

La aplicación de Ni^{2+} a concentraciones bajas (180 - 360 μM) o elevadas (3 - 5 mM), durante la relajación máxima inducida por el carbacol en los anillos con endotelio contraídos con fenilefrina no modificó dicha relajación (Fig. 20). Sin embargo, tal y como se observó después de la exposición al Co^{2+} , los anillos con endotelio expuestos al Ni^{2+} mostraron también, una inhibición muy marcada y prolongada de la respuesta relajante al carbacol (Fig. 16B).

Papel de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares

a).- Efectos de la neomicina

Con ninguno de los esquemas de aplicación utilizados se observó efecto alguno de la neomicina (5 mM) sobre la relajación inducida por el carbacol (10^{-5} M) en los anillos con endotelio precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M), (Fig. 21 y 22).

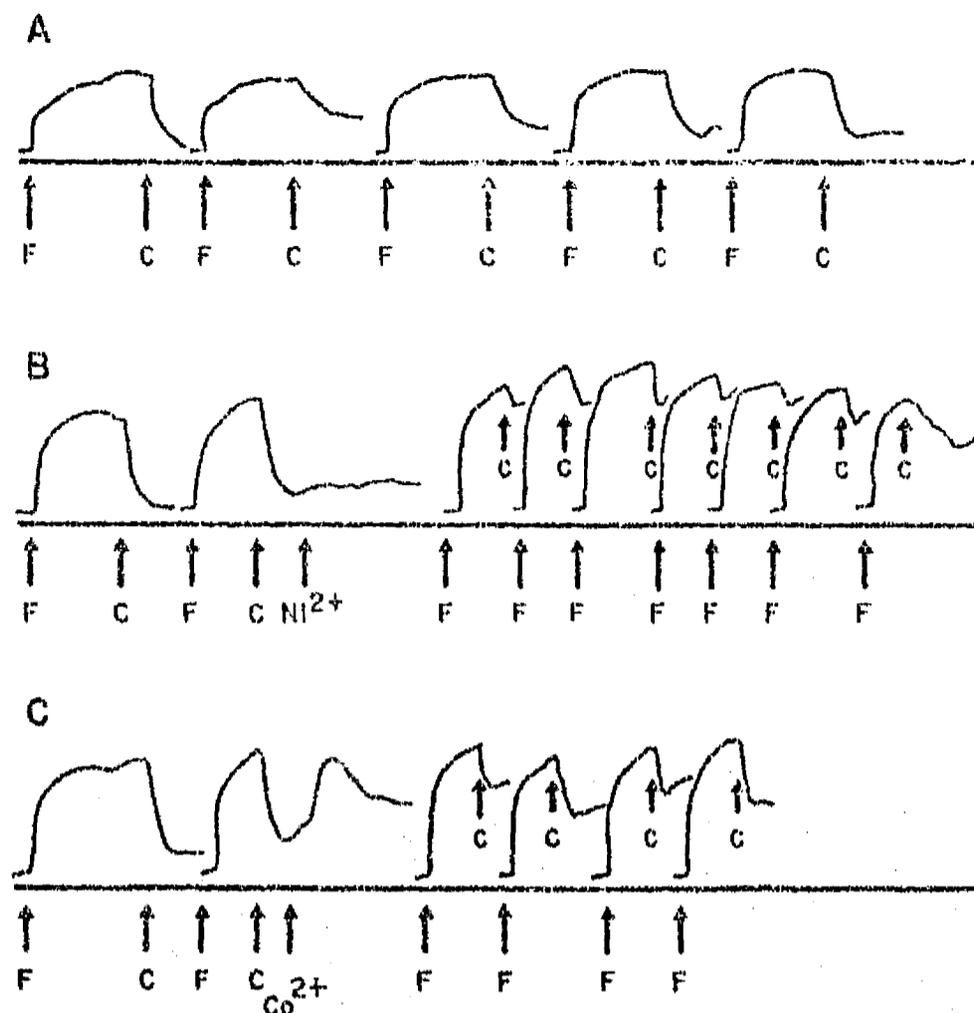


Figura 16.- Efectos residuales del Co^{2+} (3 mM) y del Ni^{2+} (360 μ M) sobre la relajación inducida por el carbachol (10^{-5} M) en anillos aórticos con endotelio precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M). A) ilustra la reproducibilidad del desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina y de la relajación inducida por el carbachol, B).- Ilustra los efectos producidos por la exposición de las preparaciones al Ni^{2+} (360 μ M) y C).- Ilustra los efectos producidos por la exposición de las preparaciones al Co^{2+} (3 mM). Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbachol. Cada contractura fue precedida de un período de lavado en solución de Tyrode de por lo menos 30 min. Los registros corresponden a tres diferentes preparaciones. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros A, B, y C son representativos de 4 experimentos en cada caso.

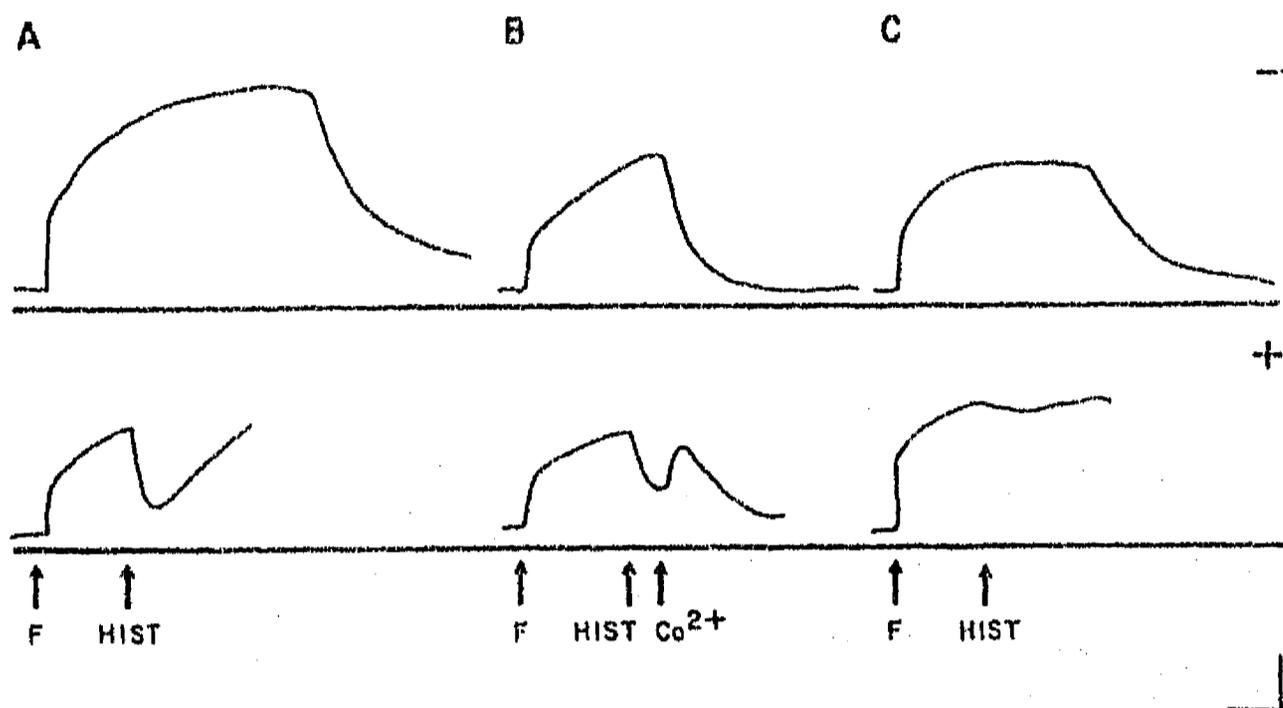


Figura 17.- Efectos del Co^{2+} sobre las relajaciones inducidas por la histamina en anillos aórticos con (+) y sin (-) endotelio, precontractados con fenilefrina (10^{-5} M). A): Relajación inducida por la histamina (10^{-3} M), en solución de Tyrode, B) Aplicación del Co^{2+} durante la relajación inducida por la histamina y C): aplicación de la histamina en anillos aórticos precontractados con fenilefrina que habían sido expuestos al Co^{2+} , entre el final del registro ilustrado en B y la aplicación de la fenilefrina en C los anillos fueron lavados con solución de Tyrode durante por lo menos 30 min. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; hist, histamina. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

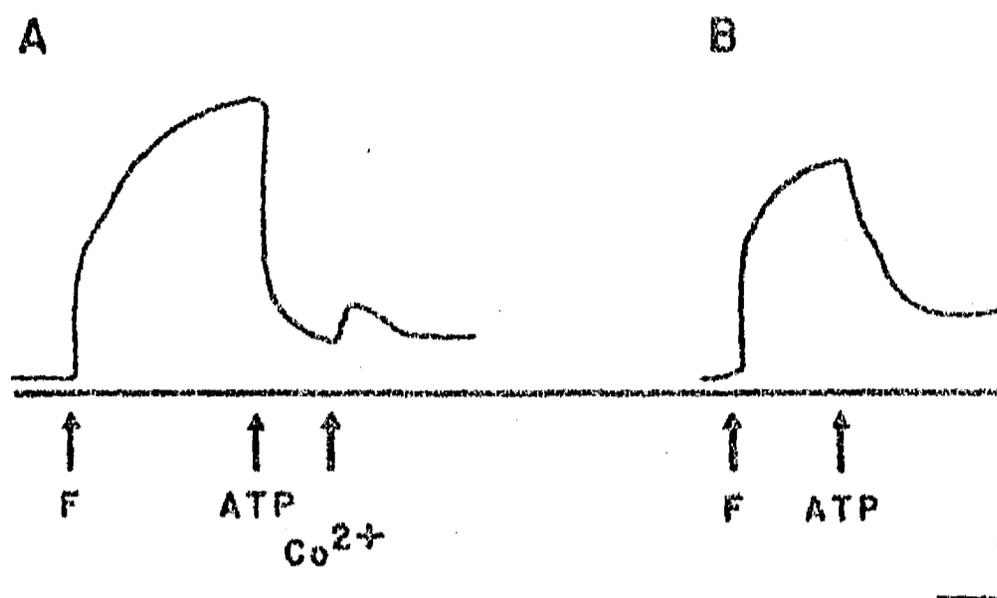


Figura 18.- Efectos del Co^{2+} (3 mM) sobre la relajación inducida por el ATP (10^{-4} M) en un anillo aórtico con endotelio precontraído con fenilefrina (10^{-5} M). A) aplicación del Co^{2+} durante la relajación máxima inducida por el ATP, B) aplicación de ATP en el mismo anillo durante la contractura inducida por la fenilefrina, después de retirar el Co^{2+} y lavar la preparación durante 30 min. en solución de Tyrode. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; ATP, adenosin trifosfato de sodio. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

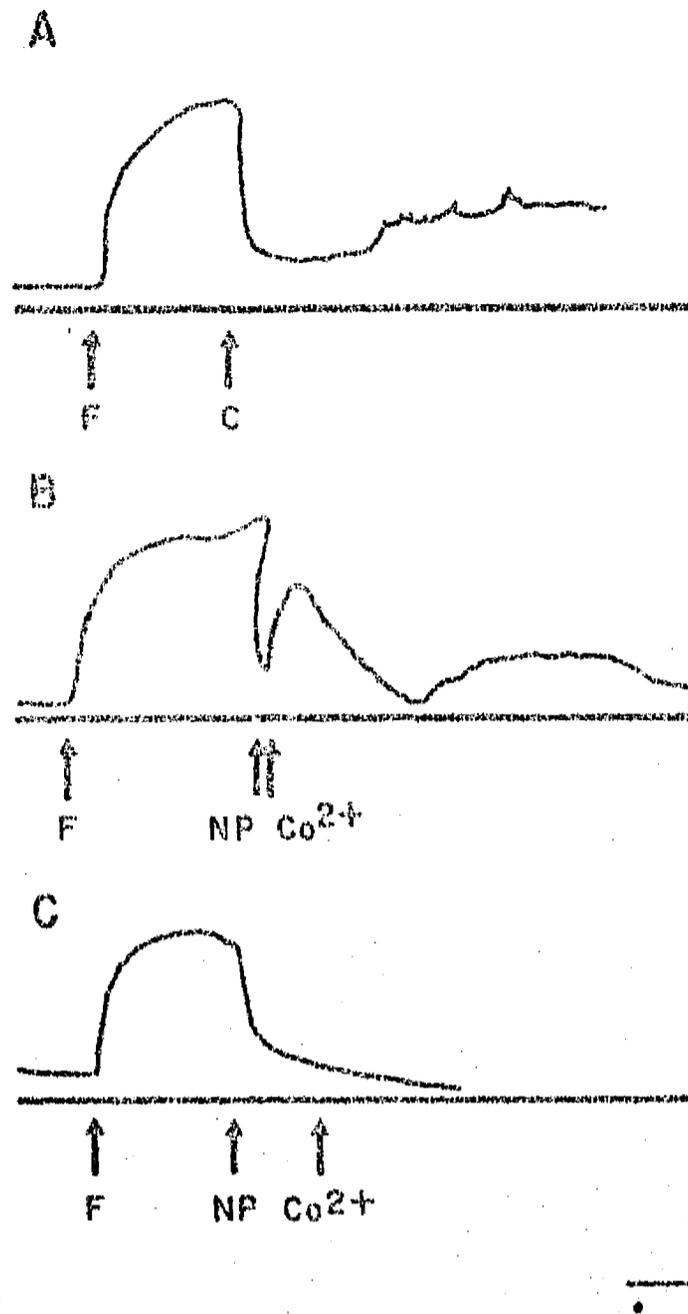


Figura 19.- Efectos del Co^{2+} (3 mM) sobre la relajación inducida por nitroprusiato de sodio (NP) (10^{-7} M), en un anillo con endotelio íntegro previamente contraído con fenilefrina (10^{-5} M). A): Efecto de la aplicación de fenilefrina y carbacol en solución de Tyrode, B): efectos del Co^{2+} sobre la relajación inducida por NP y C) efectos del Co^{2+} sobre la relajación inducida por NP en la preparación que había sido expuesta previamente al Co^{2+} . Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

La relajación inducida por la histamina en presencia de neomicina (5 mM), fue enteramente similar a la inducida en su ausencia (Fig. 23).

Con ninguno de los esquemas de aplicación utilizados se observó efecto alguno de la neomicina (5 mM) sobre las relajaciones inducidas por el ATP en los anillos precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M) (Fig. 24).

b).- Efectos de la procaína:

La aplicación de procaína (1 mM) cuando la relajación inducida por el carbacol había alcanzado su máximo, en los anillos con endotelio precontraídos con fenilefrina, produjo una inhibición completa de esta relajación (Figura 25A). Cuando la procaína fue aplicada simultáneamente con el carbacol, se observó solamente una relajación transitoria y de menor magnitud que la inducida por el carbacol sólo (Figura 25B). La procaína aplicada 10 min antes de la adición del carbacol (10^{-5} M) previno totalmente el efecto relajante de éste fármaco (Fig. 25C). Todos estos efectos fueron completamente revertidos después de un período de lavado de 30 min (Figura 25D).

En los anillos con endotelio precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M), la aplicación de procaína durante el desarrollo de la relajación inducida por la histamina (10^{-3} M), no tuvo efecto alguno (Fig. 26A). La aplicación simultánea de la procaína con la histamina produjo una disminución en la magnitud de la relajación (Fig. 26B), sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico estos efectos no fueron significativos. La relajación inducida por histamina en presencia de la procaína, fue inhibida en 39.68 ± 5.37 % (n=4) (Fig. 26C). Este efecto fue revertido después de un período de lavado de 30 min.

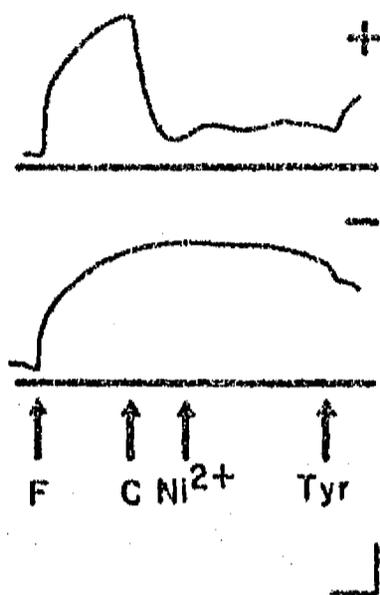


Figura 20.- Efectos del Ni^{2+} ($360 \mu\text{M}$) sobre la relajación inducida por el carbacol (10^{-5} M) en anillos con (+) y sin endotelio (-), precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M). Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbacol. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

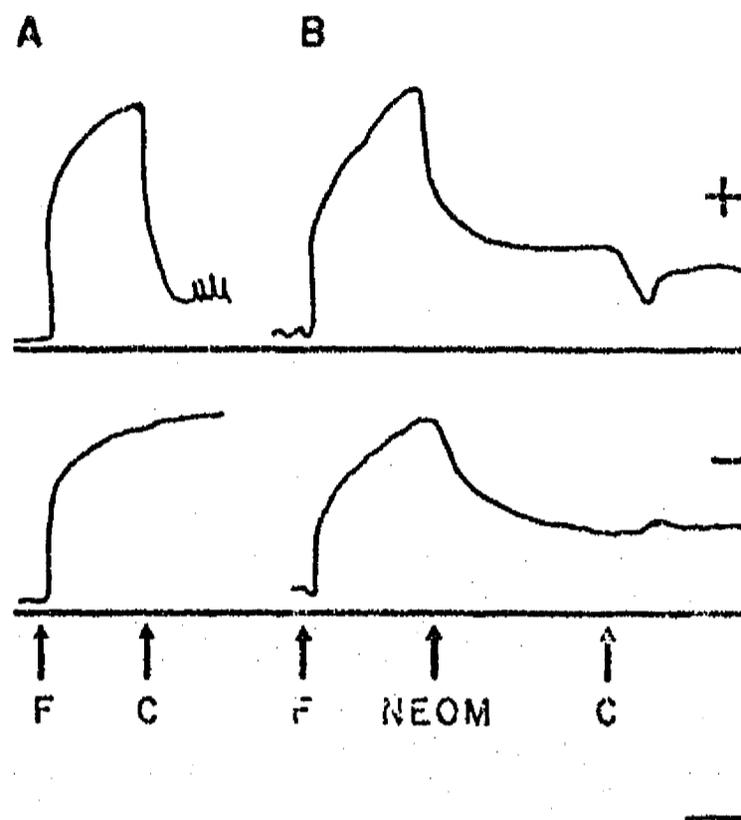


Figura 21.- Efectos de la neomicina (5mM) sobre el desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina (10^{-5} M) y la relajación inducida por carbacol (10^{-5} M) en anillos con (+) y sin (-) endotelio A) efectos de la fenilefrina y del carbacol en solución de Tyrode, B) aplicación de la neomicina durante la contractura inducida por la fenilefrina y la aplicación de carbacol en presencia de la neomicina. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbacol; NEOM, neomicina. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

