

00346 9



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL CUAL EL FLUJO
CORONARIO ESTIMULA LA LIBERACION DE OXIDO
NITRICO EN EL CORAZON.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
JUAN CARLOS TORRES NARVAEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. PABLO JORGE SUAREZ MUNGUIA

**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 esta 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRIA: BIOLOGIA CELULAR

ALUMNO: JUAN CARLOS TORRES NARVAEZ

TUTOR: Dr. PABLO JORGE SUAREZ MUNGUA

TESIS

***ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL CUAL EL FLUJO
CORONARIO ESTIMULA LA LIBERACION DE OXIDO
NITRICO EN EL CORAZON***

(Departamento de Farmacología)

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

Escuela Superior de Medicina IPN

2002

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. PABLO JORGE SUAREZ MUNGUIA

Director de tesis

Por su enseñanza y apoyo en el presente trabajo.

Al Comité Tutorial

Por todas sus atenciones

**Dr. ROLANDO EFRAIN HERNANDEZ
MUÑOZ**

Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

Dr. PABLO JORGE SUAREZ MUNGUIA

Por la revisión del trabajo escrito y atención a la presentación oral del mismo, agradezco a los sinodales:

Dra. GUADALUPE DEL CARMEN BAÑOS MARHABER

Dra. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA Y HAZAS

Dra. REBECA LOPEZ MARURE

Dra. ARACELI PAEZ ARENAS

Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

Dr. ROLANDO EFRAIN HERNANDEZ MUÑOZ

Dr. PABLO JORGE SUAREZ MUNGUIA

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
“IGNACIO CHAVEZ”**

Agradezco su apoyo y atenciones al:

Dr. GUSTAVO PASTELIN HERNANDEZ
(Jefe del Dpto. de Farmacología)

Por su ayuda y valiosa participación en este trabajo a:

M. en C. LEONARDO DEL VALLE MONDRAGÓN

MVZ. AMALIA ENRIQUETA GONZALEZ GARDUÑO
(Dpto. de Farmacología)

**DEDICO ESTE TRABAJO
A MIS PAPAS**

ISABEL NARVAEZ DE TORRES

CARLOS TORRES MUÑOZ

A MIS SOBRINOS

NOEMI, MIGUEL, IVAN, KARLA, LALO

Indice	Página
Abreviaturas	4
Resumen	5
Summary	6
Introducción	7
<ul style="list-style-type: none"> • Antecedentes • Endotelio vascular • Sustancias liberadas en la célula endotelial • Oxido nítrico • Fuerzas hemodinámicas • Posibles vías de activación de la célula endotelial para la liberación de sustancias bioactivas 	
Características químicas del óxido nítrico	11
Oxido nítrico sintasa (ONS)	13
<ul style="list-style-type: none"> • Oxido nítrico sintasa neuronal (tipo I) (ONS_n) • Oxido nítrico sintasa inducible (tipo II) (ONS_i) • Oxido nítrico sintasa constitutiva (tipo III) (ONS_c) 	
Tabla I: Comparación de las isoformas de la ONS	14
Estrés mecánico (Shear stress)	16
Canales iónicos que se activan por estiramiento	22
Planteamiento del problema	26
Objetivos	27
Hipótesis	27
Metodología	29
Tabla II: Reactivos utilizados en las curvas experimentales	35
Cuantificación de óxido nítrico	36

Resultados	41
• Figura 9 <i>Efecto del Gd^{3+} sobre la presión de perfusión (PP) y sobre la resistencia vascular coronaria (RVC)</i>	42
• Figura 10 <i>Efecto de la inhibición de los CIAE sobre la liberación del ON en la vasculatura coronaria</i>	43
• Figura 11 <i>Relación comparativa entre los efectos de estimulación e inhibición de la síntesis de ON en el endotelio vascular coronario</i>	45
• Figura 12 <i>Efecto de la inhibición de la ONS sobre la PP y la RVC</i>	47
• Figura 13 <i>Efecto del bloqueo de receptores de adenosina, con SPT, sobre la PP y la RVC en ausencia y en presencia de L-NAME</i>	49
• Figura 14 <i>Efecto del bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo L sobre la PP, la RVC y sobre la liberación de óxido nítrico</i>	51
• Figura 15 <i>Efecto del bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo T sobre la PP, la RVC y la liberación de óxido nítrico</i>	53
• Figura 16 <i>Efecto del gadolinio y la acetilcolina sobre la liberación de ON en animales pretratados con lipopolisacárido para activar la ONS inducible</i>	55
Discusión	56
Importancia y perspectivas	62
Conclusión	65
Referencias	66

Abreviaturas

AcCh	Acetilcolina
ADO	Adenosina
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
CIAE	Canales iónicos que se activan por estiramiento
Conducción A-V	Conducción auriculo-ventricular
FAD	Flavín-adenín-dinucleótido
FMN	Flavín-mononucleótido
FRDE	Factor de relajación derivado del endotelio
FHDE	Factor de hiperpolarización derivado del endotelio
GMPc	Guanidin monofosfato cíclico
L-NAME	L-nitroarginin metil éster
LPS	Lipopolisacárido
MetHb	Metahemoglobina
MLV	Músculo liso vascular
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato monoácido
ON	Oxido nítrico
ONS	Oxido nítrico sintasa
ONSc	Oxido nítrico sintasa constitutiva
ONSi	Oxido nítrico sintasa inducible
ONSn	Oxido nítrico sintasa neuronal
PP	Presión de perfusión
PVI	Presión ventricular izquierda
rapG	receptor acoplado a proteínas G
RC	Receptor a cininas
RM	Receptor muscarínico
RVC	Resistencia vascular coronaria
SPT	Sulfopenil tiofilina