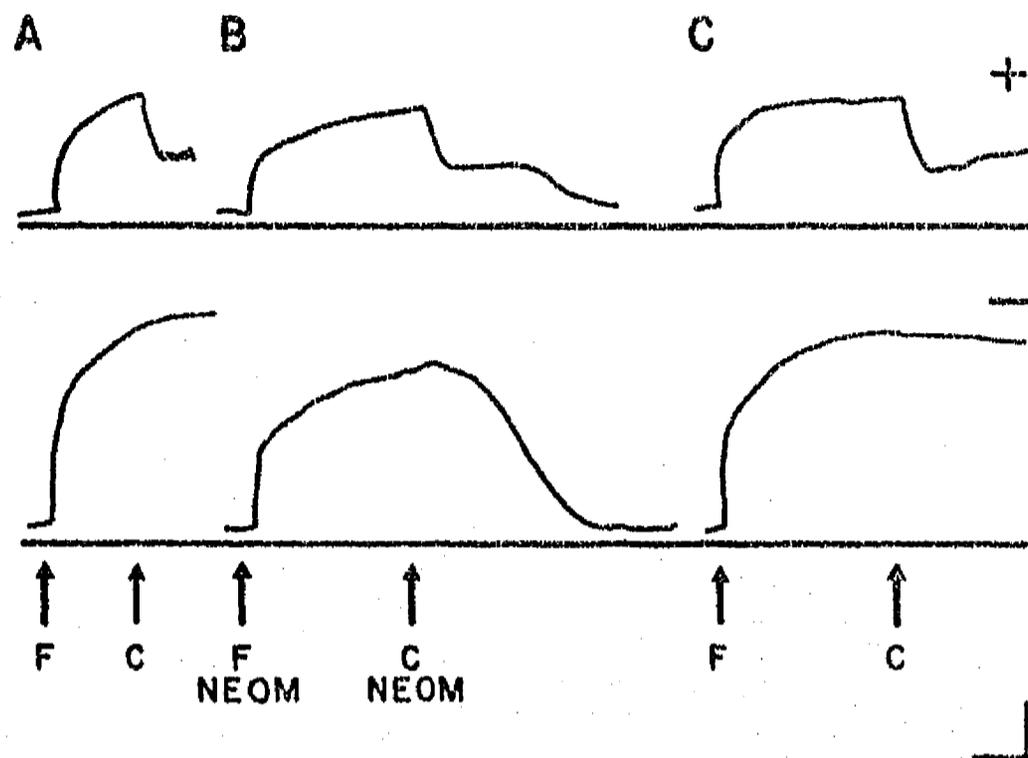


Figura 22.- Efectos de la neomicina (5 mM) sobre las relajaciones inducidas por el carbacol (10^{-5} M) en anillos con (+) y sin (-) endotelio precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M). A) efectos de la fenilefrina y del carbacol en solución de Tyrode, B) aplicación del carbacol en presencia de la neomicina y C) control. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbacol; NEOM, neomicina. Calibración: vertical: 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

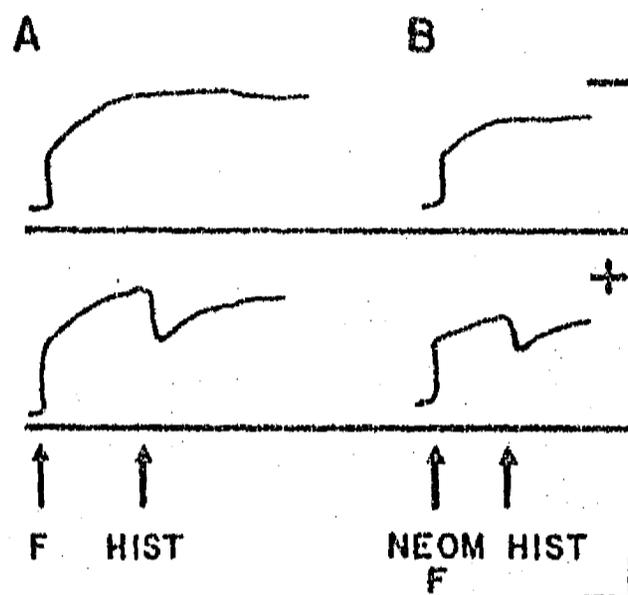


Figura 23.- Efectos de la neomicina (3×10^{-3} M) sobre la relajación inducida por histamina (10^{-3} M) en anillos aórticos con (+) y sin (-) endotelio precontractados con fenilefrina (10^{-5} M). A) efectos de la fenilefrina y de la histamina en solución de Tyrode B) aplicación de la histamina (hist) en presencia de la neomicina. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; hist, histamina; NEOM, neomicina. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

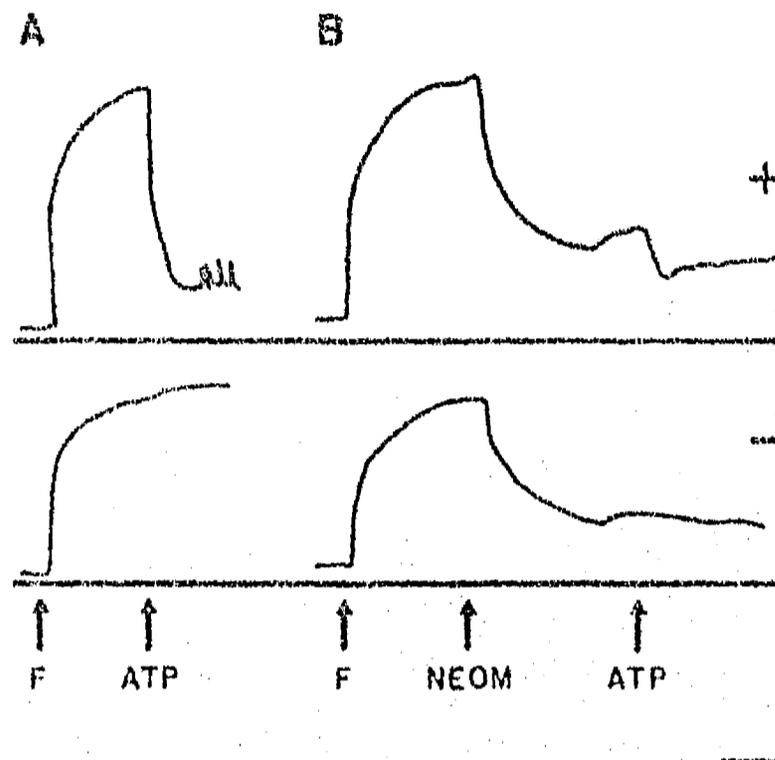


Figura 24.- Efectos de la neomicina sobre la relajación inducida por el ATP (10^{-4} M) en anillos de aorta con (+) y sin (-) endotelio, precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M). A) efectos de la fenilefrina y el ATP en solución de Tyrode, B) efectos del ATP en presencia de la neomicina. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; ATP, adenosin trifosfato de sodio; NEOM, neomicina. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

En los anillos con endotelio precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M), la aplicación de procaína (1 mM) durante la relajación máxima inducida por el ATP (10^{-4} M), no tuvo efectos significativos (27A). La aplicación simultánea de la procaína y el ATP no tuvo efectos significativos alguno sobre la magnitud o el curso temporal de la relajación en los anillos con endotelio. En los anillos sin endotelio, el efecto relajante directo del ATP sobre el músculo liso, fue mayor en presencia de la procaína, produjo una disminución de aproximadamente el 50 % de la tensión máxima desarrollada en respuesta a la fenilefrina (10^{-5} M) (Fig. 27B). La presencia de la procaína no previno la relajación inducida por el ATP, aunque sí enlenteció dicha relajación, (Fig. 27C).

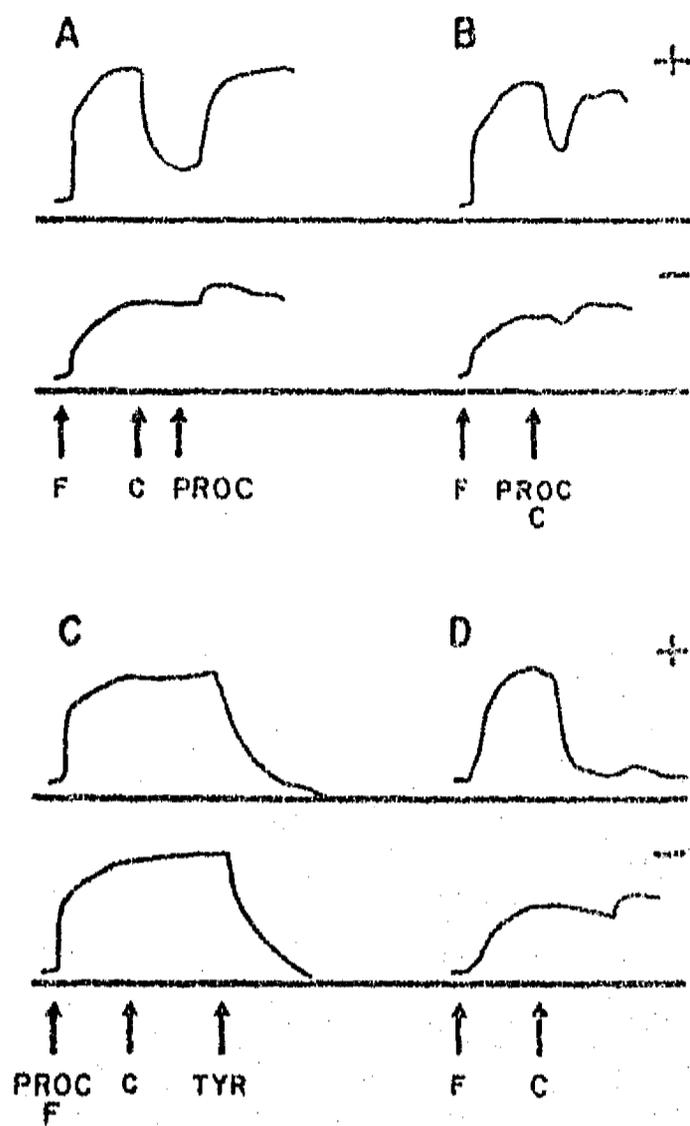


Figura 25.- Efectos de la procaína (1 mM) sobre la relajación inducida por el carbacol (10^{-5} M) en anillos aórticos con (+) y sin (-) endotelio contraídos con fenilefrina (10^{-5} M). A) Aplicación de la procaína durante la relajación inducida por el carbacol, B) Aplicación de la procaína simultáneamente con el carbacol, C) aplicación de carbacol en presencia de procaína y D) aplicación de la fenilefrina y del carbacol 30 min. después de lavado en solución de Tyrode. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; HIST, histamina; PROC, procaína. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

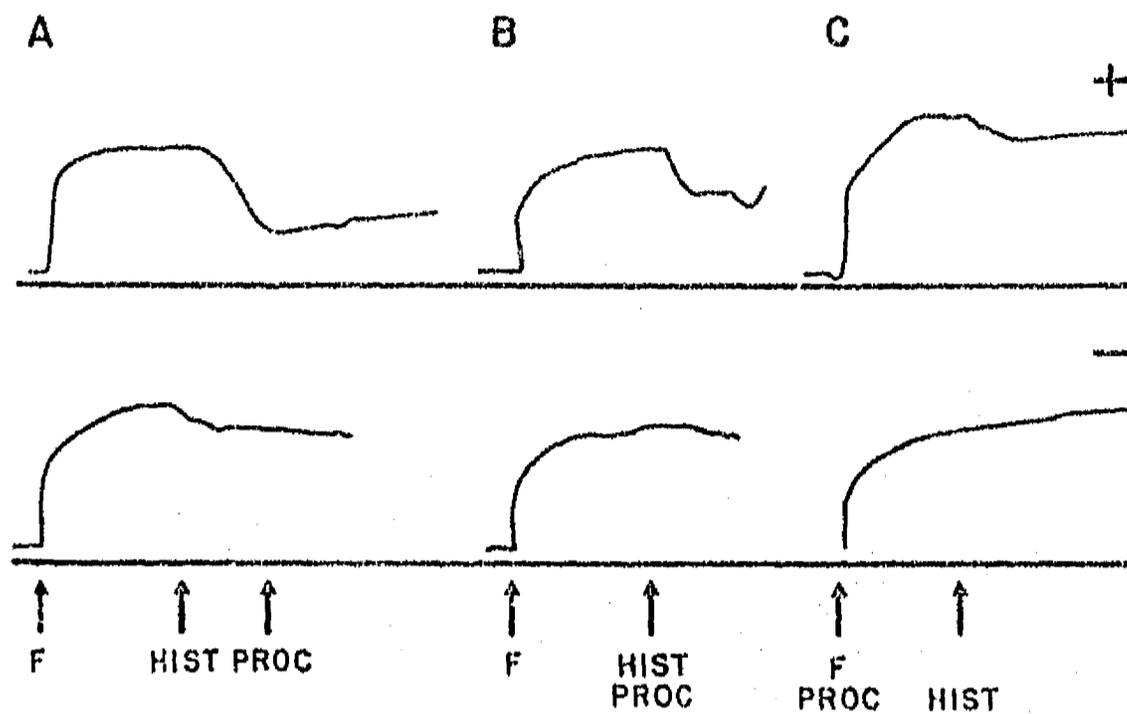


Figura 26.- Efectos de la procaína (1 mM) sobre la relajación inducida por la histamina (10^{-3} M) en anillos con (+) y sin (-) endotelio, contraídos con fenilefrina (10^{-5} M). A) aplicación de la procaína durante la fase de relajación inducida por la histamina, B) aplicación de la procaína en forma simultánea con la histamina y C) aplicación de histamina en presencia de la procaína. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; C, carbacol; PROC, procaína. Calibración: vertical, 571 mg; horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

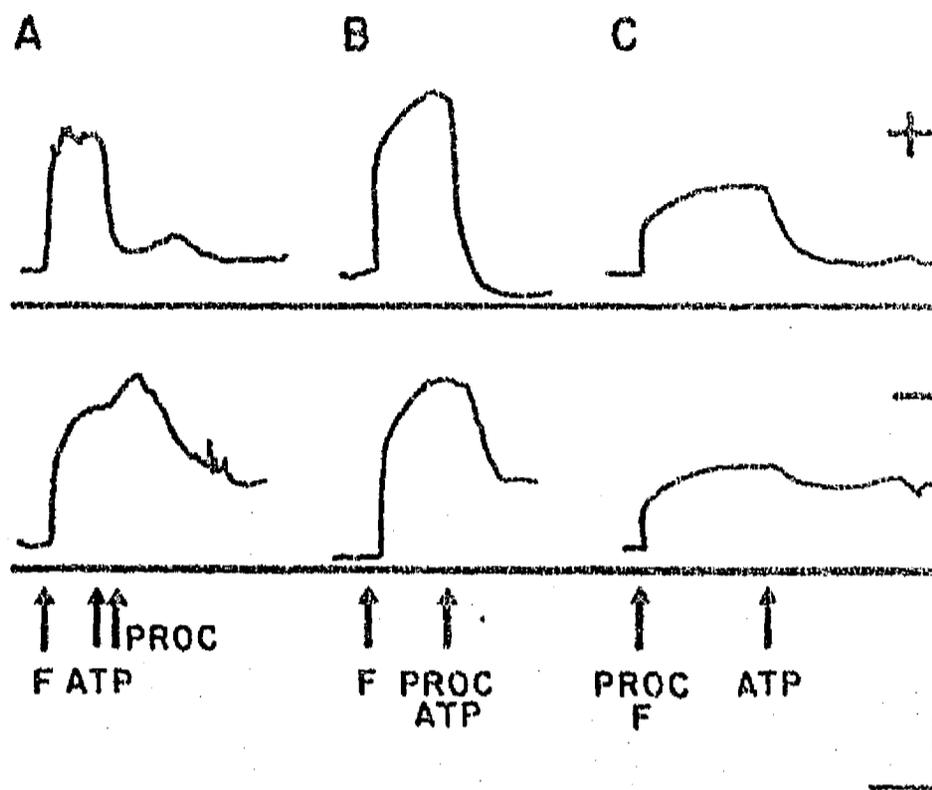


Figura 27.- Efectos de la procaína sobre la relajación inducida por el ATP (10^{-4} M). A) aplicación de la procaína durante la relajación inducida por el ATP, B) aplicación de la procaína en forma simultánea con el ATP y C) aplicación del ATP en presencia de la procaína. Las flechas indican el momento en que fueron aplicados los fármacos: F, fenilefrina; ATP, adenosintrifosfato de sodio; PROC, procaína. Calibración: vertical, 571 mg, en A) y B), y 1142 mg en C); horizontal, 2 min. Los registros son representativos de 4 experimentos.

Parte III

Análisis de la participación de factores hormonales en la modulación del tono vascular dependiente del endotelio.

1.- Análisis de los efectos de la exposición crónica a los estrógenos sobre las respuestas contráctiles inducidas por la fenilefrina y al carbacol.

A).- Curva dosis respuesta a la fenilefrina

a).- Anillos con endotelio.

Los anillos aórticos con endotelio provenientes de las ratas que habían recibido el tratamiento estrogénico desarrollaron menos tensión en respuesta a cada una de las dosis de fenilefrina probadas, que los anillos provenientes de los animales no tratados (comparar círculos llenos y círculos abiertos, Fig. 28A). El análisis estadístico mostró que la diferencia fue significativa ($p < 0.05$) para las respuestas a 10^{-7} , 10^{-6} , y 10^{-5} M de fenilefrina. La tensión desarrollada por la aplicación de la dosis máxima de fenilefrina (respuesta contráctil máxima) fue de 1.69 ± 0.23 g para los anillos provenientes de las ratas tratadas y de 2.21 ± 0.13 g para los anillos provenientes de las ratas no tratadas. La tabla I resume el PD_2 calculado para cada una de estas series de experimentos, puede observarse que el tratamiento estrogénico desplazó el PD_2 significativamente ($p < 0.05$) de 6.82 ± 0.04 a 6.42 ± 0.01 .

Además, se observó que en los anillos de aorta de las ratas que recibieron el tratamiento hormonal, el desarrollo de tensión durante la exposición a una concentración dada de fenilefrina tendía a ser transitorio, es decir, comenzaba a declinar gradualmente después de alcanzar su valor pico, y en algunos experimentos, la tensión caía hasta su nivel inicial después de algunos minutos, a pesar de la presencia continua del agonista contráctil. Las respuestas transitorias de los vasos de los animales tratados con estrógenos contrastan marcadamente con la respuesta contráctil sostenida observada en las preparaciones de aorta de ratas no tratadas.

La atenuación de la respuesta contráctil a la fenilefrina observada en los anillos aórticos de las ratas tratadas, se acentuó aún más cuando la exposición a

la fenilefrina se realizó en presencia de indometacina (comparar triángulos llenos y círculos llenos Fig. 28 A). Bajo estas condiciones experimentales, la respuesta contráctil máxima a la fenilefrina fue de 1.11 ± 0.22 g en los anillos de ratas tratadas y de 2.33 ± 0.17 g en aquellos de ratas no tratadas. La indometacina también acentuó la naturaleza transitoria de la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina de los anillos provenientes de los animales tratados. En presencia de indometacina, la adición de NAME (300 μ M) a las soluciones de perfusión, abolió las diferencias descritas entre las respuestas contráctiles a la fenilefrina de los anillos aórticos provenientes de ratas tratadas y no tratadas (no mostrado).

TABLA I

Efectos del tratamiento crónico con 17-estearato de estradiol sobre la curva dosis respuesta a la fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) de anillos de aorta de rata.

Grupo	Con endotelio		Sin endotelio	
	PD ₂	Tensión Max.	PD ₂	Tensión Max.
No tratadas.				
(-)indom.	6.82 ± 0.04	2.21 ± 0.13	7.60 ± 0.01°	2.22 ± 0.24
(+)indom.	6.86 ± 0.03	2.33 ± 0.17	7.54 ± 0.10°	2.20 ± 0.32
Tratadas				
(-)indom.	6.42 ± 0.01*	1.69 ± 0.23*	6.92 ± 0.12°	2.36 ± 0.23
(+)indom.	6.52 ± 0.03*	1.11 ± 0.22*	7.16 ± 0.06°	1.99 ± 0.14
(+)indom.				
(+)L-NAME	7.11 ± 0.09	1.91 ± 0.10	7.21 ± 0.04	2.45 ± 0.11

PD₂: -log de la concentración molar media que causa el 50 % de la respuesta máxima a la fenilefrina (10^{-5} M). Tensión Max.: tensión (en gramos) desarrollada en respuesta a la fenilefrina (10^{-5} M). (-)indom: sin indometacina. (+)indom: con indometacina (10^{-5} M). (+)indom (+)L-NAME: con indometacina (10^{-5} M) y L-NAME (300 μ M). Los datos son expresados como la media \pm SE; n=6 para todos los grupos. * Significa que las diferencias entre los grupos de animales tratados y no tratados son significativas (p<0.05).

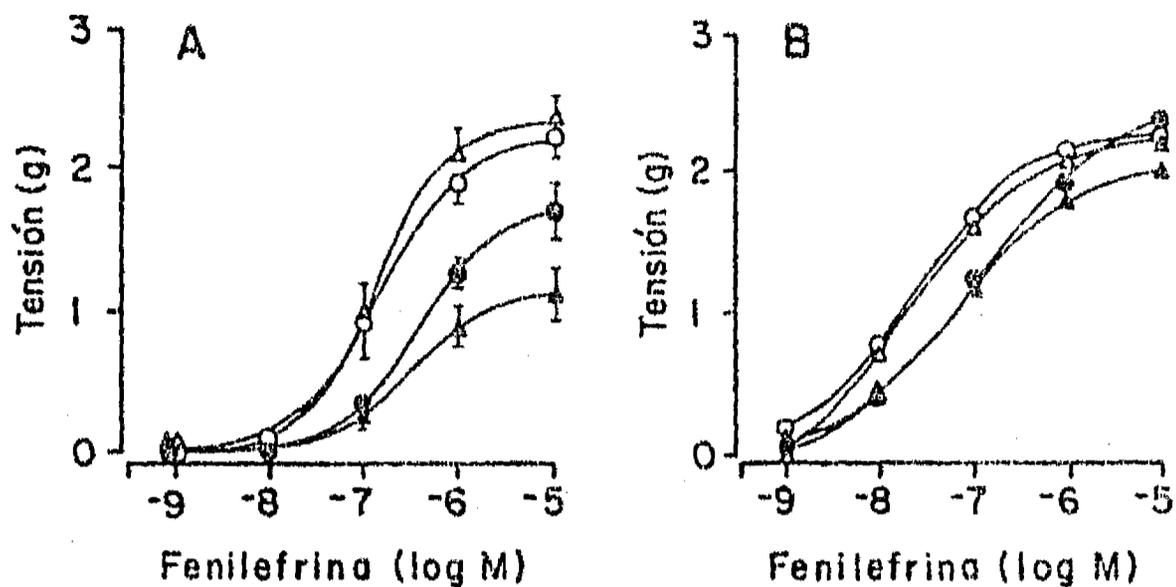


Figura 28.- Efectos del tratamiento crónico con 17-estearato de estradiol sobre las curvas dosis respuesta a la fenilefrina en anillos aórticos con (A) o sin (B) endotelio. Cada gráfica ilustra las respuestas de los anillos aórticos provenientes de ratas ovariectomizadas no tratadas (símbolos abiertos) o tratadas con estrógenos (símbolos llenos). Las curvas fueron obtenidas tanto en ausencia (círculos) como en presencia (triángulos) de indometacina. Los datos son presentados como la media \pm E.S. de seis ratas en cada grupo. Por claridad las barras del E.S. fueron omitidas en la gráfica B.

b).- Anillos aórticos sin endotelio funcional.

Cada uno de los experimentos fue realizado simultáneamente en un par de anillos aórticos: uno, con endotelio funcional, y el otro, sin endotelio funcional. En cada par, la respuesta contráctil a una concentración dada de fenilefrina del anillo sin endotelio superaba a aquella del anillo con endotelio.

La curva dosis respuesta de los anillos provenientes de las ratas no tratadas no difería significativamente de aquella de los anillos de animales no tratados (comparar círculos abiertos y cerrados, Figura 28B).

La indometacina no modificó significativamente las respuestas contráctiles a la fenilefrina de los anillos sin endotelio.

B).- Curva dosis-respuesta al carbacol.

Los anillos con endotelio intacto se relajaban de manera dependiente de la dosis en respuesta a dosis crecientes de carbacol. La curva dosis-respuesta de los anillos provenientes de los animales tratados estaba desplazada significativamente ($p < 0.01$) hacia la derecha con respecto a la curva correspondiente de los anillos de los animales no tratados (comparar círculos abiertos y cerrados, Fig. 29). Los valores respectivos del PD_2 están tabulados en la tabla II.

La indometacina no tuvo efectos significativos sobre la relajación inducida por el carbacol en los vasos provenientes de animales tratados o no tratados (Fig. 29 y Tabla II)

TABLA II

Efectos del tratamiento crónico con 17-estearato de estradiol sobre la relajación inducida por el carbacol (10^{-9} - 10^{-5} M) en anillos de aorta con endotelio íntegro, precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M).

Grupo	PD ₂	Porcentaje de la relajación máxima
No Tratadas		
(-) indom.	6.03 ± 0.09	76.90 ± 8.42
(+) indom.	6.05 ± 0.06	75.00 ± 10.81
Tratadas		
(-) indom.	6.51 ± 0.29*	89.98 ± 2.57
(+) indom.	6.46 ± 0.28*	82.46 ± 5.97

PD₂: -Log de la concentración molar media que causa el 50 % de la relajación máxima inducida por el carbacol. Porcentaje de la relajación máxima: porcentaje de la disminución máxima de la tensión con respecto a la tensión máxima inducida por la fenilefrina (10^{-5} M). Los valores son expresados como la media ± E.S., n=7 para todos los grupos. * significa que las diferencias entre los grupos tratados y no tratados son significativas (p<0.01).

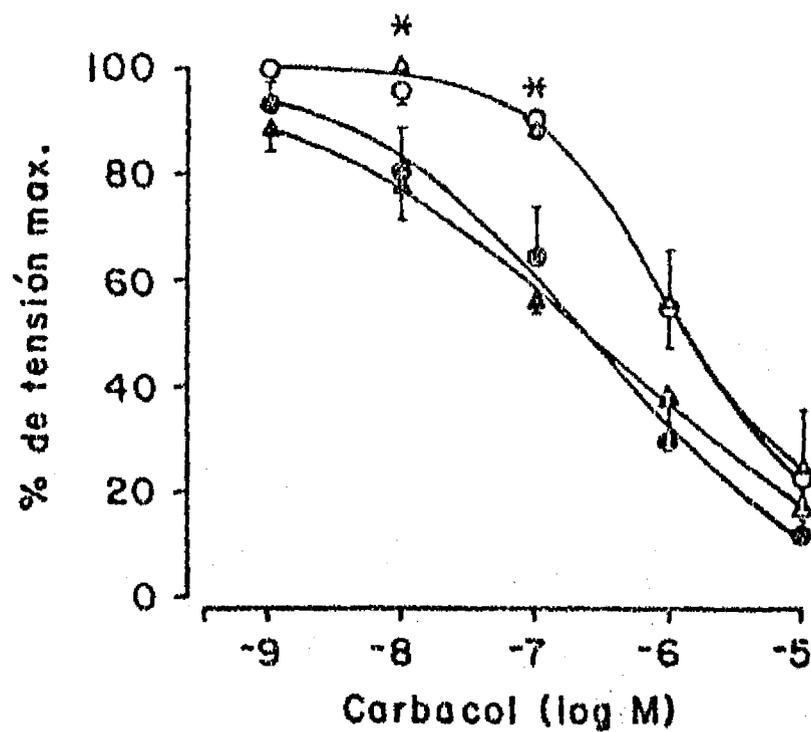


Figura 29.- Efectos del tratamiento crónico con 17-estearato de estradiol sobre las curvas dosis respuesta al carbacol de anillos de aorta con endotelio íntegro, extraídos de ratas ovariectomizadas no tratadas (símbolos abiertos) o tratadas (símbolos cerrados) y precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M). Los círculos corresponden a la relajación observada en ausencia de indometacina y los triángulos corresponden a la observada en presencia de indometacina. Los datos son expresados como el porcentaje de la tensión máxima inducida por fenilefrina y corresponde a la media \pm E.S. de seis ratas en cada grupo. * significa que las relajaciones de los grupos tratados con estrógenos son significativamente diferentes de aquellas del grupo de animales no tratados ($p < 0.05$).

2.- Análisis de los efectos de la exposición aguda a los estrógenos sobre las respuestas contráctiles inducidas por la fenilefrina y el carbacol

En esta serie de experimentos se determinaron las curvas dosis respuesta a la fenilefrina y al carbacol en presencia de indometacina en pares de anillos aórticos provenientes de ratas ovariectomizadas (sin tratamiento estrogénico), tanto antes como después (40 a 60 min.) de la adición de 17β -estradiol (10^{-9} M) a las soluciones de perfusión. Con este protocolo cada par de anillos servía como su propio control experimental para evaluar los efectos hormonales.

A.- Curvas dosis respuesta a la fenilefrina.

Como se observó en los experimentos previos (tratamiento estrogénico crónico), la curva dosis respuesta a la fenilefrina de los anillos aórticos sin endotelio estaba ($p < 0.05$) desplazada significativamente hacia la izquierda (PD_2 7.45 ± 0.08) con respecto a la curva correspondiente de los anillos con endotelio (PD_2 : 7.06 ± 0.09) (Fig. 30 y Tabla III).

Ni en los anillos con endotelio ni en aquellos sin endotelio funcional se modificó significativamente la curva dosis respuesta a la fenilefrina por la adición de 17β -estradiol

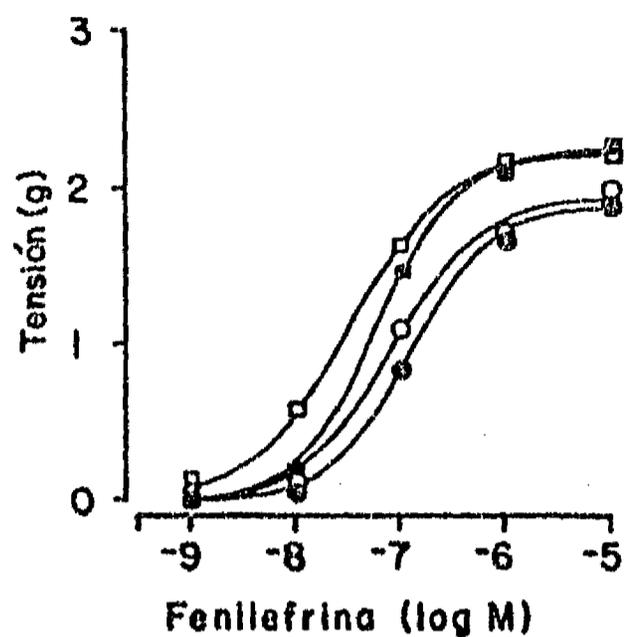


Figura 30.- Efectos del tratamiento agudo con 17β -estradiol sobre las curvas dosis-respuesta a la fenilefrina de anillos de aorta con (círculos) o sin (cuadrados) endotelio provenientes de ratas ovariectomizadas y preincubados con indometacina. Las respuestas fueron registradas en el mismo par de anillos, antes (símbolos abiertos) y después (símbolos cerrados) de la adición de del 17β -estradiol a la solución de perfusión. Los datos son expresados como la media de anillos de siete ratas de cada grupo. Las barras del E.S. fueron omitidas por claridad.

TABLA III

Efecto del tratamiento agudo con 17β -estradiol (10^{-9} M) sobre la curva dosis respuesta a la fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) de anillos preincubados con indometacina (10^{-5} M) provenientes de ratas ovariectomizadas.

Grupo	Con endotelio PD ₂	Sin endotelio PD ₂	n
No tratados	7.06 ± 0.09	7.45 ± 0.08*	7
Tratados	6.89 ± 0.05	7.21 ± 0.10*	7
Tratados (+)NAME	7.09 ± 0.11	7.33 ± 0.13*	4

PD₂: -Log ± E.S. de la concentración molar media que causa el 50 % de la respuesta máxima a la fenilefrina (10^{-5} M). * significa que la diferencia entre el PD₂ de los anillos con endotelio y sin endotelio es significativa (p<0.05).

Curva dosis-respuesta al carbacol.

La curva dosis respuesta a concentraciones crecientes acumulativas de carbacol de los anillos con endotelio intacto y precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M), determinada en presencia del 17β -estradiol, estaba desplazada significativamente ($p < 0.05$) hacia la izquierda con respecto a la curva correspondiente obtenida antes de la exposición a la hormona (comparar triángulos abiertos y cerrados en la Fig. 31). Los valores calculados para los respectivos PD_2 están listados en la tabla IV.

TABLA IV

Efectos del tratamiento agudo con 17β - estradiol (10^{-9} M) sobre la relajación inducida por el carbacol (10^{-9} - 10^{-5} M) en anillos de aorta con endotelio preincubadas con indometacina (10^{-5} M) provenientes de ratas ovariectomizadas.

Grupo	PD ₂	Porcentaje de la relajación máxima
No tratados	6.04 ± 0.05	75.86 ± 5.51
Tratados	6.64 ± 0.14*	87.58 ± 4.44*

PD₂: -Log de la concentración molar media que causa el 50 % de la relajación máxima inducida por el carbacol. Porcentaje de la relajación máxima: porcentaje de la disminución máxima de la tensión con respecto a la tensión máxima inducida por fenilefrina (10^{-5} M). Los valores son expresados como la media ± E.S., n=7 para todos los grupos. * significa que las diferencias entre los valores observados antes y después del tratamiento estrogénico son significativas (p<0.05).

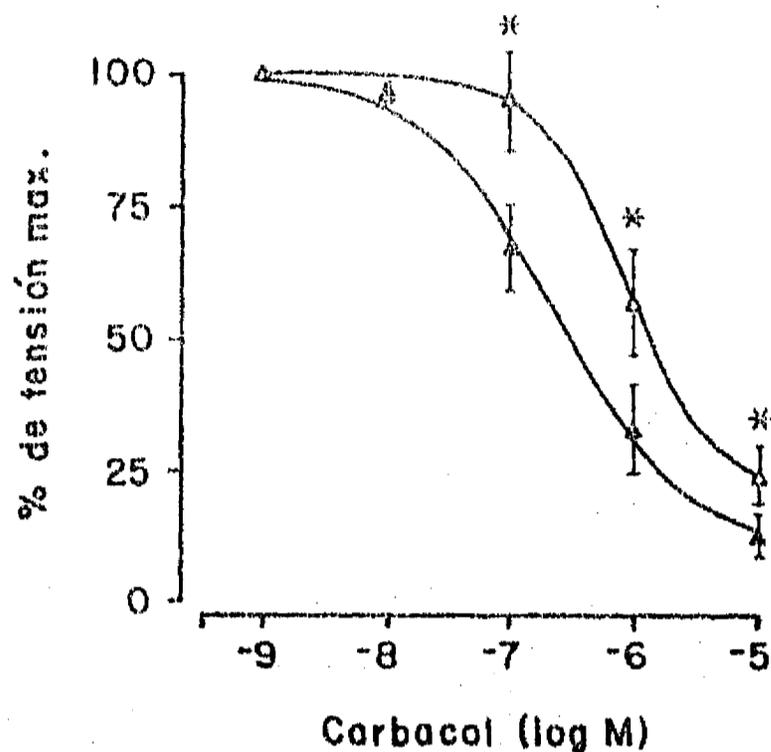


Figura 31.- Efectos del tratamiento agudo con 17β -estradiol (10^{-9} M) sobre las curvas dosis-respuesta al carbacol de anillos aórticos con endotelio íntegro y preincubados con indometacina (10^{-5} M) provenientes de ratas ovariectomizadas. Las respuestas al carbacol fueron obtenidas en el mismo anillo antes (triángulos abiertos) y después (triángulos llenos) de la adición de 17β -estradiol a la solución de perfusión. Los anillos fueron precontraídos con fenilefrina (10^{-5} M). Los datos son expresados como el porcentaje de la tensión máxima inducida por la fenilefrina y corresponden a la media \pm E.S. de los vasos de siete ratas en cada grupo. * significa que la relajación en presencia del estradiol es significativamente mayor ($p < 0.05$) que en la ausencia de la hormona.