RESUMEN

El flujo sanguíneo regula el tono vascular mediante la acción del rozamiento (shear stress) sobre el endotelio. El mecanismo para la vasodilatación inducida por el flujo involucra un incremento en la liberación de factores relajantes derivados del endotelio (FRDE), siendo uno de los más importantes el óxido nítrico (ON). El ON se forma a partir de la L-arginina mediante la actividad de la óxido nítrico sintasa (ONS). La ONS endotelial se expresa constitutivamente en niveles basales y su activación es dependiente del sistema calcio-calmodulina. El estudio de los mecanismos por los cuales el flujo induce vasodilatación mediada por el ON, se enfoca a la regulación de la actividad de la ONS; sin embargo, el mecanismo para la transducción de la fuerza hemodinámica hacia la liberación de ON no se conoce. Se ha demostrado en una gran variedad de células, incluyendo al endotelio vascular, la existencia de canales catiónicos no selectivos que se activan por sensibilidad a estrés mecánico sobre la célula. Estos canales se conocen como canales iónicos que se activan por estiramiento (CIAE). La apertura de los CIAE, genera influjo de Ca^{2+} y Na^+ , así como la despolarización de la membrana, lo cual podría contribuir a la activación de la ONS y en consecuencia, provocar un incremento en la liberación del ON. Experimentalmente, los CIAE pueden ser bloqueados por gadolinio (Gd^{3+}). Nosotros planteamos la hipótesis de que el bloqueo con Gd^{3+} de los canales iónicos que se activan por estiramiento, puede modificar la liberación del ON inducida por el flujo. Para probar esta posibilidad, en esta tesis, estudiamos el efecto del Gd^{3+} en curvas de liberación de ON inducida por el flujo, realizadas en el modelo de corazón aislado de cobayo. Además, estudiamos la participación de la ONS constitutiva (ONSc) y la ONS inducible (ONSi) en el efecto del flujo sobre corazones aislados de cobayo obtenidos de animales pretratados con lipopolisacárido (LPS), el cual genera sobre expresión de la ONSi. Los resultados proveen la primera evidencia de que la liberación del ON inducida por el flujo, es mediada por los CIAE y que la ONSi es estimulada por el flujo, independientemente de la activación de los CIAE.

SUMMARY

Blood flow regulates vessel tone mainly by the action of shear stress on the endothelium. The mechanism of flow-induced vasodilatation involves the enhanced release of endothelial-derived relaxing factors (EDRF), the principal component of which is nitric oxide (NO). NO is formed from L-arginine by the activity of NO synthase. Endothelial NO synthase is constitutively expressed at basal level, and its activity is calcium/calmodulin dependent. Consideration of the mechanism(s) by which flow induces NO-mediated vasodilatation is focused on the regulation of endothelial NO synthase activity, however, the mechanism for the transduction of the hemodynamic force into NO release remains unknown. Stretch-activated nonselective cation channels have been demonstrated in a wide variety of cells including vascular endothelium and can be blocked by Gd^{3+} . Opening of these channels causes Ca^{2+} and Na^{+} influx and membrane depolarization which may contribute to the activation of NO synthase with the concomitant increase in NO release. We thus hypothesize that blockade of stretch-activated ion channels with gadolinium (Gd^{3+}) can modify the flow-induced NO release. In the present study, to test this possibility, we investigated the effect of Gd^{3+} in the flow-induced NO release curve in the isolated perfused guinea pig heart. In addition we studied the participation of eNOS and iNOS in the effect of flow in the guinea pig heart obtained from animals treated with LPS, which over express the inducible NO synthase. The results obtained provide the first evidence that flow-induced NO release is mediated by stretch-activated ion channels and that inducible NO synthase is stimulated by flow independently of activation of stretch-activated ion channels.

Introducción

En los mamíferos, el endotelio vascular es una monocapa de células que se encuentra en la superficie luminal de los vasos, en contacto permanente con la sangre circulante (figura 1). Durante mucho tiempo se consideró que la función del endotelio vascular era la de una barrera simple entre la sangre y la pared de los vasos. Esta idea se mantuvo hasta que en 1980, las investigaciones de Furchgott y colaboradores mostraron que la célula endotelial libera un factor relajante al que llamaron factor de relajación derivado del endotelio (FRDE), que en 1987 Palmer y colaboradores identificaron como el óxido nítrico (ON) ¹

En las últimas dos décadas, numerosas investigaciones ponen de manifiesto una participación muy activa de la célula endotelial en diversos procesos fisiológicos y patológicos,^{2,3} ya que en ella, además del ON, se liberan otras sustancias vasodilatadoras como el factor de hiperpolarización derivado del endotelio (FHDE), las prostaglandinas⁴ y la adenosina (ADO), entre otras. Estas sustancias tienen un efecto relajante e inhiben el crecimiento celular que promueven los agentes constrictores como la angiotensina y la endotelina que también libera el endotelio.^{3,5} Ahora se sabe que este tejido participa importantemente en la regulación del flujo sanguíneo, transporte por capilaridad, angiogénesis, metabolismo lipoprotéico e interacciones de la

pared de los vasos con elementos que circulan en la sangre (serotonina, epinefrina, bradicinina y angiotensina I). Uno de los papeles más importantes que se atribuyen al endotelio es su respuesta a la estimulación física (“shear stress” o rozamiento) generada por el flujo sanguíneo, con lo cual se incrementa la concentración del calcio intracelular (Ca^{2+}) y se regula la liberación de los factores constrictores y relajantes mencionados, que mantienen de manera coordinada el tono en el músculo liso vascular (MLV) (figura 2).^{4,6}

En particular, el ON es considerado como una molécula, que en los mamíferos, juega un papel importante participando en la regulación de múltiples acciones biológicas como: el tono vascular,^{3,7} la presión sanguínea,⁷ la neurotransmisión y algunas respuestas inmunológicas,^{7,8} además de tener funciones protectoras en los vasos, inhibiendo la agregación plaquetaria, la adhesión de monocitos y la proliferación de células del músculo liso.^{3,8} Recientemente, se ha sugerido que el ON actúa también en la regulación de los componentes de la matriz extracelular (por ejemplo en los fibroblastos cardiacos) y como cardioprotector contra la fibrosis.⁹ La participación del ON en dichas funciones fisiológicas puede alterarse y provocar patologías tales como: la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia,^{3,10} la aterosclerosis, la diabetes mellitus, la insuficiencia cardiaca congestiva y la hipertensión pulmonar.^{10,11} De ahí la importancia de estudiar los mecanismos de liberación del ON, pero, ¿cuál es el

mecanismo por el que en la célula endotelial se libera este gas?. Esta interrogante ha conducido a que en las investigaciones de los últimos 20 años sobre este tema, se consideren aspectos anatómicos, estructurales y fisiológicos del endotelio para indagar las estrategias de respuesta que adquiere este tejido por exposición a las fuerzas hemodinámicas del flujo sanguíneo.^{6,12-14} Estas fuerzas como son el estrés por fricción y la deformación celular por presión, han cambiado el concepto del endotelio como una barrera física, al de un tejido altamente especializado capaz de transformar estímulos mecánicos en mensajes químicos hacia las células del MLV.^{2,7,14,15} De tal manera, ahora se sabe que el flujo sanguíneo es el generador del estrés mecánico y que la célula endotelial es el primer sensor de los estímulos que inducen la liberación del ON y otras sustancias vasoactivas.^{12,13,15}