DISCUSIÓN

Los resultados de las tres partes en que se dividió el estudio se discuten por separado.

Parte I

Caracterización de las respuestas vasomotoras inducidas por diversos agonistas.

La curva dosis respuesta acumulativa a la noradrenalina (agonista de los receptores adrenérgicos α_1 , α_2 y β) de los anillos sin endotelio estaba desplazada hacia la izquierda con respecto a la curva correspondiente de los anillos con endotelio. La tensión máxima desarrollada por los anillos sin endotelio siempre fue mayor que la desarrollada por los anillos con endotelio. La fenilefrina, agonista selectivo de los receptores adrenérgicos α_1 , produjo un desarrollo de tensión dependiente de la dosis, similar a aquel producido por la noradrenalina, sin embargo, aunque la curva dosis respuesta a la fenilefrina de los anillos sin endotelio también estaba desplazada significativamente hacia la izquierda con respecto a la de los anillos con endotelio, no se observó una diferencia significativa en la tensión máxima desarrollada por ambos tipos de anillos.

Se ha demostrado que hay síntesis y liberación espontánea de NO en el endotelio (Lues y col., 1984; Godfraind y col., 1985; Martin y col., 1986; Bullock y col., 1986) El NO así liberado puede contrarrestar el desarrollo de tensión inducido por los vasoconstrictores en los vasos con endotelio intacto y esto desplaza las curvas dosis respuesta de los anillos aórticos con endotelio hacia la derecha. La mayor tensión máxima desarrollada en respuesta a la noradrenalina, en los anillos sin endotelio con respecto a la que desarrollan los anillos con endotelio, puede explicarse por la presencia de receptores adrenérgicos α_2 en el endotelio, cuya activación induce la liberación del NO (Cocks J.A. y col., 1983). Esta interpretación está acorde con la observación de que con la fenilefrina, agonista selectivo α_1 , no se observó dicha diferencia.

El carbacol, produjo en los anillos con endotelio, contraídos con fenilefrina, una relajación cuya magnitud y curso temporal fueron dependientes de la dosis y

del grado de integridad funcional del endotelio. Se ha reportado que la estimulación de los receptores muscarínicos induce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en las células endoteliales lo que a su vez induce la síntesis de NO (Colden-Stanfiel y col., 1987; Hallam y col., 1988; Luckhoff y col., 1988). En la mayoría de las relajaciones inducidas por el carbacol se observan dos fases, una rápida y la otra lenta. La primera, podría ser atribuida principalmente al incremento rápido en la $[Ca^{2+}]_i$ producida por la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, y la segunda, que se observa en aquellas preparaciones en las cuales el endotelio tiene una mayor integridad funcional (aparente por una relajación más completa), podría atribuirse al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ producida por el influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática.

El ATP también produjo, en los anillos con endotelio contraídos con fenilefrina, una relajación que dependía de la dosis y de la integridad del endotelio. Esta relajación tenía una sola fase de desarrollo rápido. En los anillos sin endotelio, el ATP, también, produjo una pequeña relajación (30% aproximadamente de la tensión máxima desarrollada en respuesta a la fenilefrina). Esta relajación, independiente del endotelio, ha sido atribuida a la acción directa sobre el músculo liso de los metabolitos del ATP tales como el AMP y la adenosina (De Mey y col., 1980; 1981).

La histamina produjo, en los anillos con endotelio precontraídos con fenilefrina, una relajación transitoria que nunca alcanzó el 100 % de la tensión máxima desarrollada en respuesta a la fenilefrina. Esta relajación transitoria podría ser explicada suponiendo que la estimulación de los receptores histaminérgicos induce fundamentalmente la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, y que esto ocasiona únicamente un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ activando sólo transitoriamente la síntesis de NO.

El nitroprusiato produjo una relajación que dependía de la dosis pero no de la presencia del endotelio. Los nitrovasodilatadores inducen incrementos en el GMPc en el músculo liso (Schultz y col., 1977; Katsuki y col., 1977) al activar a la guanilato ciclasa (Murad F., y col., 1978; Kukovetz y col., 1979). La vía precisa por

la cual los nitrovasodilatadores activan esta enzima ha sido sujeta a mucho debate. Se ha demostrado que las concentraciones de los nitrovasodilatadores que producen una estimulación equivalente al 50% de la estimulación máxima de la guanilato ciclasa, inducen una liberación uniforme de NO (Feelisch y col., 1987). Se ha reportado que estos compuestos actúan después de su conversión a óxido nítrico (Feelisch M., 1991). La reacción del NO con el ión ferroso del grupo prostético hemo de la guanilato ciclasa de las células musculares lisas vasculares activa a la enzima y consecuentemente incrementa la concentración de GMPc, conduciendo a la relajación vascular (Waldman y col., 1988)

La hemoglobina inhibió todas las respuestas dependientes del endotelio atribuibles a la liberación (tanto espontánea, como inducida por agonistas) del NO. La hemoglobina es un potente inactivador del NO, éste reacciona con la oxihemoglobina para producir metahemoglobina y nitrato inorgánico de acuerdo a la siguiente reacción:

$HbO_2 + NO \rightarrow metHb + NO^-$, (Bloughy col., 1985). Esta reacción del NO con la HbO_2 para producir metHb ha sido usada como una prueba espectrofotométrica para medir la liberación de NO (Kelm y col., 1988).

El azul de metileno también inhibió las respuestas dependientes del endotelio; sin embargo, a diferencia de la Hb, sus efectos no fueron reversibles. El efecto inhibitor del azul de metileno sobre las respuestas dependientes del endotelio se atribuyó inicialmente a su efecto inhibitor de la guanilatociclasa (Gruetter y col., 1981; Holzmann, 1982; Ignarro y col., 1984; Furchgott y col., 1984b; Martin y col., 1985). Sin embargo, reportes posteriores mostraron que el azul de metileno impide la conversión de la L-arginina a citrulina y NO al inhibir directamente la sintasa del NO (Shimizu S. y col., 1993).

En trabajos previos se ha descrito que la activación de los receptores α_2 adrenérgicos y de los receptores 5-HT₂ (Cocks y col., 1983) de las células endoteliales induce la liberación del NO, esto explicaría los efectos de la Hb y el azul de metileno sobre las curvas dosis respuesta a la NA y la 5-HT (desplazamiento hacia la izquierda y el incremento en la tensión máxima

desarrollada), en los anillos aórticos con endotelio íntegro, de tal manera que las respuestas en presencia de Hb o azul de metileno se asemejan a las de las preparaciones donde ha sido eliminado el endotelio

En conclusión, los resultados de esta primera parte del estudio están acordes con los resultados reportados en la literatura y dieron la certeza de que el dispositivo y las condiciones experimentales utilizadas son adecuadas para el tipo de investigación que se llevó a cabo.

Parte II

Análisis experimental del papel del Ca^{2+} en las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio.

La disminución gradual de la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular produjo una disociación, también gradual, de la contractura, inducida por la fenilefrina en dos componentes. En un medio "nominalmente" sin Ca^{2+} sólo se observó un desarrollo pequeño y transitorio de tensión en respuesta a la fenilefrina. Estos resultados sugieren las contracturas inducidas por la fenilefrina dependen de manera muy importante, de la presencia del Ca^{2+} extracelular. Los resultados también sugieren que el componente inicial transitorio, de la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina es debido a la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, mientras que el segundo componente, que determina la magnitud máxima y la fase estable de esta contractura, se debe a Ca^{2+} que proviene del medio externo.

En presencia de Co^{2+} (3 mM) o de Ni^{2+} (3 ó 5 mM), los anillos aórticos con o sin endotelio, sólo respondieron a la fenilefrina con un desarrollo de tensión pequeño y transitorio, muy similar a aquel observado en una solución sin Ca^{2+} . Además, cuando uno de estos bloqueadores era aplicado durante la contractura inducida por la fenilefrina se observaba una relajación lenta hasta alcanzar la tensión basal. Esto apoya la hipótesis de que el influjo transmembranal de Ca^{2+} a través de canales permeables al Ca^{2+} participa de manera muy importante en el desarrollo y mantenimiento de la tensión en estas contracturas. A concentraciones de Ni^{2+} de 180 y 360 μM , no se observó efecto alguno sobre el desarrollo de

tensión inducido por la fenilefrina. Esta observación permite descartar que los canales de Ca^{2+} tipo T jueguen un papel importante en las contracturas inducidas por la fenilefrina, ya que a estas concentraciones el Ni^{2+} bloquea únicamente este tipo de canales.

En los anillos con y sin endotelio preincubados con la neomicina, la tensión máxima inducida por la fenilefrina fue aproximadamente 20 % menor que la observada en ausencia de neomicina. Cuando la neomicina fue aplicada durante la contractura inducida por la fenilefrina se observó una disminución de la tensión, equivalente a aproximadamente el 70 % de la tensión máxima. Cuando, en un medio sin Ca^{2+} , se aplicó la fenilefrina en presencia de la neomicina, se observaba una inhibición importante del desarrollo de tensión transitorio inducido por este agonista.

Reportes previos han demostrado que la neomicina, no obstante su carácter altamente polar, es capaz de inhibir a la PLC, e impedir la formación de IP_3 , en diferentes tipos de preparaciones con la membrana plasmática intacta lo que a su vez impide indirectamente la liberación de Ca^{2+} inducida por el IP_3 (Balda y col., 1991; Suyama y col., 1994; Hamada y col., 1993). De acuerdo a estos antecedentes, los presentes resultados sugieren que el Ca^{2+} proveniente de la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 participa en el desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina.

Estudios previos en células de músculo liso vascular han mostrado que la fenilefrina estimula la generación de IP_3 (Morgan y col., 1985) y que al parecer, la formación de IP_3 es lo suficientemente rápida para que éste pudiera ser el responsable de la liberación de Ca^{2+} que inicia el desarrollo de tensión en este tejido. Es importante señalar que la formación de IP_3 es transitoria y que ésta regresa a sus niveles basales, mientras se alcanza la fase tónica del desarrollo de tensión (Morgan y col., 1985). Este dato apoya la idea de que el IP_3 está involucrado fundamentalmente en la fase inicial de la respuesta contráctil. Esto está de acuerdo con la naturaleza transitoria del cambio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado durante la estimulación del músculo liso con fenilefrina (Morgan y col., 1985). Por

otro lado, cabe mencionar que Langlands y col. (1990), reportaron que en la aorta de la rata, la fenilefrina (10 nM), inducía una marcada contracción (casi 50 % de la máxima) en una solución con calcio normal sin ningún cambio detectable en el contenido de IP_3 , sugiriendo que la contracción podía ocurrir por un mecanismo independiente del IP_3 . Estos mismos autores ya habían reportado que la inhibición de la generación de IP_3 en el músculo traqueal de cobayo no alteraba significativamente la respuesta contráctil (Langlands y col., 1989), sugiriendo que la formación de IP_3 podía no ser el único mecanismo involucrado en determinar la magnitud de la contracción.

La aplicación de procaina antes de la exposición a la fenilefrina no modificó significativamente el desarrollo de tensión inducido por dicho agonista tanto en los anillos con endotelio como aquellos sin endotelio. Sin embargo, cuando la procaina fue aplicada durante la contractura inducida por la fenilefrina, en la mayoría de los experimentos (7 de 10) produjo una relajación lenta, cuya magnitud fue equivalente a aproximadamente un 30 % de la tensión máxima desarrollada. Esta relajación no fue sostenida, es decir, revertía al cabo de varios minutos (5 - 10). Estos resultados sugieren que la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} no es indispensable en el desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina. Sin embargo, este mecanismo de liberación de Ca^{2+} participa, al parecer en el mantenimiento de la tensión.

Al parecer, la fase inicial transitoria de las contracturas inducidas por la fenilefrina se origina fundamentalmente por la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares y, en dicho proceso participan probablemente por igual la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 y la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . Esta interpretación se apoya en los resultados observados con la adición simultánea de la neomicina y de la procaina la cual abolió, en los anillos con o sin endotelio, la respuesta contráctil transitoria inducida por la fenilefrina en un medio sin Ca^{2+} .

En conclusión los resultados de esta fase de la segunda parte del estudio muestran que las contracturas inducidas por la fenilefrina están constituidas por dos componentes, uno inicial transitorio, seguido de un componente tónico que,

en presencia de Ca^{2+} , persiste mientras esté presente el agonista. El componente transitorio se origina por la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares y el tónico, por el influjo transmembranal de Ca^{2+} a través de canales permeables a este ion. El componente atribuido a la liberación de Ca^{2+} a su vez, está constituido por la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 y la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

Los presentes resultados sugieren además, que aunque es probable que en un medio sin Ca^{2+} la liberación de Ca^{2+} intracelular sea la responsable de generar la contracción en el músculo liso vascular, en presencia de Ca^{2+} extracelular, el influjo de Ca^{2+} podría ser más importante que la liberación intracelular de Ca^{2+} (ya sea inducida por IP_3 o inducida por Ca^{2+}), en mantener y regular la magnitud de la respuesta contráctil.

En general las interpretaciones de los resultados de esta fase del estudio concuerdan con los resultados obtenidos por diversos investigadores con diversos métodos incluyendo el uso de indicadores fluorescentes para medir los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidos por diversos agonistas en el músculo liso vascular.

Los resultados de los experimentos en los que se redujo gradualmente la concentración de Ca^{2+} en la solución relajante confirmaron las observaciones de otros investigadores (Furchgott y col., 1980; Peach y col., 1987) quienes ya habían reportado que las relajaciones inducidas por el carbacol dependen de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular. De estas observaciones se originó la hipótesis de que el influjo transmembranal de Ca^{2+} juega un papel importante en la síntesis y liberación del NO. Esta hipótesis a su vez, dio lugar a la búsqueda de evidencias experimentales de la existencia de canales permeables al Ca^{2+} en la membrana de las células endoteliales.

En el presente estudio se utilizaron como herramientas para analizar la posible participación del influjo transmembranal de Ca^{2+} a través de canales en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, indispensable para activar la isoforma endotelial de la sintasa del NO, dos bloqueadores inorgánicos de canales de Ca^{2+} , el Co^{2+} y el Ni^{2+} (Hagiwara y col., 1967; Kohlhardt y col., 1973).

Como ya se discutió al analizar los resultados de la primera parte de este estudio, la fase sostenida del desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina es causada fundamentalmente por el influjo de Ca^{2+} a través de canales que son bloqueados por estos mismos cationes, los cuales consecuentemente inducen una relajación de la contractura provocada por dicho agonista. Por lo tanto, independientemente de su posible efecto sobre el endotelio, estos cationes previenen, por una parte, la fase tónica del desarrollo de tensión inducido por la fenilefrina y, por la otra, cuando se aplican durante dicha fase inducen una relajación. Estos efectos directos sobre el músculo liso vascular limitan el uso de estos cationes y complican la interpretación de sus efectos.

La observación de que la adición de Co^{2+} a la solución de Tyrode produjo un ligero incremento en la tensión basal de los anillos con endotelio sugiere que, tal y como ha sido propuesto en otros estudios (Lues y col., 1984; Godfraind y col., 1985; Martin y col., 1986; Bullock y col., 1986), hay una liberación basal del NO, y que ésta se debe a un influjo de Ca^{2+} a través de canales que pueden ser bloqueados por el Co^{2+} .

El desarrollo de tensión que se observó cuando se aplicó el Co^{2+} durante la relajación máxima inducida por el carbacol o por la histamina puede ser explicado proponiendo que esta relajación requiere del influjo transmembranal sostenido de Ca^{2+} y que éste se realiza a través de canales que pueden ser bloqueados por el Co^{2+} . El carácter transitorio del desarrollo de tensión se explicaría por el efecto relajante directo del Co^{2+} sobre el músculo liso. Esta interpretación implicaría que la fase sostenida de la relajación inducida por el ATP no requiere del influjo de Ca^{2+} ya que durante esta relajación la adición de Co^{2+} no tuvo efectos significativos.

El desarrollo transitorio de tensión inducido, en los anillos con endotelio, por la adición de Co^{2+} durante la relajación inducida por el nitroprusiato de sodio podría ser explicado por el posible efecto del Co^{2+} sobre la liberación basal del NO por el endotelio.

La interpretación precedente de los efectos observados durante la exposición de los anillos con endotelio al Co^{2+} se basa en la suposición de que los efectos del Co^{2+} fueron causados por su acción bloqueadora de canales permeables al Ca^{2+} . De acuerdo con dicha suposición, el Ni^{2+} (a concentración milimolar) debería producir efectos muy similares a los observados con el Co^{2+} puesto que se ha demostrado que este catión bloquea el influjo transmembranal de Ca^{2+} en muy diversas preparaciones endoteliales (Jacob, 1990; Graier y col., 1995; Buchan y col., 1991; Alvarez y col., 1992; Rusko y col., 1992; Hallam y col., 1988; 1990; Rotrosen y col., 1986; Colden-Stanfield y col., 1987;). Sin embargo, tal predicción no se cumplió ya que, en presencia de Ni^{2+} , no se modificaron significativamente las relajaciones inducidas (en anillos con endotelio) por el carbacol, la histamina, el ATP o el nitroprusiato de sodio. Esta discrepancia sugiere que los efectos observados durante la exposición al Co^{2+} pudieran no estar relacionados con el bloqueo de canales permeables al Ca^{2+} . A este respecto cabe mencionar que se ha reportado que el Co^{2+} , mas no el Ni^{2+} , incrementa marcadamente la degradación oxidativa del heme (Maines, 1975). Por otra parte, el efecto relajante del NO está mediado por el incremento en el GMPc producido por la activación de la guanilato ciclasa inducida por la unión del NO al grupo heme de dicha enzima. Es, por lo tanto, factible que la inhibición, que se observó con el Co^{2+} , de las relajaciones inducidas por el carbacol, la histamina, o el nitroprusiato de sodio (en anillos con endotelio) pudiera estar relacionada con una inhibición de la guanilato ciclasa.