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

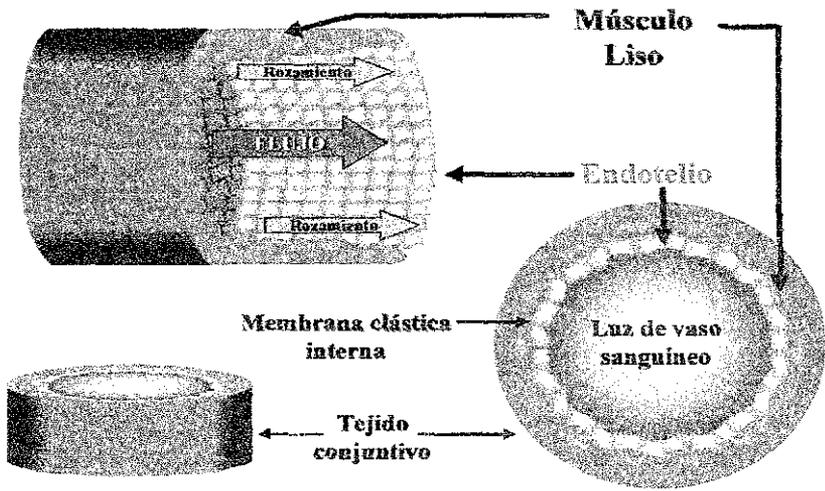


Figura 1

En este esquema se ilustra la posición de las células endoteliales y del músculo liso de los vasos sanguíneos. Las flechas azules indican que el rozamiento de la sangre sobre el endotelio es en la dirección del flujo.

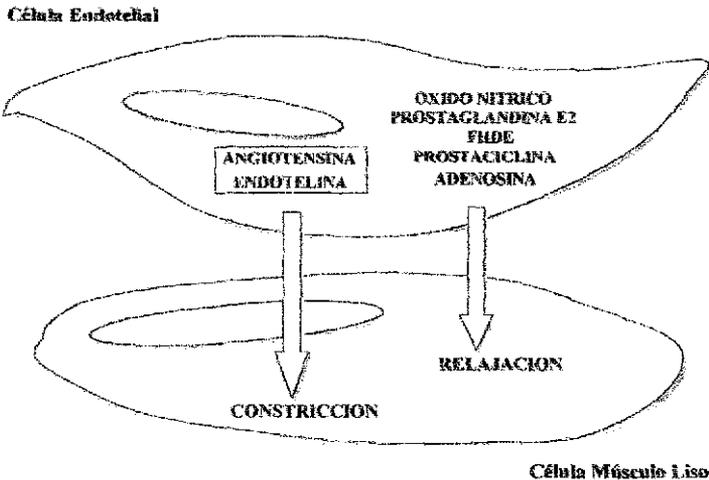


Figura 2

Sustancias liberadas por el endotelio y su efecto sobre las células del músculo liso. La acción coordinada de estos factores regula el tono vascular.

Características químicas del óxido nítrico

El ON es un gas inorgánico muy inestable, de fórmula $\cdot\text{N}=\text{O}$ que puede ser considerado como parte de mecanismos óxido-reducción de relevancia fisiológica en sus formas NO^+ (nitrosonio) y NO^- (nitroxilo);^{16,17} tiene una vida media muy corta, la cual se ha reportado que es de 3 a 70 segundos dependiendo del estudio,^{16,18} puede reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, se une a grupos hemo de la guanilato ciclasa, hemoglobina, citocromo C oxidasa y reacciona también con centros nucleofílicos, nitrógeno, oxígeno y carbonos aromáticos.¹⁹

La síntesis de ON se deriva a partir de su precursor, el aminoácido L-arginina en presencia de oxígeno y nicotinamida adenin dinucleótido fosfato monoácido (NADPH) como cofactores, en donde el NADPH es el donador de electrones.^{10,20} En presencia de estos cofactores, la reacción es catalizada por la óxido nítrico sintasa (ONS) en el nitrógeno guánido terminal de la L-arginina formando así L-citrulina + ON (figura 3). Esta síntesis de ON se lleva a cabo por un complejo grupo de reacciones redox en donde los procesos electromoleculares ocurren a altas velocidades (en el orden de picosegundos)²¹ y no se han podido definir claramente.

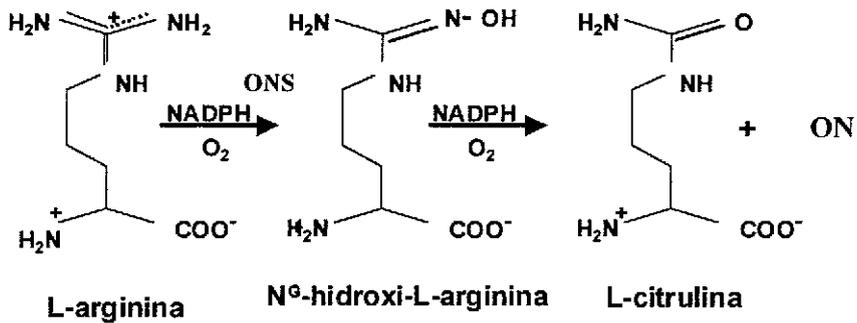


Figura 3

En esta figura se indica la reacción general de la síntesis de ON. Se representa al NADPH y al O₂ como los cofactores que participan con la L-arginina y con la N^ω-hidroxi-L-arginina para formar la L-citrulina y al óxido nítrico (ON). La óxido nítrico sintasa (ONS) cataliza la reacción.

La síntesis de ON en condiciones basales es dependiente de Ca²⁺, el cual activa a la ONS en su isoforma llamada endotelial o constitutiva (ONSc)^{4,22,23} (Tabla I). Posterior a su síntesis en el endotelio, el ON difunde a las células de MLV en donde estimula a la guanilato ciclasa e incrementa los niveles de GMPc produciendo relajación^{10,24,25} (figura 4).