Aunque en presencia de Ni^{2+} no se observaron efectos significativos sobre las relajaciones inducidas por los diferentes agentes vasodilatadores, la exposición al Ni^{2+} deprimió marcadamente el efecto relajante del carbacol y de la histamina (y muy ligeramente la relajación inducida por el ATP) cuando dicho efecto relajante se exploró después de retirar el Ni^{2+} y lavar las preparaciones con solución de Tyrode. Esta acción inhibitoria residual fue también observada después de la exposición al Co^{2+} y en el caso de ambos cationes, sólo revirtió parcialmente después de varias horas de haber suspendido la exposición a los

mismos. En contraste con esta acción inhibitoria residual y persistente del Co^{2+} y del Ni^{2+} sobre las respuestas relajantes dependientes del endotelio, los efectos de estos cationes sobre la contractura inducida por la fenilefrina fueron siempre rápidamente revertidos, tanto en los anillos con endotelio como en aquellos sin endotelio. Esta observación permite descartar un lavado inadecuado o un la eventual precipitación de dichos cationes como causantes de la inhibición residual. En la revisión de la literatura sobre los efectos del Co^{2+} y del Ni^{2+} no se encontró mención alguna en relación a efectos inhibitorios residuales prolongados de estos cationes, por lo que no es posible proponer una explicación plausible de este efecto.

Recientemente se describió que la depleción de los depósitos intracelulares de calcio activa los canales permeables al Ca^{2+} en la membrana plasmática (Gericke y col., 1993; Vaca y col., 1994; Graier y col., 1994). Existen varias hipótesis que podrían explicar los mecanismos que regulan el influjo de Ca^{2+} dependiente del grado de llenado de los depósitos intracelulares.

El modelo "capacitativo" de entrada de Ca^{2+} mediada por receptor (Putney y col., 1986) proponía el control de la elevación bifásica en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las plaquetas, por un sólo mensajero intracelular, el IP_3 . En este modelo la unión del agonista al receptor iniciaba la producción de IP_3 , el cual liberaba Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. El vaciamiento de los depósitos activaba la entrada de Ca^{2+} . En el modelo original de Putney, el Ca^{2+} entraba a la célula a una zona restringida entre el depósito sensible al IP_3 y la membrana plasmática, y entonces era bombeado por una ATPasa de Ca^{2+} hacia la luz del depósito. El Ca^{2+} podía entrar únicamente al citosol después de un estímulo continuo de descarga. Datos más recientes en células lagrimales (Kwan y col., 1990), células pancreáticas (Muallem y col., 1990) y células parotídeas (Mertz y col., 1990) sugieren que la descarga de los depósitos intracelulares inducida por agonistas, promueve la entrada de Ca^{2+} extracelular directamente al citosol, con el subsecuente secuestro hacia los depósitos sensibles a IP_3 .

La tapsigargina (TG), la 2-di-(t-butil)-1,4-benzohidroquinona (tBuBHQ), inhibidores de la captura de Ca^{2+} hacia el retículo endoplásmico, por inhibición de la ATPasa (Jackson y col., 1988, Kass, y col., 1989), se han utilizado para inducir la depleción de los depósitos, y promover así el influjo de Ca^{2+} en diferentes tipos celulares (Takemura y col., 1989, Verma y col., 1990, Middleton y col., 1990, Ely y col., 1991), y de esta manera analizar las rutas por las cuales entra el Ca^{2+} y los subsecuentes mecanismos que operan para restaurar la permeabilidad al Ca^{2+} de la membrana plasmática a su nivel basal.

Irvine (1990) propuso un modelo, en el cual las proteínas que funcionan como receptores para el IP_3 y para su producto fosforilado, el IP_4 , funcionarían como el punto de unión en el espacio comprendido entre los depósitos intracelulares y la membrana plasmática. Estos dos receptores en las células no excitables, podrían parecerse a los receptores a la ryanodina y a las dihidropiridinas, a los cuales se les ha atribuido ser los responsables de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico en el acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético. Este autor sugiere que, el IP_3 , el IP_4 , y el vaciamiento de los depósitos intracelulares juntos, promueven la disociación de las dos proteínas, induciendo el influjo de Ca^{2+} . Este modelo podría explicar el aparente acoplamiento rápido entre la liberación de Ca^{2+} y la segunda fase del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ atribuida al influjo de Ca^{2+} observada en las plaquetas estimuladas con ADP (Sage y col., 1990). Sin embargo, aún no hay evidencia experimental que apoye directamente esta hipótesis en las plaquetas o en otro tipo de células.

Por otro lado, se ha sugerido, recientemente, que el Ca^{2+} libre citosólico y el almacenado pueden controlar antagonísticamente la fosforilación de proteínas específicas plaquetarias, las cuales pueden regular la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+} (Vostal y col., 1991). Se ha propuesto que la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, activa a una tirosin-cinasa, conduciendo al incremento en la entrada de Ca^{2+} y que el llenado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , inhibe a la cinasa, lo que produce una reducción en la permeabilidad de la membrana

plasmática al Ca^{2+} . Tal sistema podría participar en la regulación de la entrada de Ca^{2+} por el vaciamiento de los depósitos intracelulares, aunque no ha sido probada la contribución de tal mecanismo para eventos inducidos por agonistas.

En contraste, el grupo de García-Sancho, sugiere que el punto de unión entre la depleción de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y el incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+} puede ser la citocromo P-450, o algún metabolito de ella (Alvarez y col., 1991, Montero y col., 1991, Alonso y col., 1991). Estos investigadores propusieron que el incremento en los niveles de Ca^{2+} dentro de los depósitos intracelulares inhibe a la citocromo P-450, a través de un mecanismo dependiente de la calmodulina. La desinhibición de la citocromo P-450 podría ocurrir cuando disminuye la concentración de Ca^{2+} dentro de los depósitos debido a la estimulación por agonistas. La citocromo P-450 activada, o uno de sus metabolitos, incrementaría entonces la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+} . Como el Ca^{2+} vuelve a entrar a los depósitos, la calmodulina podría fijar Ca^{2+} una vez más, inhibiendo a la citocromo P-450, y consecuentemente, regresaría a sus niveles basales la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} .

Se ha demostrado que la mono oxigenasa P-450 (MO P450) microsomal produce algunos ácidos epoxieicosatrienoicos, entre los cuales se encuentra el ácido 5,6-EET, metabolito del ácido araquidónico en una vía dependiente de la NADPH (Fritzpatrick y col., 1989). Graier y col., (1995) encontraron que el 5,6-EET incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]$, a una magnitud similar a aquella inducida por la bradicinina o por la TG. Estos autores propusieron el siguiente modelo para explicar el influjo de Ca^{2+} activado por la depleción de los depósitos intracelulares: la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} por agonistas tales como la bradicinina, vía mecanismos dependientes de IP_3 , produce la activación de la MO P450, esta enzima utiliza ácido araquidónico, el cual es liberado por el Ca^{2+} y/o por la fosfolipasa A_2 (activada por una proteína G) y a partir de éste sintetiza ácidos epoxieicosatrienoicos. Uno de estos metabolitos, el 5,6-EET, o un metabolito del 5,6-EET podría abrir directamente o vía un paso intermediario, canales permeables al Ca^{2+} y quizá también canales de K^+ .

Los resultados del presente estudio, en concordancia con los antecedentes descritos también sugieren que en las relajaciones inducidas por el carbacol, la histamina, o el ATP, el influjo de Ca^{2+} no es el responsable directo del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que conduce a la síntesis/liberación del NO, y consecuentemente a la relajación, y que el papel del influjo transmembranal de Ca^{2+} es el de llenar los depósitos intracelulares que fueron "vaciados" por la estimulación con los agonistas. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que induce la síntesis de NO proviene fundamentalmente de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. Esta propuesta se basa en la ausencia de efectos inmediatos del Ni^{2+} (sobre las relajaciones inducidas por el carbacol, la histamina, y el ATP).

Por otro lado, ni el Ni^{2+} ni el Co^{2+} tuvieron efecto significativos sobre las relajaciones inducidas por el ATP. El Co^{2+} produjo solamente un pequeño desarrollo transitorio de tensión cuando fue aplicado durante la relajación inducida por el ATP, y las preparaciones que habían sido expuestas a este ión presentaban una relajación más lenta en respuesta al ATP. Estas observaciones sugieren que los mecanismos responsables de la relajación inducida por el ATP son diferentes a aquellos involucrados en las relajaciones inducidas por el carbacol o por la histamina.

Con cualquiera de los esquemas de aplicación utilizados la procaína inhibió completamente las relajaciones inducidas por el carbacol. Tales efectos fueron rápidamente reversibles después de retirar dicho fármaco. Este efecto podría ser explicado por la suposición de que la procaína actúa como un antagonista de los receptores muscarínicos. Sin embargo, tal acción de la procaína es poco probable, puesto que se ha demostrado (Cuevas, 1994) que la procaína en células ganglionares parasimpáticas bloquea los receptores nicotínicos a la acetilcolina pero no los receptores muscarínicos.

En las células endoteliales se han descrito tanto depósitos de Ca^{2+} liberable sensibles al IP_3 como depósitos sensibles a la cafeína. En contraste con los depósitos sensibles al IP_3 que han sido ampliamente estudiados, la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (es decir, desde depósitos sensibles a la cafeína) ha sido

muy poco analizada. Además, los reportes acerca de su existencia e importancia en el endotelio vascular son controversiales. Schilling y col., (1992) reportaron que la cafeína no producía incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ y Chu y col., (1990) no encontraron sitio alguno de unión a la ryanodina en membranas endoteliales. Buchan y col., (1991) encontraron que la cafeína incrementaba levemente la $[Ca^{2+}]_i$ en células endoteliales cultivadas

Recientemente fue demostrada la presencia del receptor a la ryanodina en el endotelio vascular y el endotelio endocárdico (Lesh y col., 1993). Se ha demostrado que la ryanodina se fija a los canales de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (Pessa y col., 1985, Fleischer S., y col., 1985) y altera las propiedades de dicho canal. A bajas concentraciones, la ryanodina conserva los canales de liberación de Ca^{2+} en un estado abierto (Fleischer y col., 1985, Meissner 1986, Lattanzio 1987, Rardon 1989) causando la liberación del Ca^{2+} (Hansford y col., 1987). R.C. Ziegelstein y col. (1994), demostraron la presencia de depósitos de Ca^{2+} funcionales sensibles a la ryanodina en las células endoteliales. Al parecer, estos depósitos, al igual que aquellos sensibles al IP_3 , están involucrados en la regulación de los compartimientos de Ca^{2+} sensibles a agonistas.

Por otro lado, se reportó que, en células endoteliales, la cafeína produce una hiperpolarización causada por una corriente de K^+ activada por un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, y que la ryanodina prevenía dicha hiperpolarización, indicando que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ endotelial es debido a un mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , (Chen y col., 1992, Adams y col., 1993).

Graier y col., (1994), encontraron en células endoteliales coronarias de cerdo, que después de un pretratamiento breve con ryanodina, la cafeína ya no producía un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Esto sugería que la cafeína realmente actúa vía un mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} en las células endoteliales.

Los resultados del presente estudio sugieren que en las relajaciones inducidas por el carbacol, el componente atribuido a la liberación de Ca^{2+} , está

constituido fundamentalmente por liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , ya que la procaína (bloqueador de este mecanismo de liberación de Ca^{2+}) inhibió completamente dichas relajaciones. En las relajaciones inducidas por la histamina, este mecanismo de liberación de Ca^{2+} participa al parecer de manera parcial, ya que la procaína inhibió tales relajaciones sólo en un 40 % aproximadamente. Por otra parte, en las relajaciones inducidas por el ATP la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} no parece jugar un papel importante.

Aunque se ha demostrado que precediendo al componente inicial del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por diversos agonistas que inducen la síntesis del NO, hay un aumento en la concentración de IP_3 , la neomicina (inhibidor indirecto de la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3) no tuvo efecto alguno sobre las relajaciones inducidas por el carbacol, la histamina o el ATP. Podría pensarse que esta ausencia de efectos de la neomicina es debida a que ésta, por su carácter policatiónico, no puede atravesar la membrana plasmática y que por ello no puede inhibir la formación de IP_3 por la PLC. Sin embargo, se ha demostrado que la neomicina inhibe a la PLC en preparaciones con la membrana plasmática intacta, (Balda y col., 1991; Suyama y col., 1994; Hamada y col., 1993). Además, en el presente estudio, la neomicina produjo una inhibición importante de la tensión inducida por la fenilefrina en los anillos aórticos.

Por lo tanto, la ausencia de efectos de la neomicina sugiere que aunque la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 participa normalmente en las relajaciones inducidas por el carbacol, la histamina o el ATP, cuando este mecanismo está inhibido o ausente, tanto el influjo transmembranal de Ca^{2+} como la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} pueden compensar eficientemente dicha ausencia, de tal manera que no se altera el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que induce la síntesis de NO.

En conclusión, los resultados de esta parte del estudio sugieren que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el carbacol, la histamina o el ATP, se origina por la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , y por liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 y que el influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es indispensable para volver a llenar los depósitos después de que el Ca^{2+} ha sido liberado. Los

resultados sugieren, también, que en la relajación inducida por el carbacol predomina la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

Parte III

Análisis de la participación de factores hormonales en la modulación del tono vascular dependiente del endotelio.

Una de las estrategias extensivamente usada, para dilucidar los mecanismos responsables del efecto protector de los estrógenos realizan su papel en el sistema vascular, ha consistido en explorar, en vasos aislados, los efectos de estas hormonas sobre las respuestas "in vitro", a diversos agentes vasoactivos. Los resultados de estos estudios son controversiales, lo que puede ser explicado parcialmente por diferencias en los modelos experimentales utilizados. Estas incluyen el uso de diferentes especies y de diferentes vasos, la evaluación de diferentes agentes vasoactivos, diferencias en el método de medición de las respuestas vasculares "in vitro" y diferencias en los esquemas del tratamiento estrogénico. En el presente estudio se analizaron los efectos de los estrógenos sobre la respuesta de la aorta de la rata al vasoconstrictor-fenilefrina y al vasodilatador -carbacol. Se seleccionó la fenilefrina, un agonista selectivo de los receptores adrenérgicos α_1 , considerando que éste activa al músculo liso vascular sin inducir simultáneamente la liberación, mediada por receptor, de sustancias vasoactivas del endotelio. Esta suposición está basada en la ausencia presuntiva de receptores adrenérgicos α_1 en esta estructura (Cocks, y col., 1983). Se seleccionó el carbacol debido a que este fármaco induce consistentemente, relajaciones dependientes del endotelio mediadas por el NO, en la aorta aislada de la rata y carece de efectos, en los vasos sin endotelio funcional (Furchgott, y col., 1980). Además, no hay evidencias de la liberación de metabolitos del ácido araquidónico inducida por el carbacol. Con respecto a la medición "in vitro" de las respuestas vasculares, el método utilizado en este estudio difiere de aquellos usados por otros autores. Los vasos fueron perfundidos continuamente en una pequeña cámara de perfusión en la cual fueron montados dos anillos (con y sin endotelio) provenientes de la misma aorta. Este sistema tenía las siguientes ventajas: 1.- La solución de perfusión, era renovada continuamente lo que permitía el lavado continuo de las preparaciones, impidiendo la acumulación de

productos del metabolismo de éstas o los productos de degradación de los fármacos aplicados 2.- El pequeño volumen de la cámara de perfusión (1 ml) permitía el recambio rápido de las soluciones. 3.- El hecho de que dos preparaciones (con y sin endotelio) provenientes del mismo animal, estuvieran en la misma cámara de perfusión permitía someter a las mismas condiciones experimentales, lo que permitía identificar las respuestas dependientes del endotelio. En cuanto al tratamiento estrogénico, se utilizaron dos esquemas: tratamiento crónico *in vivo* y tratamiento agudo *in vitro*. El tratamiento crónico consistió en la administración subcutánea de una sola dosis de 17-estearato de estradiol . De acuerdo a Vázquez-Alcántara y col. (1985, 1989), este procedimiento asegura una actividad estrogénica prolongada evidenciada por la citología vaginal, la acción uterotrófica, la inhibición de las gonadotrofinas séricas y los niveles séricos de 17 β -estradiol. La exposición aguda a los estrógenos se realizó por la adición de 17 β -estradiol a las soluciones de perfusión.

Los anillos con endotelio provenientes de las ratas tratadas con estrógenos, desarrollaron menor tensión en respuesta a la fenilefrina que los anillos correspondientes, provenientes de ratas ovariectomizadas. Esta diferencia fue incrementada marcadamente en presencia de indometacina, y no se observó después de la adición de L-NAME a las soluciones de perfusión. Por otro lado, no se observaron diferencias entre las respuestas contráctiles a la fenilefrina de los anillos sin endotelio funcional, provenientes de ratas tratadas o no tratadas. La indometacina no modificó la contracción inducida por la fenilefrina de anillos sin endotelio en ninguno de los grupos. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento estrogénico crónico de las ratas ovariectomizadas incrementa en el endotelio de la aorta, la síntesis y la liberación basal tanto de óxido nítrico (NO) como de un metabolito vasoconstrictor del ácido araquidónico dependiente de la ciclooxigenasa.

La suposición de que los estrógenos incrementan la liberación basal de NO está de acuerdo con los resultados de Hayashi y col., (1992) quienes encontraron que la liberación basal (pero dependiente del tono) de NO es mayor en anillos

aórticos con endotelio intacto provenientes de conejas que en aquellos provenientes ya sea de animales ovariectomizados o de machos. Los resultados también están de acuerdo con el reporte reciente de Weiner y col., (1994), quienes demostraron que el tratamiento con estradiol (y el embarazo) incrementa tanto la actividad de la sintasa del NO dependiente de calcio, en la arteria uterina y en diferentes órganos del cobayo, como la cantidad de mRNA de la sintasa constitutiva (tanto endotelial como neuronal) del óxido nítrico, en el músculo esquelético. Este último hallazgo, sugiere fuertemente que los estrógenos pueden incrementar la liberación basal de NO por inducción de la enzima. Si este fuera el caso y puesto que la inducción de la enzima requiere de un tiempo relativamente largo, esto podría explicar el hallazgo de que la exposición aguda al 17β -estradiol carece de efectos sobre las respuestas contráctiles a la fenilefrina de los anillos aórticos provenientes de ratas ovariectomizadas no tratadas y preincubadas con indometacina.

La propuesta de que el tratamiento crónico con estrógenos también puede incrementar la síntesis de prostanoides vasoconstrictores dependientes de la ciclooxigenasa concuerda con los hallazgos de Miller, y col. (1990). Estos autores, reportaron que las contracciones inducidas por el ácido araquidónico y dependientes del endotelio y de la ciclooxigenasa, de anillos aórticos provenientes de conejos ovariectomizados tratados con estrógenos, eran mayores que aquellas de vasos de animales no tratados. Los autores observaron, además en el mismo vaso, un incremento en la sensibilidad a la norepinefrina dependiente de la ciclooxigenasa y del endotelio. Basados en estos resultados ellos concluyeron que "bajo la influencia de los estrógenos la norepinefrina debe estimular el metabolismo del ácido araquidónico en las células endoteliales, lo que a su vez mejora la contracción inducida por el agonista adrenérgico en el músculo liso vascular". Esta conclusión tomada en conjunto con la evidencia, ya discutida, obtenida por Hayashi y col., (1992), podría significar que, tal y como lo sugieren los resultados del presente estudio, también en la aorta de conejo los estrógenos

incrementan, la síntesis y la liberación tanto de NO como de un vasoconstrictor dependiente de la ciclooxigenasa.

El tratamiento estrogénico, tanto crónico como agudo, incrementó significativamente la relajación dependiente del endotelio inducida por el carbacol en los anillos aórticos precontraídos con fenilefrina. La indometacina no tuvo efectos sobre la relajación inducida por el carbacol en los vasos provenientes de animales tratados o no tratados. Puesto que está bien documentado, que la activación de los receptores muscarínicos endoteliales induce la síntesis y liberación de NO (Furchgott, y col., 1980), estos resultados indican que el tratamiento estrogénico, incrementa en el endotelio de la aorta de la rata la liberación de NO mediada por receptor. Con respecto a los efectos del tratamiento estrogénico sobre la liberación de NO mediada por receptor, se ha alcanzado la misma conclusión en varios estudios previos. Gisclard, y col., (1988) reportaron que las arterias femorales de conejas tratadas con 17β -estradiol, muestran un incremento en la relajación dependiente del endotelio en respuesta a bajas dosis de acetilcolina. Weiner y col., (1989, 1991), observaron que las relajaciones inducidas por la acetilcolina, y mediadas por el NO, en arterias uterinas y carótidas del cobayo se incrementan durante el embarazo. Williams y col., (1990), reportaron que las arterias coronarias ateroscleróticas "in situ" de monas cynomolgus ovariectomizadas respondían a la infusión intracoronaria de acetilcolina con constricción *paradójica*, y que el tratamiento crónico con estrógenos revertía la constricción a una dilatación moderada. Keany y col., (1994), observaron que el tratamiento estrogénico crónico de cerdos miniatura hipercolesterolémicos ovariectomizados, preservaba la relajación dependiente del endotelio de anillos de arteria coronaria, inducida por la bradicinina y la substancia P, mientras que, los vasos de animales no tratados presentaban alteración en las relajaciones inducidas por estos agonistas.

Cabe mencionar, sin embargo, que también hay estudios que reportan que el tratamiento estrogénico crónico no tiene efectos sobre la liberación de NO

mediada por receptor. Miller y Vanhoutte (1990) no observaron diferencias entre las relajaciones inducidas por la acetilcolina en aortas provenientes de conejas ovariectomizadas tratadas con estrógenos como no tratadas. Miller y Vanhoutte (1991) reportaron que las relajaciones mediadas por receptor de arterias coronarias de perras ovariectomizadas en respuesta a los vasodilatadores dependientes del endotelio, acetilcolina, difosfato de adenosina, y bradicinina, eran similares en vasos provenientes de animales tratados o no tratados; sin embargo, observaron incrementos en las relajaciones dependientes del endotelio en respuesta al agonista adrenérgico α_2 , el BHT-920, en los vasos de animales tratados con estrógenos. Hayashi y col., (1992) no encontraron diferencias significativas en la respuesta a la acetilcolina de anillos aórticos provenientes de conejos, de conejas con ovarios intactos, o de conejas ovariectomizadas.

Una relajación dependiente del endotelio mediada por receptor después del tratamiento estrogénico a corto plazo ha sido ya reportada previamente. Williams y col., (1992) observaron que las arterias coronarias ateroscleróticas "in situ" de monas cynomolgus ovariectomizadas, que respondían con constricción a la infusión intracoronaria de acetilcolina, respondían con vasodilatación a este agonista después 20 min. de una inyección I.V. de etinil estradiol. Reis y col. (1994) observaron en arterias coronarias de mujeres postmenopáusicas, una disminución en el tono vasomotor basal y una atenuación de la respuesta vasomotora anormal a la acetilcolina, 15 min. después de la administración intravenosa de etinil estradiol.

El mecanismo por el cual los estrógenos incrementan la liberación de NO mediada por receptor no es clara. En la mayoría de los estudios arriba mencionados, se observó que la relajación dependiente del endotelio inducida por el A23187 en los vasos no era alterada por los estrógenos (Gisclard y col., 1988; Miller y Vanhoutte, 1991; Keany y col., 1994). Este ionóforo de calcio estimula la síntesis y liberación del NO por un incremento independiente de receptores, de el

calcio intracelular que, a su vez, activa a la sintasa endotelial dependiente de el calcio. Por lo tanto la ausencia de efectos de los estrógenos sobre la relajación inducida por el A23187 sugiere que el incremento de la relajación mediada por receptor no es mediada por un incremento en la actividad de la sintasa del NO. El incremento en la relajación mediada por receptor observada después de la exposición durante períodos breves al estradiol tampoco apoya la hipótesis de que los estrógenos sobre la liberación de NO mediada por receptor sea causada por una inducción de la enzima. Gisclard y col., (1988) y Weiner y col., (1991) propusieron una alteración de la actividad de los receptores muscarínicos como un posible mecanismo para explicar el incremento en la respuesta relajante a la acetilcolina observada después del tratamiento estrogénico. Alternativamente, podría estar involucrado el acoplamiento entre el receptor y la activación de la enzima. A este respecto, podría ser de interés investigar si el tratamiento estrogénico modifica el metabolismo de los fosfoinositoles y la liberación de calcio mediada por 1,4,5-trifosfato de inositol desde depósitos intracelulares en las células endoteliales. Recientemente se reportó un incremento en la actividad de la enzima fosfolipasa C del 4,5-bifosfato de fosfatidil inositol, después de la adición por un período breve de tiempo de 17β -estradiol a cultivos de células MCF-7 de cáncer de mamario humanos a homogeinados de dichas células.

REFERENCIAS

- Adachi M., Kakubari M., Ohizumi Y. The specific binding site of 9(3H) methyl-7-bromoeudistomin D a caffeine-like Ca^{2+} releaser, in liver microsomes is distinct from that in skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 375: 183-187, 1994
- Adams D.J., Barakeh J., Laskey R., van Breemen C. Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 3: 2389-2400, 1989.
- Adams D. J., Nutter T. J. Calcium permeability and modulation of nicotinic acetylcholine receptor-channels in rat parasympathetic neurons. *J. Physiol. Paris (France)*. 86(1-3) 67-76, 1993.
- Alonso M. T., Alvarez J., Montero M., Sanchez A., García-Sancho J. Agonist-induced Ca^{2+} influx into human platelets is secondary to the emptying of intracellular Ca^{2+} stores. *Biochem. J.* 280: 783-789, 1991.
- Alvarez J., Montero M., García-Sancho J. Cytochrome P-450 may link intracellular Ca^{2+} stores with plasma membrane Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* 274: 193-197, 1991.
- Alvarez J., Montero M., Garcia-Sancho J. High affinity inhibition of Ca^{2+} -dependent K^+ channels by cytochrome P-450 inhibitors. *J. Biol. Chem.* 267, 11789-11793, 1992.
- Amber I.J., Hibbs J.B., Taintor R.R., Vavrin Z. Cytokines induce an L-arginine-dependent effector system in nonmacrophage cells. *In Vitro Cell Develop Biol.* 24: 871-877, 1988.
- Anastos K., Charney P., Charon R. A., Cohen E., Jones C. Y., Marte C., Swiderski D.M., Wheat M. E., Williams S. Hypertension in women what is really known? The women's Caucus, working group on women's health of the Society of General Internal Medicine. *Ann. Intern. Med.* 115-287, 1991
- Ando J., Komatsuda T., Kamiyama A. Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular cells. *In Vitro Cell Develop Biol.* 24:871-877, 1988.
- Balda M.S. Gonzalez-Mariscal L., R.G. Contreras, Maclas Silva M., Torres - Márquez M.E., Garcia Sáinz J.A., Cerejido M. Assembly and sealing of tight junctions: Possible participation of G-proteins, phospholipase C., protein kinase and calmodulin. *J. Membrane Biol.*, 122; 193-202, 1991.
- Barrett-Connor E, Wingard D, Criqui MH, Postmenopausal estrogen use and heart disease risk factors in the 1980s: Rancho Bernardo, Calif., revisited. *J.A.M.A.* 261:2095-2100, 1989.

-Barrett-Connor E, Bush TL. Estrogen and coronary heart disease in women. *J.A.M.A.* 265:1861-1867, 1991.

-Becker R. C. Coronary artery disease in women: risks and prevention. *Coronary Acute Care.* 3: 2-10, 1992.

-Bell C. Oestrogen-induced sensitization of the uterine artery of the guinea pig to acetylcholine. *Br. Pharmacol.* 49, 595-601, 1973.

-Berridge M.J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 159-193, 1987.

-Bird G. S. J., Rossier M. F., Hughes A. R., Shears S. B., Armstrong D. L., Putney J. W. Jr. Activation of Ca^{2+} entry into acinar cells by a non-phosphorylatable inositol trisphosphate. *Nature* 352:162-165, 1991.

-Blacburn C., Highsmith R.F. Nickel inhibits endothelin-induced contractions of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 258(27): C1025-C1030, 1990.

-Blough N.V., Zafiriou O.C. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg. Chem.* 24: 3502-3504, 1985.

-Bossu J.L., Feltz A., Rodeau J.L., Tanzi F. Voltage-dependent transient calcium currents in freshly dissociated capillary endothelial cells. *FEBS Letters* 255: 377-380, 1989.

-Bossu J.L. Elhamdani A., Feltz A., Tanzi F., Aunis D., Thierse D. Voltage-gated Ca^{2+} entry in isolated bovine capillary endothelial cells: evidence of a new type of Bay K 8644-sensitive channel. *Pflugers Arch.* 420: 200-207, 1992.

-Bredt D.S., Glat C. E., Hwang P. M., Fotuhi, M., Dawson T. M., Snyder S. H. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, 7: 615-624, 1991.

-Bregestovski P., Bakhramov A., Danilov S., Moldobaeva A., Takeda K. Histamine induced inward currents in cultured endothelial cells from human umbilical vein. *Brit. J. Pharmacol.* 95: 429-436, 1989

-Buchan K. W., Martin W. Bradykinin induces elevations of cytosolic calcium through mobilization of intracellular and extracellular pools in bovine aortic endothelial cells. *Brit. J. Pharmacol.* 102: 35-40, 1991.

- Bullock G.R., Taylor S.G., Weston A.H. Influence of the vascular endothelium on agonist-induced contractions and relaxations in rat aorta. *Brit. J. Pharmacol.* 89: 819-830, 1986.
- Bush T. L., Barret-Connor E., Cowan L. D., Criqui M. H., Wallace R.B., Suchindran C. M., Tyroler H. A., Rifkind B.M. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation* 75: 1102-09, 1987.
- Bush T.L. The epidemiology of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 592: 263-271, 1990.
- Busse R. Pohl U., Mulsch A., Bassergie E. Modulation of the vasodilator action of SIN-1 by the endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14(suppl. 11): 81-85, 1989.
- Busse R., Mulsch A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Letters* 265:133-136., 1990.
- Cannell B., Sage S.O. Bradykinin-evoked changes in cytosolic calcium and membrane currents in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J. Physiol.* 419: 555-568, 1989.
- Carter T. D., Hallam T.J., Cusack, N. J., Pearson J.D. Regulation of P_{2y}-purinoreceptor-mediated prostacyclin release from human endothelial cells by calcium concentration. *Br. J. Pharmacol.* 95: 1181-1190, 1988.
- Chen G. Suzuki H. Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *J. of Physiol.* 421: 521-534, 1990.
- Chen G., Cheung D. W., Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells. *Circ. Res.* 70: 257-263, 1992
- Chen K. M. Guan Y. Y., Su J. J. Effects of direct lytic factors from southern Chinese cobra venom on Ca²⁺ movement in rabbit aorta strip. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao.*, 14(6): 500-504, 1993
- Cherry P.D., Furchgott R.F., Zawadzki J.V., Jothianandan, D. The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2105-2110, 1982.
- Chu A., Sumbilla C., Inesi G., Jay S. D., Campbell K. P. Specific association of calmodulin-dependent protein kinase and related substrates with the junctional sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochemistry* 29(25): 5899-5905, 1990.

-Cocks TM, Angus JA. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature* 305:627-630, 1983.

-Cocks T. M., Angus J.A. Bioassay of the release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from isolated endothelial cells In Vitro. in *Vascular Neuroeffector Mechanisms* (Bevan J., Godfraind, T., Maxwell R., Stoclet J.C. Worcel, M., eds.) Elsevier, Amsterdam, 1985.

-Cocks T.M., Little P.L. Angus J.A., Cragoe E.J. Amiloride analogues cause endothelium-dependent relaxation in the canine coronary artery in vitro: possible role of Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Brit. J. Pharmacol.* 95: 67-76. 1988.

-Colden-Stanfield M., Schilling W.P., Ritchie A.K., Eskin S.G., Navarro L.T. Kunze D.L. Bradikinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ. Res.* 61:632-640, 1987.

-Colditz AG, Willet WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N. Eng. J. Med.* 316(18):1105-1110, 1987.

-Collins, T., Pober J.S., Gimbrone, M. A., Hammacher A., Betscholtz, C. Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor A chain. *Am. J. Pathol.* 127, 7-12, 1987.

-Crossley Y., Swann K. Chambers E., Whitaker M. Activation of sea urchin eggs by inositol phosphates is independent of external calcium. *Biochem. J.* 252: 257-262, 1988.

-Cuevas J., Adams D.J. Local anesthetic blockade of neuronal nicotinic Ach receptor-channels in rat parasympathetic ganglion cells. *Br. J. Pharmacol.* 111: 663-672, 1994.

Daut J., Mehrke G., Nees S., Newman W.H. Passive electrical properties and electrogenic sodium transport of cultured guinea-pig coronary endothelial cells. *J. Physiol. (London)* 402: 237-254, 1987.

-De Lisle S., Pittlet D., Polter B. V. L., Lew P. D., Welsh M. InsP₃ and Ins(1,3,4,5-)P₄ act in synergy to stimulate influx of extracellular Ca²⁺ in *Xenopus* oocytes. *Am. J. Physiol.* 262, C1456-C1463, 1992.

-De Mey J., Vanhoutte P.M. Endothelium and relaxation of isolated canine arteries. *Pharmacologist* 22: 282, 1980.

- De Mey J., Vanhoutte P.M. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J. Physiol.* 316: 437-455, 1981.
- Demolle D., Lecomte M., Boeynaems, J. M. Pattern of protein phosphorylation in aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 263: 18459-18465, 1988a.
- Demolle, D., Boeynaems J.M. Role of protein kinase C in the control of vascular prostacyclin: study of phorbol esters effect in bovine aortic endothelium and smooth muscle. *Prostaglandins.* 35: 243-255, 1988b.
- De Nucci G., Gryglewski, R.J., Warner T.D., Vane J.R. Receptor mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2334-2338, 1988.
- Derian C.K., Moskowitz M.A. Polyphosphoinositide hydrolysis in endothelial cells and carotid artery segments. *J Biol. Chem.* 261: 3831-383, 1986.
- Diamond J., Chu E.B. Possible role of cycle GMP in endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta by acetylcholine. Comparison with nitroglycerin. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 41: 369-381, 1983.
- DiVirgilio F., Lew P. D., Anderson T., Pozzan T. Plasma membrane potential modulates chemotactic peptide-simulated cytosolic free Ca^{2+} changes in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 262: 4574-4579, 1987.
- Ely J. A., Ambroz C., Baukal A. J., Christensen S. B., Balla T., Catt K. Relationship between agonist- and thapsigargin-sensitive calcium pools in adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 266: 18635-18641, 1991.
- Endo M., Tanaka M., Ogawa Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 228: 34-36, 1970
- Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* 57: 71-108, 1977.
- Escalante B., Eriij D., Falck J.R., McGiff J.C. Cytochrome-P450-dependent arachidonate metabolites affect renal transport in the rabbit. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22:106-108, 1993.
- Fairhurst A.S., Jenden D. J. Effect of ryanodine on the calcium uptake system of skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48: 807-813, 1962.
- Fairhurst A. S., Hasselbach W. Calcium efflux from a heavy sarcotubular fraction: effect of ryanodine, caffeine and magnesium. *Eur. J. Biochem.* 13: 504-509, 1970

- Feelisch M., Noack E.A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 139: 19-30, 1987.
- Feelisch M., Kelm M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 286-293, 1991
- Fleischer S., Membrane and molecular aspects of Ca^{2+} uptake and release in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *Prog. Clin. Biol. Res.* 168: 31-33, 1985.
- Foder B., Scharff O., Thastrup O. Ca^{2+} transients and Mn^{2+} entry in human neutrophils induced by thapsigargin. *Cell Calcium.* 10: 477-490, 1989.
- Ford L.E., Podolski R. J. Regenerative calcium release within muscle cells. *Science* 167: 58-59, 1970.
- Forsberg E.J., Feuerstein G., Shohami E., Pollard H. B. Adenosine triphosphate stimulates inositol phospholipid metabolism and prostacyclin formation in adrenal medullary endothelial cells by means of P_2 -purinergic receptors. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5630-5634, 1987.
- Forstermann U., Trogisch G., Busse R. Species-dependent differences in the value of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Eur. J. Pharmacol.* 106: 639-643, 1984.
- Forstermann U., Mulsch A., Bohme E., Busse R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ. Res.* 58: 531-538, 1986.
- Forstermann U, Mugge A, Alheid A, Haverich A, Frolich JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ. Res.* 62:185-190, 1988.
- Forstermann U., Pollock J.S., Schmidt H.H., H.W., Heller M., Murad F. Calmodulin - dependent endothelium - derived relaxing/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fraction of bovine aortic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1788-1792, 1991.
- Fox A.P. Nowycky M. C., Tsien R. W. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium current in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394:149-172, 1987

-Fritzpatrick F. A., Murphy R. C. Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: formation and biological action of epoxigenase-derived eicosanoids. *Pharmacol. Rev.* 40: 229-241, 1989.