En el MLV, la entrada de Ca²⁺ puede ser a través de los CIAE, o los canales de calcio tipo L y tipo T. Una vez que el calcio está dentro de la célula, interacciona con la calmodulina para formar el complejo calcio-calmodulina, que posteriormente, estimula a la cinasa de las cadenas ligeras de miosina (CCLM) para que las fosforile y esto permita la acción entre la actina y la miosina, generando la contracción

Oxido nítrico sintasa (ONS)

La relajación dependiente del endotelio inducida por el ON puede ser inhibida por análogos de la L-arginina, por ejemplo, el L-N^G-monometil arginina (L-NMMA)⁵ o el L-nitroarginina metil ester (L-NAME), los cuales compiten con el sustrato natural L-arginina por el sitio catalítico de la enzima ONS,¹⁰ de la cual se han descrito tres isoformas en diferentes tipos celulares tales como células endoteliales, células de músculo liso, macrófagos, células nerviosas y cerebrales¹⁰ (Tabla I). Estas isoformas de la ONS se clasifican de la siguiente manera:^{16,17}

Tipo I: óxido nítrico sintasa neuronal (ONSn): Es una isoforma citosólica que se expresa constitutivamente en células neuronales periféricas y centrales. La ONSn está implicada en la regulación de la transmisión sináptica en el Sistema Nervioso Central y en la regulación del flujo sanguíneo cerebral.

Tipo II: óxido nítrico sintasa inducible (ONSi): Es citosólica e independiente de calcio. Mediadores inflamatorios tales como las citocinas y el lipopolisacárido bacteriano (LPS) estimulan su expresión^{25,26} en células de músculo liso, macrófagos, hepatocitos, condrocitos y células endoteliales.⁸ Se induce durante la respuesta inmune^{8,26} y una vez expresada, sintetiza el ON por periodos largos y en mayor magnitud que la ONS constitutiva

Tipo III: Llamada endotelial (ONSe) o constitutiva (ONSc): Es una proteína de 133 KDa la cual se expresa constitutivamente²⁷ y está asociada a la membrana,⁸ se le encuentra principalmente en células endoteliales y se le atribuye un papel crítico en la homeostasis cardiovascular. Es dependiente del sistema calcio-calmodulina y su actividad se incrementa por el estrés por fricción que ejerce el flujo sanguíneo sobre las células endoteliales.^{23,28-30} Una vez activa, sintetiza el ON por periodos cortos (Tabla I).

Tabla I: Comparación de las isoformas de la óxido nítrico sintasa

<u>ONS</u>	<u>ABREVIATURA</u>	<u>TIPO</u>	<u>CELULAS</u>	<u>UBICACION</u>	<u>ACTIVACION</u>
Neuronal	ONSn	I	Neuronas	CITOSOLICA	Dependiente del sistema Ca ²⁺ -Calmodulina
Inducible	ONSi	II	Músculo liso Macrófagos Hepatocitos Condrocitos Endoteliales	CITOSOLICA	Independiente de calcio
Endotelial o Constitutiva	ONSe, ONSc	III	Endotelio	MEMBRANA	Dependiente del sistema Ca ²⁺ -Calmodulina

Comparando entre diferentes especies de animales, cada isoforma de la ONS tiene de 85 a 95% de secuencias de ADN conservadas, mientras que comparando las isoformas de la enzima entre sí, hay de 50 a 55% de secuencias conservadas²⁶ Ciertas

regiones de esta proteína contienen sitios de unión para varios cofactores, entre los que se incluyen al flavín-adenín-dinucleótido (FAD), al flavín mononucleótido (FMN), a la tetrahidrobiopterina, a los grupos hemo y a la calmodulina.

Mediante técnicas de ADN complementario (ADNc), se ha mapeado la localización de la ONSn y de la ONSc, mientras que los genes que codifican para la ONSi se han determinado mediante “Southern blot” en líneas celulares humanas. En estos estudios se ha encontrado que, la ONSn es codificada por un gen de 20 Kb y se encuentra en el cromosoma 12 humano, la ONSc se localiza en el cromosoma 7 y se expresa de manera constitutiva^{16,18} mientras que la ONSi es localizada en el cromosoma 17.¹⁶ La ONSn y la ONSc requieren del sistema calcio-calmodulina para ser activadas. Ambas están relacionadas con el control de funciones fisiológicas y su alteración induce patologías como la hipertensión arterial. Esta enfermedad se asocia con incrementos de la resistencia vascular periférica por una disminución en la producción de ON,³¹ lo que propicia la acción de factores de vasoconstricción.

Estrés mecánico

El estrés mecánico (rozamiento o “shear stress”) que ejerce el flujo sanguíneo de manera tangencial sobre la célula endotelial (figura 4), es una fuerza por unidad de área, cuyos componentes son la tensión y la compresión que se producen en la superficie luminal de la célula y que se transmiten al interior de ésta (abluminal) y hacia las células vecinas.¹⁸ Como ya se ha mencionado, el mecanismo por el cual el estímulo mecánico sobre el endotelio es transformado a respuestas bioquímicas se desconoce;^{6,13,15,29} sin embargo, se ha establecido en diferentes estudios que el flujo sanguíneo y el endotelio están relacionados con la liberación de las sustancias vasoactivas y en la regulación del diámetro arterial. Esto se ha demostrado en diferentes bioensayos con modelos de perfusión, como por ejemplo en los que segmentos de arterias fueron sometidas a variaciones en la viscosidad del líquido de perfusión, en condiciones fisiológicas de presión y a flujo constante.^{13,18} Los resultados de estos estudios muestran que la vasodilatación está en función de la viscosidad, con lo cual se establece que el estrés por fricción es la principal fuerza hemodinámica, y el endotelio es el primer sensor de los estímulos. Este tejido se remodela físicamente, adaptándose a las condiciones de estrés, ajustando el diámetro de los vasos, es decir, cambiando la forma celular en función del estrés que genera el flujo.¹⁵ Esa modulación está mediada en parte por la regulación de genes que codifican para muchas proteínas,²⁸ sustancias vasoactivas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y moléculas

quimiotácticas. El estrés por fricción incrementa los niveles de mRNA para la ONS y la producción del ON, también aumenta la producción de prostaciclina que es otro potente vasodilatador y el cual depende, al parecer, de señales que tienen que ver con la concentración del ON.²