-Furchgott R.F., Bhadrakom S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 108:129-143, 1953.

-Furchgott R.F. Pharmacology of vascular smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 7: 183-265, 1955.

-Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980a.

-Furchgott R.F., Zawadzki J.V. ATP relaxes rabbit aortic smooth muscle by both an indirect action via endothelial cells and a direct action. *Pharmacologist* 22: 271, 1980b.

-Furchgott R.F., Zawadzki J.V., Cherry P.D. Role of endothelium in the vasodilator response to acetylcholine. In *Vasodilation* (Vanhouste, P. and Leusen, I., eds.) Raven Press New York, 1981.

-Furchgott R.F. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. *Trends Pharmacol. Sci.* 2: 173-176, 1981a.

-Furchgott, R.F. Acetylcholine and blood Vessel Relaxation: complications and clarifications, in *Autonomic Pharmacology* vol 2 (Kalsner, S., ed.) Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 1982.

-Furchgott R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 53:557-573, 1983.

-Furchgott R.F., Cherry P.D., Zawadzki J.V. Endothelium-dependent of arteries by acetylcholine, bradykinin and other agents. In *Vascular Neuroeffector Mechanisms* (Bevan J., ed.) Raven Press New York, 1983.

-Furchgott R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 175-197, 1984.

-Furchgott R.F. Cherry P.D. The muscarinic receptor of vascular endothelium that subserves vasodilation. *Trends Pharmacol. Sci. (suppl.)*: 42-45, 1984a.

-Furchgott R.F., Martin W., Jothianandan, D., Villani, G.M. Comparison of endothelium-dependent relaxation by acetylcholine and endothelium-independent

relaxation by light in the rabbit aorta, in Proceedings of The International Congress of Pharmacology vol. 1 (Paton, W., Mitchell, J., and Turner P., eds.), 1984b.

-Furchgott R.F. Khan M.T. Some properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) released from endothelial cells of rabbit aorta. Fed. Proc. 45: 425, 1986.

-Furchgott R. F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: The basis for the proposal that the acid-activable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In Mechanisms of Vasodilation (Vanhoutte, P.M., ed.) Raven, New York, 1987.

-Gangar KF, Vyas S, Whitehead M, Crook D., Meire H Campbell S. Pulsatility index in internal carotid artery in relation to transdermal oestradiol and time since menopause. Lancet 338:839-842, 1991.

-Gericke M. Droogmans G., Nilius B. Thapsigargin discharges intracellular calcium stores and induces transmembrane currents in human endothelial cells. Pflugers Arch. 422: 552-557, 1993.

-Gilligan Badar D.M., Panza J.A., Quyyumi A.A., Cannon R. O. Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. Circulation 81: 86-791, 1994.

-Gisclard V, Miller VM, Vanhoutte PM. Effect of 17 β -estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. J. Pharmacol. Exp. Ther. 244: 19-22, 1988

-Godfraind T., Egleme C., Al Osachie I. Role of endothelium in the contractile response of rat aorta to alpha-adrenoceptor agonists. Clin. Sci. 68 (suppl.10): 65s-71s, 1985.

-Goeger D. E., Ryley R. T. Interaction of cyclopiazonic acid with rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. Effect on Ca²⁺ binding and Ca²⁺ permeability. Biochem. Pharmacol. 37: 978-981. 1989.

-Goetz R. M., Morano I., Calovini T., Studer R., Holtz J. Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 205:905-910, 1994

-Graber R, Sumida Ch, Vallette G, Nuñez EA. Rapid and long-term effects of 17 β -estradiol on PIP₂- Phospholipase C-specific activity of MCF-7 cells. Cell. Signal. 5: 181-186, 1993.

-Graier W. F. Groschner K., Schmidt K., Kukovetz W. R. SK&F 96365 inhibits histamine-induced formation of endothelium-derived relaxing factor in human endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 1539-1545, 1992.

-Graier W.F., Simecek S., Bowles D.K., Sturek M. Heterogeneity of caffeine and bradykinin-sensitive Ca^{2+} stores in vascular endothelial cells. *Biochem. J.* 300: 637-641, 1994.

-Graier W.F., Sabine S., Sturek M. Cytochrome P450 mono-oxygenase-regulated signalling of Ca^{2+} entry in human and bovine endothelial cells. *J. Physiol.* 482: 259-274, 1995.

-Green A, Bain C. Epidemiological overview of oestrogen replacement and cardiovascular disease. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 7: 95-112, 1993.

-Griffith T.M., Henderson A.H., Hughes D. E., Lewis M.J. Isolated perfused rabbit coronary artery and aortic strip preparation: the role of endothelium-derived relaxant factor. *J. Physiol.* 351: 13-24, 1984.

-Griffith T. M., Edwards D.H., Lewis M.J., Henderson A.H. Evidence that cyclic guanosine monophosphate (cGMP) mediates endothelium-dependent relaxation. *Eur. J. Pharmacol.* 112: 195-202, 1985.

-Griffith T.M., Edwards D.H., Newby A.C., Lewis M.J., Henderson A.H. Production of endothelium-derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracellular calcium. *Cardiovasc. Res.* 20: 7-12, 1986.

-Groschner K., Graier W. F., Kukovetz R. Histamine induces K^+ , Ca^{2+} , and Cl^- currents in human vascular endothelial cells. Role of ionic currents in stimulation of nitric oxide biosynthesis. *Circ. Res.* 75:304-314, 1994.

Gross J. L., Moscatelli D., Jaffe E. A., Rifkin D. B. Plasminogen activator and collagenase production by cultured capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95: 974-981, 1982.

-Gruchow H. W., Anderson A. J., Barboriak J.J., Sobocinski K.A. Postmenopausal use of estrogen and occlusion of coronary arteries. *Am. Heart J.* 115:954-963, 1988.

-Gruetter C.A., Gruetter D.Y., Lyon J.E., Kadowitz P.J., Ignarro J.L. Relationship between cyclic guanosine 3'5' -monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrate and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219: 181-186, 1981.

Gryglewsky R.J., Palmer R.M.J., Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454: 456, 1986.

-Hagiwara S., Takahashi K. Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. *J. Gen. Physiol.* 50: 583-601, 1967.

-Hallam T.J., Pearson J.D., Exogenous ATP raises cytoplasmic free in fura-2 loaded piglet aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* 207: 95-99, 1986.

-Hallam T.J., Jacob R., Merrit J. E. Evidence that agonists stimulate bivalent-cation influx into human endothelial cells. *Biochem. J.* 251: 179-184, 1988.

-Hallam T. J., Influx of bivalent cations can be independent of receptor stimulation in human endothelial cells. *Biochem. J.* 259: 125-129, 1989.

-Hamada E., Nakajima T., Ota S., Terano A., Omata M., Nakade S. Miroshiba K., Kurachi Y. Activation of Ca^{2+} -dependent K^+ current by acetylcholine and histamine in a human gastric epithelial cell line. *J. Gen. Physiol.* 102: 667-692; 1993.

-Hamilton K.K., Sims P.J. Changes in cytosolic Ca^{2+} associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. *J. Clin. Invest.* 79: 600-608, 1987.

-Hansford R.G., Lakatta E. G. Ryanodine release calcium from sarcoplasmic reticulum in calcium-tolerant rat cardiac myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 390: 453-467, 1987.

-Hauschild S., Luckhoff A., Mulsch A., Kohler J., Bessler W., Busse R. Induction and activity of NO synthase in bone marrow-derived macrophage are independent of calcium. *Biochem. J.* 270: 351-356, 1990.

-Hayashi T, Fukuto JM. Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: Implications for atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:11259-11263, 1992.

-Henderson B. E., Ross R.K., Paganini-Hill A., Mack T. M. Estrogen use and cardiovascular disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 154: 1181-1186, 1986.

-Holzman S. Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. *J. Cyclic Nucl. Prot. Phosphor Res.* 8: 409-419, 1982.

-Hosoki E., Iijima T. Chloride-sensitive Ca^{2+} entry by histamine and ATP in human aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sec.* 266: 213-218, 1994.

-Ignarro T.L., Burke J.M., Wood K.S., Wolin M.S., Kadowitz P.J. Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228: 682-690, 1984.

-Ignarro L.J., Harrison R.G., Wood K.S., Kadowitz P.J. Activation of purified guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237: 893-900, 1986.

-Ignarro L.J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.* 65: 1-15, 1989.

-Irvine I. R., Moore Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca^{2+} . *Biochem. J.* 240: 917-920, 1986.

-Irvine, R. F., "Quantal" Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates a possible mechanism. *FEBS Lett.* 263: 5-9, 1990.

Iscan M., Coban T., Eke B.C. Responses of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes of mouse, rat, and guinea pig to nickel. *Pharmacol. Toxicol.* 71: 434-442, 1993.

Itoh T., Kuriyama H., Susuki H. Excitation-contraction coupling in smooth muscle cells of the guinea-pig mesenteric artery. *J. Physiol.* 321, 513-535, 1981.

-Iyengar R., Stuehr D.J., Marlette M.A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6369-6373, 1987.

-Jacob R. Merrit J.E., Hallam T.J., Rink T.J. Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells. *Nature (London)* 355: 40-45, 1988.

-Jacob R. Agonist-stimulated divalent cation entry into single cultured human umbilical vein endothelial cells *J. Physiol.* 421: 55-77, 1990.

-Jackson T. R., Patterson S.I., Thastrup O., Hanley m. R. A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca^{2+} without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem. J.* 253: 81-86, 1988.

-Jaffe, E.A., Grulich J., Weksler B. B., Hampel G., Watanabe K. Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol trisphosphate and

cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 262: 8557-8565, 1987.

-Jayakodi R.L., Kappagoda, C.T., Senaratne M.P.J., Sreeharan N. Absence of effect of calcium antagonists on endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.* 91:155-164, 1987.

-Jenden D.J., Fairhurst A. S. The pharmacology of ryanodine. *Pharmacol. Rev.* 21: 1-25, 1969.

-Jiang C., Sarrel P.M., Poole-Wilson P.A., Collins P. Acute effects of 17 β -estradiol on rabbit coronary artery contractile response to endothelin-1. *Am. J. Physiol.* 263: H271-H275, 1992.

-Johns A., Lategan T.W., Lodge N.J. Ryan U.S., Van Breemen C., Adams D.J. Calcium entry through receptor operated channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Tissue & Cell.* 19: 733-745, 1987.

-Kannel W. B., Hjortland M.C., McNamara P.M., Gordon T. Menopause and the risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *Ann. Intern Med.* 85:447-452, 1976.

-Kannel W.B., Vokonas P. S. Demographics of the prevalence, incidence, and management of coronary heart disease in the elderly and in women. *Ann. Epidemiol.* 2:5-14, 1992.

-Kass G. E. N., Duddy S. K., Moore G. A., Orrenius S. J. 2,5-di-(γ -butyl)-1,4-benzohydroquinone elevates cytosolic Ca²⁺ concentration by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ pool. *Biol. Chem.* 264: 15192-15198, 1989.

-Katsuki S., Arnold W., Mittal C., Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparation and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3: 23-25, 1977.

-Keany J.F., Shwaery G.T., Xu A., Nicolisi R.J., Loscalzo J., Foxall T.L., Vita J.A. 17 β -estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation* 89:2251-2259, 1994.

-Kelm M., Feelesch M., Spahr R., Piper H.M., Noack E., Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 236-244, 1988.

Khan M. T., Furchgott R.F., Hung I.L., Jothianandan D. Endothelium-dependent and independent vasodilation in rat aorta and mesenteric vasculature. *Fedn. Proc.* 45: 425., 1986.

-Khoyi M.A., Dalziel H. H., Zhang L., Bjur R.A., Gerthoffer W. T., Buxton I.L., Westfall D.P. $[Ca^{2+}]_i$ -sensitive, IP^3 -independent Ca^{2+} influx in smooth muscle of rat vas deferens revealed by procaine. *Brit. J. Pharmacol.* 110: 1353-1358, 1993.

Kilbourn R.G., Gross S.S., Jubran A., Adams J., Griffith O.W., Levi R., Lodato R.F. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc. Natl. Sci.* 87: 3629-3632, 1990.

Klein M.G., Simón B.J., Schneider M.F. Effects of procaine and caffeine on calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 453: 341-366, 1992

-Knowless R.G., Palacios M., Palmer R.M.J., Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system - transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5159-5162, 1989.

-Kohlhardt M., Baue B., Krause H., Fleckenstein A. Selective inhibition of the transmembrane Ca^{2+} conductivity of mammalian myocardial fibres by Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ions. *Pflugers Arch.* 338:115-123, 1973.

-Kukovetz W.R., Holzmann S., Poch B. Evidence for cyclic GMP-mediated relaxant effects of nitrocompounds in coronary smooth muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310: 129-138, 1979.

-Kwan C. Y., Putney Jr. J. W. Uptake and intracellular sequestration of divalent cations in resting and methacholine-stimulated mouse lacrimal acinar cells. *J. Biol. Chem.* 265: 678-684, 1990.

-Lamas S., Marsden P. A., Li G. K., Tempst P., Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 6348-6352, 1992.

-Lambert T. L., Kent R. S., Whorton A.R. Bradykinin stimulation of inositol polyphosphate production in porcine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 261: 15288-15293, 1986

-Langlands J.M., Rodger I.W., Diamond J. The Effect of M&B 22948 on methacholine- and histamine-induced contraction and inositol 1,4,,5-trisphosphate levels in guinea pig tracheal tissue. *Brit. J. Pharmacol.* 98:336-338, 1989.

-Langlands J.M., Diamond J. The effect of phenylephrine on inositol 1,4,5-trisphosphate levels in vascular smooth muscle measured using a protein binding assay system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173(3):1258-1265, 1990.

-Lansman J.B., Hallam T.J., Rink T.J. Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature* 325: 811-813, 1987.

-Laskey R., Adams D.J., Johns A., Rubanyi G., Van Breemen C. Regulation of $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells by membrane potential. In *Endothelium-Derived Relaxing Factors* (Rubanyi G. and Vanhoutte P. eds.) Karger Basel., 1990;

-Lattanzio F.A., Schlatterer R. G., Nicar M., Campbell K. P. Sutko J. L. The effects of ryanodine on passive calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 2711-2718, 1987.

-Lesh R.E., Marks A.R., Somlyo A.V., Fleischer S., Somlyo A.P. Anti-ryanodine receptor antibody binding sites in vascular and endocardial endothelium. *Circ. Res.* 72: 481-488, 1993.

-Lewis M.J. Henderson A.H. A phorbol ester inhibits the release of endothelium-derived relaxing factor. *Eur. J. Pharmacol.* 137: 167-171, 1987

-Llopis J. Chow S.B., Kass G.E.N., Gahn A., Orrenius S. Comparison between the effects of the microsomal Ca^{2+} translocase inhibitors thapsigargin and 2,5-di(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone on cellular calcium fluxes. *Biochem. J.* 277: 553-556, 1991

-Lo W.W.Y., Fan T.P.D. Histamine stimulates inositol phosphate accumulation via the H1-receptor in cultured human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 148: 47-53, 1987.

Lobo R.A. Estrogen and cardiovascular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990;592:286-294.

-Lodge N.J., Adams D.J., Johns A., Ryan U.S., Van Breemen C. Calcium activation of endothelial cells. In *Resistance Arteries* (Halpern W., Pegram B., Brayden J., Mackey K., McLaughlin M., Osol G., eds.) pp 152-161, Perinatology Press, Ithaca, N.Y., 1988.

-Loeb A.L., Izzo N.J., Johnson R.M., Garrison J.C., Peach M.J. Endothelium-derived relaxing factor release associated with increased endothelial cell inositol trisphosphate and intracellular calcium. *Am. J. Cardiol.* 62: 36G-40G, 1988.

-Long C.J., Stone T.W. The release of endothelium-derived relaxant factor is calcium dependent. *Blood vessels*. 22:205-208, 1985.

-Luckhoff A., Busse R. Increased free calcium in endothelial cells under stimulation with adenine nucleotides. *J. Cell. Physiol.* 126: 414-420, 1986.

-Luckhoff A., Pohl U., Mulsch A., Busse R. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 95: 189-196, 1988.

-Luckhoff A., Busse R. Activators of potassium channel enhance calcium influx into endothelial cells as a consequence of potassium currents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342: 94-99, 1990a.

-Luckhoff A., Busse R. Refilling of endothelial calcium stores without bypassing the cytosol. *FEBS Lett.* 276: 108-110, 1990b.

-Luckhoff A., Busse R. Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflugers Arch.* 416: 305-311, 1990c.

-Luckhoff A., Clapham D.E. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca^{2+} -permeable channel. *Nature*, 355, 356-358, 1992.

-Ludmer P.L., Selwyn A.P., Shook T.L., Wayne R.R., Madge G.H., Alexander R.W., Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 1987;315:1046-1051.

-Lues I., Schumman H.J. Effect of removing the endothelial cells on the reactivity of the rat aortic segments to different adrenoceptor agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 328: 160-163, 1984.

Lyons C.R., Orloff G.J., Cunningham J.M. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 267: 6370-6374, 1992.

-Maines D.M., Kappas A. Cobalt stimulation of heme degradation in the liver: Dissociation of microsomal oxidation of heme from cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 250: 4171-4177, 1975.

-Martin W., Villani G.M., Jothianandan D., Furchgott R.F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232: 708-716, 1985a.

-Martin W., Furchgott R.F., Villani G.M., Jothiannandan D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 237: 529-538, 1986.

-Mason M.J., García-Rodríguez C., Grinstein S. Coupling between intracellular Ca^{2+} stores and the Ca^{2+} permeability of the plasma membrane. Comparison of the effects of thapsigargin, 2,5-di-(ter-butyl)-1,4-hydroquinone and cyclopiazonic acid in rat thymic lymphocytes *J. Biol. Chem.* 266: 20856-20862, 1991.

-Majerus, P.W. Inositol phosphate *Biochemistry Ann. Rev. Biochem.* 61, 225-250, 1992.
266: 10872-10879, 1991.

-Mayer B., Schmidt K., Humbert P., Bohme E. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 678-685, 1989.

-Mehrke G. Daut J. The electrical response of cultured guinea pig coronary endothelial cells to endothelium-dependent vasodilators. *J. Physiol.* 430: 251-272, 1990.

-Meissner G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 261: 6300-6306, 1986,

-Mendelowitz D, Kira B., Kunze D.L. Bradykinin-activated calcium influx pathway in bovine aortic endothelial cells. *Am J. Physiol.*: H942-H948, 1992.