En los vasos sanguíneos la forma de la célula endotelial es variable a consecuencia principalmente de la dirección del flujo, por ejemplo, en los vasos largos las células endoteliales se alinean en la dirección del flujo y adquieren una forma más o menos constante hasta que se modifiquen las condiciones de estrés. Otro ejemplo, es cuando en un mismo vaso, la sangre llega a zonas como bifurcaciones o a zonas de turbulencia en donde la orientación y la forma celular son impredecibles debido a que las condiciones de estrés son variables.^{13,23}

Para explicar el papel del estrés hemodinámico en el mecanismo de la liberación de sustancias vasoactivas, en los últimos años se han propuesto algunos candidatos como:

1. Adhesiones focales¹³
2. Receptores acoplados a proteínas G.^{6,13}
3. Receptores a cinasas⁶
4. Proteínas integrales de membrana.
5. Canales iónicos sensibles a estiramiento.^{28,32}

Y de manera controversial, en el endotelio, a los canales de calcio dependientes de voltaje.^{33,34}

Adhesiones focales e integrinas

Las adhesiones focales son regiones de la superficie externa de la membrana celular que, por su contacto con elementos de la matriz extracelular, son los responsables de la adhesión celular, están involucradas en la regulación de señales en la célula endotelial, así como en la morfología, proliferación y diferenciación celular. Las integrinas son receptores transmembranales constituidos por heterodímeros de cadenas α y β que conectan las interacciones entre la actina del citoesqueleto y la fibronectina de la matriz extracelular, para mantener la tensión interna de la célula. Recientemente se ha identificado a las adhesiones focales como sitios en los que hay una gran actividad de la proteína cinasa, la cual está implicada en mecanismos de señalización celular.¹³

Receptores acoplados a proteínas G

Entre las posibilidades para explicar el o los mecanismos de transducción de estímulos, se menciona a los receptores acoplados a proteínas G. Estas son heterotrímeros compuestos por subunidades α , β y γ . Aunque la actividad de las proteínas G es muy diversa, se sabe que participan en la regulación de funciones

vasculares que pudieran estar relacionadas con el estrés mecánico que ejerce el flujo sobre el endotelio.

Una de las acciones características de las proteínas G, es la activación de la fosfolipasa C (PLC) para generar inositol 1,4,5,-trifosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG), los cuales participan en el incremento del Ca^{2+} . Este ión es proveniente de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} (retículo endoplásmico).¹³ (figura 4)

Proteínas { **Gi** : Inhiben la adenilato ciclasa y la activación de canales de K^+
Gs : Estimulan la adenilato ciclasa y activan canales de Ca^{2+} .
Gq : Activan la PLC con liberación de DAG e IP_3 .

Receptores muscarínicos

Otra vía por la cual se incrementa el Ca^{2+} , es a través de receptores muscarínicos. La acción relajante de la acetilcolina es dependiente del endotelio vía receptores muscarínicos, cuya activación produce hidrólisis de polifosfoinosítidos y movilización de Ca^{2+} del retículo endoplásmico hacia el citoplasma (figura 4), posiblemente como consecuencia de una activación de fosfolipasa C mediada por una proteína G. En el corazón, los receptores muscarínicos son del tipo M1 y M3 ¹³

Canales de calcio dependientes de voltaje

Una vía de entrada de calcio en muchas células, son los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), los cuales son altamente selectivos y están presentes en neuronas, células musculares y células secretoras. Los CCDV se presentan en diferentes formas, cuyas diferencias son principalmente por la respuesta a algunas drogas, o a la cinética de activación-inactivación.³⁴ Los CCDV se subdividen en tres tipos;

1.- Canales Ca^{2+} tipo L, cuya característica es la corriente de Ca^{2+} lenta.

2.- Canales Ca^{2+} tipo T, con una corriente de Ca^{2+} rápida o transitoria

*Los canales tipo T y tipo L se encuentran en células cardíacas.

3.- Canales Ca^{2+} tipo N, que se encuentran en células nerviosas.

La existencia de estos canales en la célula endotelial es muy controversial, sin embargo, recientemente se han descrito canales de calcio tipo-T y tipo-L en células endoteliales microvasculares de médula adrenal de bovino,³⁴ lo que sugiere que este tipo de canales pudiera encontrarse también en células endoteliales de otros lechos vasculares.

Estas son solo algunas de las posibilidades, a través de las cuales se incrementa el Ca^{2+} dentro de la célula y que activa a la ONSc para catalizar la reacción de síntesis

del ON. Los mecanismos por los que se dan estos eventos no se conocen bien, pero como hemos visto pueden estar relacionados con el estrés hemodinámico. (figura 4)

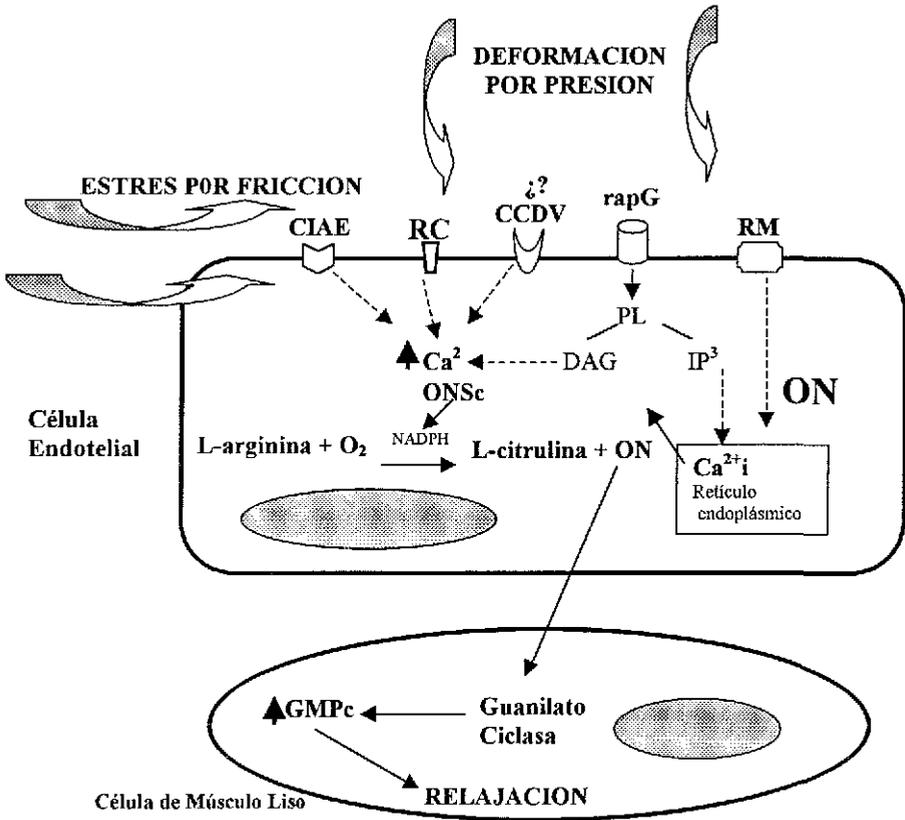


Figura 4

Dirección de las fuerzas hemodinámicas del flujo. El estrés por fricción actúa tangencialmente y la deformación por presión lo hace perpendicularmente sobre la célula endotelial. Se indican también en esta figura, algunas de las posibles vías de activación de la célula endotelial para la liberación de ON, en donde CIAE representa un canal iónico que se activa por estiramiento; CCDV, representa canales de calcio dependientes de voltaje; RC es un receptor a cininas; rapG es un receptor acoplado a proteínas G; RM representa un receptor muscarínico. Las flechas punteadas indican que los mecanismos de activación no están definidos claramente.

En este trabajo, decidimos explorar la participación de los canales iónicos sensibles a estiramiento, en el mecanismo de liberación del ON, por lo que a *continuación mostramos las principales características de ese tipo de canales.*

Canales iónicos que se activan por estiramiento

Los canales sensibles al estrés mecánico se han descrito en las membranas celulares de diferentes especies de plantas, animales y bacterias,^{7,35} así como en diferentes tipos celulares de una misma especie, por lo que en lo referente a nuestro estudio, en corazón de mamífero, es importante mencionar que estos canales, se conocen como canales iónicos que se activan por estiramiento (CIAE) y se han descrito en células de MLV,³⁵ células endoteliales,^{12,27} cardiomiocitos,^{36,37} entre otras. La sensibilidad de estos canales al estiramiento se traduce en respuestas celulares como la regulación del volumen celular, el incremento intracelular de Ca^{2+} ,¹² la síntesis del ADN y alteraciones en la conducción eléctrica del corazón.³⁵

Entre las características descritas para los CIAE, se puede mencionar que funcionan como microsensores endoteliales a cambios en el ambiente hemodinámico y se destaca que en la aorta de rata hay por lo menos dos tipos de estos canales:¹²

- 1) Son no selectivos y permiten el tránsito a través de la membrana a iones como Na^+ , Ca^{2+} y K^+ .^{12,38} (figura 5)
- 2) Son selectivos a K^+ , participan en la hiperpolarización de la membrana.¹²

Aunque la participación de los CIAE como parte del mecanismo de transducción del estímulo mecánico se desconoce, investigaciones recientes muestran que la entrada de Ca^{2+} a la célula y la hiperpolarización²⁹ son importantes estímulos en el endotelio para la liberación del ON. Una aportación relevante para el estudio de estos canales, es que pueden bloquearse con elementos pertenecientes al grupo de los lantánidos; gadolinio (Gd^{3+}), lantano y lutetio.^{35,38} En un estudio realizado por Xian-Cheng Yang y colaboradores.³⁸ sobre los CIAE en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante la técnica de Patch Clamp,^{38,39} se estableció que el Gd^{3+} es el bloqueador más potente, a concentraciones que van de $1\mu\text{M}$ a $10\mu\text{M}$ y que los otros dos lantánidos también producen el bloqueo de los CIAE, pero a concentraciones tan altas como $100\mu\text{M}$, de tal manera que el catión trivalente Gd^{3+} es el más utilizado para estudiar sus efectos bloqueadores sobre estos canales (figura 5)^{38,39} Una característica importante en los estudios realizados en ovocitos de *Xenopus*, es que la actividad de los CIAE desaparece en 30 s, a una concentración de $10\mu\text{M}$ de Gd^{3+} , pero el bloqueo es reversible cuando se elimina la aplicación del Gd^{3+} .³⁸

Los CIAE se encuentran también en el endotelio vascular de los mamíferos y una de las respuestas de este tejido a la acción directa de las fuerzas hemodinámicas del flujo es la activación o inactivación de canales iónicos en la membrana^{12,14} (Figura 4). Esas fuerzas físicas a las que está expuesto el endotelio, inducen también respuestas adaptativas de remodelación de la forma celular mediante la tensión que se produce en el citoesqueleto y de las extensiones de éste que unen una célula con otra, a través de adhesiones focales, para equilibrar la presión externa^{7, 14,18}

Con base en lo anterior, es posible que los CIAE participen como mecanosensores (figura 5) induciendo la hiperpolarización de la membrana por flujo de iones como el K^+ y que sean parte del mecanismo de liberación del ON por incrementos de Ca^{2+} dentro de la célula.³⁹

En un modelo de corazón aislado, estudiamos la posibilidad de que el mecanismo mediante el cual el flujo coronario estimula la liberación del ON, esté regulado por los CIAE, funcionando como mediadores mecánicos en la liberación de este gas. Además evaluamos el efecto del flujo sobre la liberación del ON, relacionando a ésta la participación de la óxido nítrico sintasa (ONS) en sus isoformas constitutiva (ONSc) e inducible (ONSi).