-Merrit J.E., Rink T.J. Regulation of cytosolic free calcium in fura-2-loaded rat parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.* 262: 17362-17369, 1987.

-Merrit J.E., Armstrong W.P., Benham C.D., Hallam T.J., Jacob R., Jaxa-Chamiec A., Leigh B.K., Mc Carthy S.A., Moores K.E., Rink T.J. SK&F96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem. J.*, 271: 515-522, 1990.

-Mertz L.M., Baum B.J., Ambudkar I.S. Refill status of the agonist-sensitive pool regulates Mn^{2+} influx into parotid acini. *J. Biol. Chem.* 265: 15010-15014, 1990.

-Messerli F.H., Garavaglia G.E., Schmieder R.E., Sundgaard-Riise K., Núñez B.D., Amodeo C. Disparate cardiovascular findings in men with essential hypertension. *Ann. Intern. Med.* 107: 158-161, 1987.

-Middleton J.P., Albers F.J. Dennis V.W., Raymond J.R. Thapsigargin demonstrates calcium-dependent regulation of phosphate uptake in He-La cells. *Am. J. Physiol.* 259: F727-F731, 1990.

- Miller V.M., Vanhoutte P.M. 17β -estradiol augments endothelium-dependent contraction to arachidonic acid in rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* 258:R1502-R1507, 1990.
- Miller V.M. Vanhoutte P.M. Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 261: R1022-R1027, 1991.
- Miyamoto H., Racker E. Mechanism of calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum. *J. Membr. Biol.* 66(3) 193-201, 1982.
- Montero M., Alvarez J., Garcia-Sánchez J. Agonist-induced Ca^{2+} influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular Ca^{2+} stores. *Biochem. J.*, 277: 73-79, 1991.
- Montero M. Alvarez J. Garcia-Sancho. Control of plasma-membrane Ca^{2+} entry by the intracellular Ca^{2+} stores. Kinetic evidence for a short-lived mediator. *Biochem. J.* 288; 519-525, 1992.
- Morgan J.P.; Morgan K.G. Vascular smooth muscle : The first recorded Ca^{2+} transients. *Pfluegers Arch.* 395: 75-77, 1985.
- Morgan-Boyd R., Stewart J.M., Vavrek R.J., Hassid A. Effects of bradikinin and angiotensin II on intracellular Ca^{2+} dynamics in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 253: C588- C598, 1987.
- Moritoki H., Hisayama T., Kondoh W., Takeguchi S. Thapsigargin, a Ca^{2+} -ATPase inhibitor, relaxes rat aorta via nitric oxide formation. *Life Sciences* 54:9, 153-158, 1994.
- Moritoki H., Hisayama T., Takeuchi S., Kondoh W., Imagawa M. Relaxation of rat thoracic aorta induced by the Ca^{2+} -ATPase inhibitor, cyclopiazonic acid, possibly through nitric oxide formation. *Br. J. Pharmacol.* 111: 665-662, 1994
- Morris A.P., Gallacher D.V., Irvine R.F., Paterson O.H., Synergism of inositol trisphosphate in activating Ca^{2+} -dependent K^+ channels. *Nature* 330: 653, 1987.
- Moscato J., Moreno F., García-Barreno P. Mitogenic activity and inositide metabolism in thrombin-stimulated pig aorta endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 1302-1309, 1987.
- Moscato J. Moreno F., Herrero C., Lopez C. García Barreno P. Endothelial cell growth factor and ionophore A23187 stimulation of production of inositol

phosphates in porcine aorta endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 659-663, 1988.

-Muallem S., Khademazed M., Sachs G. The route of Ca^{2+} entry during reloading of the intracellular Ca^{2+} pool in pancreatic acini. J. Biol. Chem. 265: 2011-2016, 1990.

-Muallem S., Pandol S.J., Beeker T.G. Modulation of agonist-activated calcium influx by extracellular pH in rat pancreatic acini. Am. J. Physiol. 257: G917-G924, 1989.

-Murad F., Mittal C.K., Arnold W.P., Katsuki S., Kimura H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitrocompounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9: 145-158, 1978.

-Murad F., Arnold W.P., Mittal C.K., Braughier J.M. Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions of cyclic GMP. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 11: 175-204, 1979.

-Myers R.R., Minor R.L., Guerra R., Bates J.N. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factors more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. Nature 365: 161-163, 1990.

-Nabulsi A.A., Folsom A.R., White A, Patsch W, Heiss G, Wu K. K., Szklo M. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. N. Engl. J. Med. 1993;328:1069-1075 .

-Narahashi T., Tsunoo A., Yoshii M. Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. J. Physiol. 383:231-249, 1987.

-Olesen S.P., Davies P.F., Clapham D.E. Muscarinic-activated K^+ current in bovine aortic endothelial cells. Circ. Res. 62: 1059-1064, 1988.

-Oyamada H., Iino M., Endo M. Effects of ryanodine on the properties of Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal muscle fibres of the frog. J. Physiol. 470:335-348, 1993.

-Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 327: 524-526, 1987.

-Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 333: 664-666, 1988.

-Palmer R.M.J., Moncada S.A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158: 348-352, 1989.

-Parekh A.B., Terlau H., Stuhner W. Depletion of InsP_3 stores activates a Ca^{2+} and K^+ current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* 364: 814-818, 1993

-Peach M.J., Singer H.A., Izzo N.J., Loeb A.L. Role of calcium in endothelium-dependent relaxation of arterial smooth muscle. *Am. J. Cardiol.* 59: 35A-43A, 1987.

-Pessa I.N., Waterhouse A.L., Casida J.E. The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 449-456, 1985.

-Pinto A., Abraham N.G., Mullane K.M. Cytochrome P-450-dependent monooxygenase activity and endothelium-dependent relaxation induced by arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236: 445-451, 1986.

-Pirotton S., Raspe E., Demolle D., Erneux C., Boeynaems J.M. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium in the action of adenine nucleotides on aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 262: 17461-17466, 1987.

-Pollock W.K., Wreggett, K.A., Irvine R.R. Inositol phosphate production and Ca^{2+} mobilization in human umbilical-vein endothelial cells stimulated by thrombin and histamine. *Biochem. J.* 256: 371-376, 1988.

-Putney J.W. Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* 7: 1-12, 1986.

Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression an inducible, but not constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:10043-10047. 1990.

-Rana, R.S. and Hokin, L.E.J. Role of phosphoinositides in transmembrane signalling. *Physiol. Rev.* 70, 115-164, 1990.

-Rapoport R.M. Murad F., Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic may be mediated through cyclic GMP. *Circ. Res.* 52: 352-357, 1983.

-Rapoport R.M., Draznin M.B., Murad M.F. Mechanism of adenosine triphosphate-, thrombin - and trypsin-induced relaxation in rat thoracic aorta. *Circ. Res.* 55: 468-471, 1984.

- Rardon D.P., Cefali D.C., Mitchell R.D., Seiler S.M., Jones L.R. High molecular weight proteins purified from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum vesicles are ryanodine-sensitive calcium channels. *Circ. Res.* 64: 779-789, 1989
- Reis S.E., Gloth S.T., Blumenthal R.S., Resar J.R., Zacur H.A., Gerstenblith G., Brinker J.A. Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation* 89:52-60, 1994.
- Resink, T.J., Grigorian G.Y., Moldabaeva A.K., Danilov S.M., Buhler F.R. Histamine-induced phosphoinositide metabolism in cultured human umbilical vein endothelial cells. Association with thromboxane and prostacyclin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 438-446, 1987.
- Ross R.K., Paganini-Hill A., Mack T.M. Menopausal oestrogen therapy and protection from death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1:858-860, 1981.
- Rotrosen D., Gallin J.I. Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers. *J. Cell Biol.* 103: 2379-2387, 1986.
- Rosenberg L, Palmer J, Shapiro S, A case-control study of myocardial infarction in relation to use of estrogen supplements. *Am. J. Epidemiol.* 1993;137: 54-63.
- Rubanyi G.M., Schurtz A., Vanhoutte P.M., The calcium agonists Bay K 8644 and (+)202,791 stimulate the release of endothelial relaxing factor from canine femoral arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 117: 143-144, 1985.
- Rusko J., Tanzi F., van Breemen C., Adams D.J. Calcium-activated potassium channels in native endothelial cells from rabbit aorta: conductance, Ca²⁺ sensitivity and block. *J. Physiol.* 455: 601-621, 1992.
- Sacks F.M., Walsh B.W.. The effects of reproductive hormones on serum lipoproteins: unresolved issues in biology and Clinical practice. *Ann. N Y Acad. Sci.* 592:272-285, 1990.
- Sage S.O., Reast R., Rink T.J. ADP evokes biphasic Ca²⁺ influx in Fura-2 loaded human platelets. *Biochem. J.*, 265: 675-680, 1990.
- Sakai T. Acetylcholine induces Ca-dependent K currents in rabbit endothelial cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 53: 235-246, 1990.
- Saiag B., Milon D., Bentue-Ferrer D., Allain H., Rault B., Vander Driessche J. Inhibitor effects of diltiazem, nicardipine, nifedipine and verapamil on the norepinephrine-induced contractions of the canine saphenous vein in calcium-free medium. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 83(3): 255-269, 1994.

Sargeant P., Clarkson W.D., Sage S.O., Heemskerk J.W.M. Calcium influx evoked by Ca^{2+} store depletion in human platelets is more susceptible to cytochrome P-450 inhibitors than receptor-mediated calcium entry. *Cell Calcium* 13; 553-564; 1992.

-Sarrel P.M., Lindsay D., Rosano G.M., Poole-Wilson P.A. Angina and normal coronary arteries in women: gynecologic findings. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167: 467-471, 1992.

-Sauvé R., Parent L., Simoneau C., Roy G. External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent K^+ channel in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch.* 412: 469-481, 1988.

-Sax F.L., Cannon R.O., Hanson C., Epstein S.E. Impaired forearm vasodilator reserve in patients with microvascular angina. Evidence of a generalized disorder of vascular function? *N. Engl. J. Med.* 317: 1366-1370, 1987.

-Schilling W.P., Ritchie, A.K., Navarro L.T., Eskin S.G. Bradykinin-stimulated calcium influx in cultured bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 255: H219-H227, 1988.

-Schilling W.P. Effect of membrane potential on cytosolic calcium of bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 257: H778-H784, 1989.

-Schilling W. P., Rajan L., Strobl-Jager E. Characterization of the bradykinin-stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells. Saturability, selectivity, and kinetics. *J. Biol. Chem.* 264:12838-12848, 1989.

-Schilling W.P., Cabello O.A., Rajan L. Depletion of the inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive intracellular Ca^{2+} store in vascular endothelial cells activates the agonist-sensitive Ca^{2+} -influx pathway. *Biochem.* 284: 521-530; 1992.

-Schroder H., Schror K. Cyclic GMP stimulation by vasopressin in LLC-PK1 kidney epithelial cells is L-arginine-dependent. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 340: 475-477, 1989.

-Schultz K.D., Schultz K., Schultz G. Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferents. *Nature.* 265: 750-751, 1977.

-Seidler N.W., Jona Y., Vegh M., Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264(30): 17816-17823, 1989.

- Sessa W.C., Harrison J. K., Barber C. M. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267: 15274-15278, 1992
- Shimizu S. Yamamoto T., Momose K. Inhibition by methylene blue of the L-arginine metabolism of L-citrulline coupled with nitric oxide synthesis in cultured endothelial cells. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 82 35-48, 1993.
- Singer H.A., Peach M.J., Calcium- and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. *Hypertension* 4(suppl.II): II-19-II-25, 1982.
- Smith J.S., Coronado R., Meissner G. Single channel measurements of the calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca^{2+} and ATP and modulation by Mg^{2+} *J. Gen. Physiol.* 88: 573-588, 1986.
- Sokolow M., Perloff D. The prognosis of essential hypertension treated conservatively. *Circulation* 23: 697-713, 1961.
- Spedding, M., Shini V., Schoeffer P., Miller R.C. Calcium channel activation does not increase release of endothelium-derived relaxant factors (EDRF) in rat aorta although tonic release of EDRF may modulate calcium channel activity in smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8: 1130-1137, 1986.
- Stampfer M.J., Colditz G. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assesment of the epidemiologic evidence. *Prev. Med.* 20: 47-63, 1991.
- Sukhareva M., Morrissette J., Coronado R. Mechanism of chloride-dependent release of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biophys. J.* 67: 751-765, 1994.
- Sullivan J.M., Zwaag G.F., Vander R, , Lemp J.P., Hughes V. Maddock F.W., Kroetz K.B., Ramanathan. Postmenopausal estrogen use and coronary atherosclerosis. *Ann. Intern Med.* 108: 358-363, 1988.
- Suyama N., Todoki K., Okabe E. A mechanism underlying histamine-induced contraction in isolated rabbit lingual artery. *Nippon Yakurigaku Zassh.* 103: 175-186, 1994.
- Takahashi S. Local anesthetic bupicaine alters function of sarcoplasmic reticulum an sarcolemmal vesicles from rabbit masseter muscle. *Pharmacol. Toxicol.* 75(3-4): 119-128, 1994.

-Takemura H., Hughes A.R., Thastrup O., Putney Jr. J.W. Activation of calcium entry by the tumour promoter thapsigargin in parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.*, 264: 15192-15198, 1989.

-Thuringer, D., Diarra A., Sauvé R. Modulation by extracellular pH of bradykinin-evoked activation of Ca^{2+} activated K^+ channels in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 261(3 pt 2): H656-666, 1991.

-Usachev Y., Shmigol A., Pronchuk N., Kostyuk P., Verhratsky A. Caffeine-induced calcium release from internal stores in cultured rat sensory neurons. *Neuroscience* 57(3): 845-859, 1993.

-Vaca L., Kunze D.L. Depletion of intracellular Ca^{2+} stores activates a Ca^{2+} -selective channel in vascular endothelium. *Am. J. Physiol.* 267: C920-C925, 1994.

-Vázquez-Alcántara, M.A., Juárez-Oropeza M.A., Miranda Zamora R, Diaz-Zagoya J.C., Garza Flores J. Synthesis and biological assessment of long-acting estradiol fatty acid esters in ovariectomized rats. *J. steroid Biochem.* 23:599-602, 1985.

-Vázquez-Alcántara M.A., Menjivar M, Garcia G.A., Diaz-Zagoya J.C., Garza-Flores J. Long acting estrogenic responses of estradiol fatty acid esters. *J. steroid Biochem.* 336: 1111-1118, 1989.

-Verma A., Hirsch D.J., Hanley M.R., Thatrup O., Christensen S.B. Snyder S.H. Inositol trisphosphate and thapsigargin discriminate endoplasmic reticulum stores of calcium in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 811-816, 1990.

Vites A.M., Pappano A.J. Distinct mode of inhibition by ruthenium red and ryanodine of calcium-induced calcium release in avian atrium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 1476-1484, 1994.

-Vostal J.G., Jackson W.L., Shulman N.R. Cytosolic and stored calcium antagonistically control tyrosine phosphorylation of specific platelet proteins. *J. Biol. Chem.*, 266: 16911-16916, 1991.

-Waldman S.A., Murad F., Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation : The guanylate cyclase -cyclic GMP system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12 Suppl. 5: S115-S118, 1988.

-Walsh B.W., Schiff I., Rosner B., Greenberg L., Ravnkar V., Sacks F.M. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N. Engl. J. Med.* 325: 1196-1204, 1991.

- Wang X., Lau F., Li L., Yoshikawa A., Van Breemen C. Acetylcholine-sensitive intracellular Ca^{2+} store in fresh endothelial cells and evidence for ryanodine receptors. *Circ. Res.* 77: 37-42, 1995.
- Weiner C, Martinez E, Zhu L.K., Ghodsi A, Chestnut D. In vitro release of endothelium-derived relaxing factor by acetylcholine is increased during the guinea pig pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161: 1599-1605, 1989.
- Weiner C.P., Zhu L.K., Thomson L, Herring J, Chestnut D. Effect of pregnancy on endothelium and smooth muscle: their role in reduced adrenergic sensitivity. *Am. J. Physiol.* 261: H1275-H1283, 1991.
- Weiner C.P., Lizasoain I, Baylis S.A., Knowles R.G., Charles I.G., Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 5212-5216, 1994.
- Williams S.P., Shackelford P, Iams S.G., Mustafa S.J. Endothelium dependent relaxation in estrogen-treated spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.*;145: 205-207, 1988
- Williams J.K., Adams M.R., Klopfenstein S.H. Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation.*;81: 1680-1687, 1990.
- Williams J.K., Adams M.R., Herrington D.M., Clarkson T.B. Short-Term administration of estrogen and responses of atherosclerotic coronary arteries. *J. Am. Coll. Cardiol.*;20: 452-457, 1992.
- Winquist R.J., Bunting P.B., Schofield T.L. Blockade of endothelium-dependent relaxation by the amiloride analog dichlorobenzamil: possible role of Na^+/Ca^{2+} exchange in the release of endothelium-derived relaxant factor *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235: 644-650, 1985.
- Whorton A.R., Willis C.E., Kent R.S., Young S.L. The role of calcium in the regulation of prostacyclin synthesis by porcine aortic endothelial cells. *Lipids* 19: 17-24, 1984.
- Wright C.D., Mulsch A., Busse R., Osswald H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 813-819, 1989.
- Xie Q.-W., Cho H.J., Calaycay J. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256: 225-228, 1992.

-Yamamoto Y., Chen G., Miwa K., Suzuki H. Permeability and Mg^{2+} blockade of histamine-operated cation channel in endothelial cells of rat intrapulmonary artery. *J. Physiol.* 450: 395-408, 1992.

-Young L.C., Kuller L.H., Rutan G, Bunker C. Longitudinal study of blood pressure: Changes and determinants from adolescence to middle age. The Dormont High School follow-up study, 1957-1963 to 1989-1990. *Am. J. Epidemiol.* 138: 973-983, 1993.

-Zacharova D., Lipska E., Hencsek M., Hochmannova J., Sajtler V. Modulation by adrenaline of electrophysiological membrane parameters and contractility in intact and internally perfused single muscle fibres of the crayfish. *Gen. Physiol. Biophys.* 12: 543-577, 1993.

-Ziegelstein R.C., Spurgeon H.A., Pili R., Passaniti A., Cheng L., Corda S., Lakatta E.G., Capogrossi M.C. A functional ryanodine-sensitive intracellular Ca^{2+} store is present in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 74: 151-156, 1994.