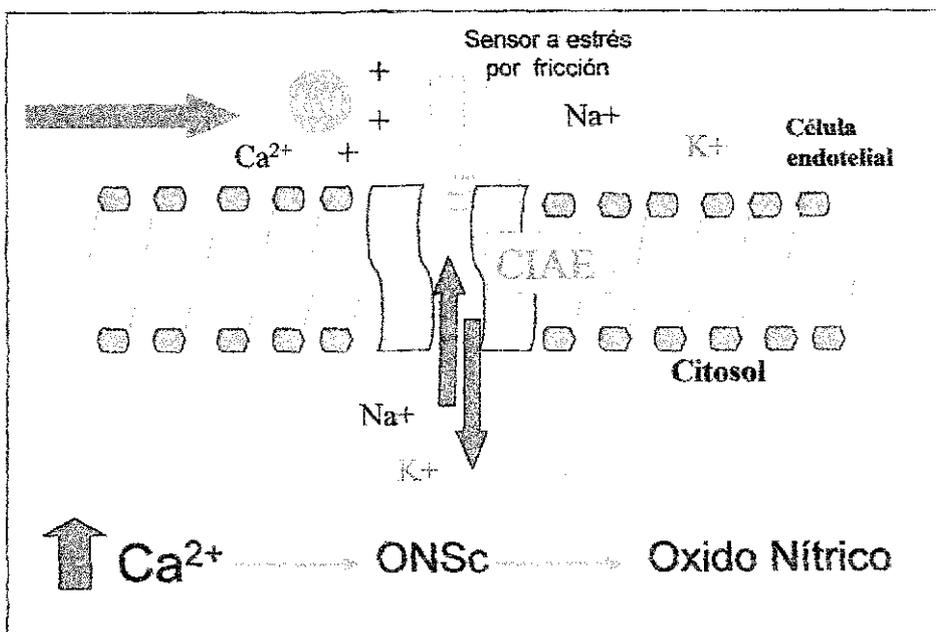


Figura 5

Canales iónicos que se activan por estiramiento (CIAE)

En esta figura se esquematizan las principales características que se conocen sobre los CIAE:

- *Son canales transmembranales, sensibles en este caso, al estrés físico generado por el flujo sanguíneo sobre la célula endotelial.*
- *Son inespecíficos para iones como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} .*
- *Pueden ser bloqueados con Gd^{3+} .*
- *Es posible que la sensibilidad de los CIAE al estrés hemodinámico, sea a través de un sensor en la membrana que hasta ahora es desconocido.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Planteamiento del problema

En trabajos anteriores, hemos demostrado³² que el flujo coronario es un modulador de funciones cardíacas como la contracción ventricular o la conducción auriculoventricular y que es parte importante del mecanismo de transducción de estímulos, pero no se sabe mucho acerca de ese mecanismo. Sabemos que el flujo sanguíneo genera estrés mecánico sobre las células endoteliales y que a través de segundos mensajeros, se inducen respuestas que regulan el tono del músculo liso vascular; sin embargo, tampoco se sabe cómo es que el flujo interactúa con el endotelio para transformar un mensaje mecánico a un mensaje químico que genere la respuesta celular.

En este trabajo se exploró la relación entre el estrés mecánico y el mensaje químico. Pensamos que los canales iónicos que se activan por estiramiento en la membrana de la célula endotelial, están involucrados en el estímulo mecánico sobre ella para la liberación del óxido nítrico en el corazón. Por ello se estudió el papel de estos canales en la liberación del óxido nítrico estimulada por el flujo.

Objetivo general

Estudiar el mecanismo por el cual el flujo coronario estimula la liberación de óxido nítrico en el corazón.

Objetivos particulares

- Determinar si el flujo coronario está involucrado en la liberación del ON en el corazón
- Evaluar la participación de los CIAE en la estimulación de la liberación del ON por el flujo coronario.
- Explorar si el flujo y los CIAE están involucrados en la activación de la ONSc y de la ONSi.
- Explorar el papel de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T y tipo L en la liberación del ON estimulada por el flujo

Hipótesis

Puesto que los canales iónicos activados por estiramiento están involucrados en el mecanismo de transducción, durante la estimulación por el flujo, de la contracción y la conducción cardíaca, y si estos fenómenos son dependientes de Ca^{2+} , pudiera ser que sí la liberación de óxido nítrico estimulada por el flujo, es dependiente de Ca^{2+} , sea

Objetivo general

Estudiar el mecanismo por el cual el flujo coronario estimula la liberación de óxido nítrico en el corazón.

Objetivos particulares

- Determinar si el flujo coronario está involucrado en la liberación del ON en el corazón
- Evaluar la participación de los CIAE en la estimulación de la liberación del ON por el flujo coronario.
- Explorar si el flujo y los CIAE están involucrados en la activación de la ONSc y de la ONSi.
- Explorar el papel de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T y tipo L en la liberación del ON estimulada por el flujo

Hipótesis

Puesto que los canales iónicos activados por estiramiento están involucrados en el mecanismo de transducción, durante la estimulación por el flujo, de la contracción y la conducción cardíaca, y si estos fenómenos son dependientes de Ca^{2+} , pudiera ser que sí la liberación de óxido nítrico estimulada por el flujo, es dependiente de Ca^{2+} , sea

Metodología

Utilizamos el modelo de corazón aislado y perfundido de cobayo por el método de Langendorff a flujo de perfusión constante⁴⁰. Los animales de experimentación fueron cobayos macho de 300 a 350 grs de peso, bajo anestesia por vía intraperitoneal (pentobarbital 0.1ml/100grs) y se mantuvieron con ventilación artificial hasta extraer el corazón, el cual una vez aislado, se conectó inmediatamente por la aorta ascendente a una cánula de perfusión (figuras 7 y 8A). El líquido de perfusión fue una solución Krebs a un pH de 7.4 a la cual se añadió oxihemoglobina (HbO₂) 2μM. Esta solución se mantuvo a una temperatura de 37°C controlada con un recirculador térmico; durante el experimento, este líquido se burbujeó con una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de O₂ (carbógeno) y la velocidad de perfusión se controló mediante una bomba peristáltica (figura 7). Una característica importante de este modelo es que el líquido de perfusión pasa directamente a las arterias coronarias ya que la válvula aórtica que normalmente impide el regreso de la sangre al ventrículo, sirve como barrera y no permite el paso del líquido de perfusión, manteniendo a los ventrículos vacíos (figura 8 A y B).

Una vez que el corazón es conectado a la cánula de perfusión, el experimento consiste de:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Un periodo de 30 min de estabilización, en el que el corazón se adapta a las nuevas condiciones de perfusión (25 ml/min durante 5 min y 10 ml/min durante 25 min) El corazón es estimulado eléctricamente a una frecuencia de 4 Hz.
- Se plantearon series experimentales en donde cada corazón fue su propio control $n=5$ y $p<0.05$ para cada experimento. Una serie experimental consta de una curva control con variaciones en la velocidad de perfusión (5 a 25 ml/min a intervalos de 2 ó de 5 ml/min, con un tiempo de 2 min para cada intervalo) y una curva experimental con las mismas variaciones en presencia o ausencia de los fármacos que se indican en la Tabla II. La aplicación de los fármacos se realizó con una bomba de infusión continua (0.01 ml/min) mezclando el fármaco correspondiente con el líquido de perfusión antes de entrar a las arterias coronarias (figura 7).

Para cada experimento se registró la presión de perfusión (PP) y la presión ventricular izquierda (PVI) mediante transductores de presión conectados a un polígrafo. En el caso de la PVI, se introduce un baloncito de látex al ventrículo izquierdo (figura 7).

Con los registros de la presión de perfusión se calcularon los valores de resistencia vascular con la siguiente relación, $RV = P/F$, donde RV es la resistencia vascular, P es la presión de perfusión en mmHg; y F es la velocidad de flujo en ml/min.⁴⁰

Se tomaron muestras de cada velocidad de perfusión para cuantificar la liberación del ON como se explica más adelante.

Fármacos

Gadolinio

Es un lantánido trivalente que bloquea el flujo de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ por los CIAE en diversos tipos celulares. El mecanismo de acción del gadolinio sobre la célula endotelial se desconoce, pero al bloquear la entrada de calcio a la célula nos permite explorar en las arterias coronarias la participación de los CIAE y de la ONSc en la liberación de ON dependiente del flujo. Con la inducción experimental de la ONSi, exploramos si esta también es dependiente del flujo y de los CIAE. La concentración 3 μM de gadolinio que utilizamos en este trabajo se obtuvo de curvas dosis – respuesta.³⁸

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L-NAME

Es un análogo de la L-arginina muy utilizado en modelos animales y en estudios clínicos relacionados con los efectos fisiopatológicos como el daño y/o la disfunción tisular producidos por la alteración de los niveles basales del ON. El L-NAME es un potente competidor de la L-arginina por el sitio catalítico de la ONS e inhibe la síntesis del ON, con lo cual se atenúa la respuesta inflamatoria (por inhibición de la ONSi) y el daño a los tejidos ⁴¹

Para realizar las pruebas de inhibición de la ONS, utilizamos una concentración 100 μM de L-NAME. ⁴²

Acetilcolina (AcCh)

Las pruebas realizadas con AcCh se hicieron para verificar que la liberación del ON vía receptores muscarínicos no se afecta con el Gd^{3+} . La concentración 4 μM se obtuvo de curvas dosis-respuesta.

Sulfofenil teofilina (SPT)

Es un bloqueador de receptores de adenosina (ADO). Los receptores de este autacoide (purinérgicos) se encuentran en las membranas plasmáticas de muchos tipos celulares incluyendo al endotelio. Las pruebas realizadas sobre receptores de ADO fueron para explorar el papel de la ADO en la vasodilatación inducida por el estrés hemodinámico. Se utilizó una concentración 10 μM de SPT.⁴³

Verapamil y Mibefradil

Son bloqueadores de canales de calcio dependientes de voltaje. El verapamil bloquea canales de calcio tipo L, y el mibefradil bloquea canales de calcio tipo T respectivamente. Este tipo de canales es muy abundante en el músculo cardiaco.

Tratamiento con lipopolisacárido (LPS)

El lipopolisacárido bacteriano se utilizó como un activador de la ONSi.^{16,22,25} En este caso los animales fueron pretratados con inyección intraperitoneal del LPS a una dosis de 15 mg/Kg de peso corporal, 4 horas antes del experimento. En estas condiciones se realizaron las mismas pruebas farmacológicas que en los animales no tratados. Para cada serie experimental (n=5, p<0.05) los fármacos correspondientes se

inyectaron a la cánula de perfusión mediante una bomba de infusión continua a una velocidad de 0.01 ml/min. Se hicieron registros y cálculos de: PP, RVC, PVI (figura 7)

Después de tomar muestras para cada variación de la velocidad de perfusión, se cuantificó la liberación de ON.

NOTA: Antes de iniciar los experimentos, se mezcló HbO₂ en cantidad suficiente con el líquido de perfusión para obtener una concentración final de 2μM.

Tabla II

Reactivos utilizados en las curvas experimentales

<u>NOMBRE</u>	<u>SÍMBOLO</u>	<u>CONCENTRACIÓN</u>	<u>ACCION</u>
Gadolinio	Gd ³⁺	3 μM	Inhibición de CIAE
N ^w -nitro-L-arginina-metil-ester	L-NAME	100μM	Inhibición específica de la ONS
Infusión simultánea de Gd + L-NAME			
Sulfonil teofilina	SPT	10μM	Inhibición de receptores de adenosina
Infusión simultánea de SPT + L-NAME			
Acetilcolina	AcCh	4μM	Estimulación de la síntesis de ON
Infusión simultánea de Gd + AcCh			
Verapamil	Vp	3nM	Inhibición de los canales de calcio tipo L
Mibefradil	Mib	8μM	Inhibición de los canales de calcio tipo T
Lipopolisacárido bacterial	LPS	Dosis 15 mg/Kg	Activación de la ONSi

Cuantificación de óxido nítrico

En este estudio usamos un ensayo espectrofotométrico basado en el método de Schrader,⁴² que nos permite cuantificar la liberación de ON en el endotelio vascular coronario, cuantificando la transformación de HbO₂ a MetHb en el perfusado efluente de las arterias coronarias por efecto redox del ON que se libera. Para esto se tomaron muestras del líquido efluente de las arterias coronarias, en cada velocidad de perfusión y se analizaron por espectrofotometría en la región visible, a un coeficiente de extinción de 401 - 411 nm. La HbO₂ es un conformero funcional bioactivo de la hemoglobina, y es utilizada para tal fin por su elevada afinidad por el ON (menos de 100 ms) que la reduce a MetHb.⁴² La MetHb es estable bajo condiciones experimentales óptimas (37°C y saturación de O₂) por lo que es cuantificable. Una característica importante del método que nos permite hacer la cuantificación del ON es la elevada afinidad de la HbO₂ por el ON y porque ni la RVC ni la PVI son alteradas por la perfusión de la HbO₂ en condiciones control.²⁸

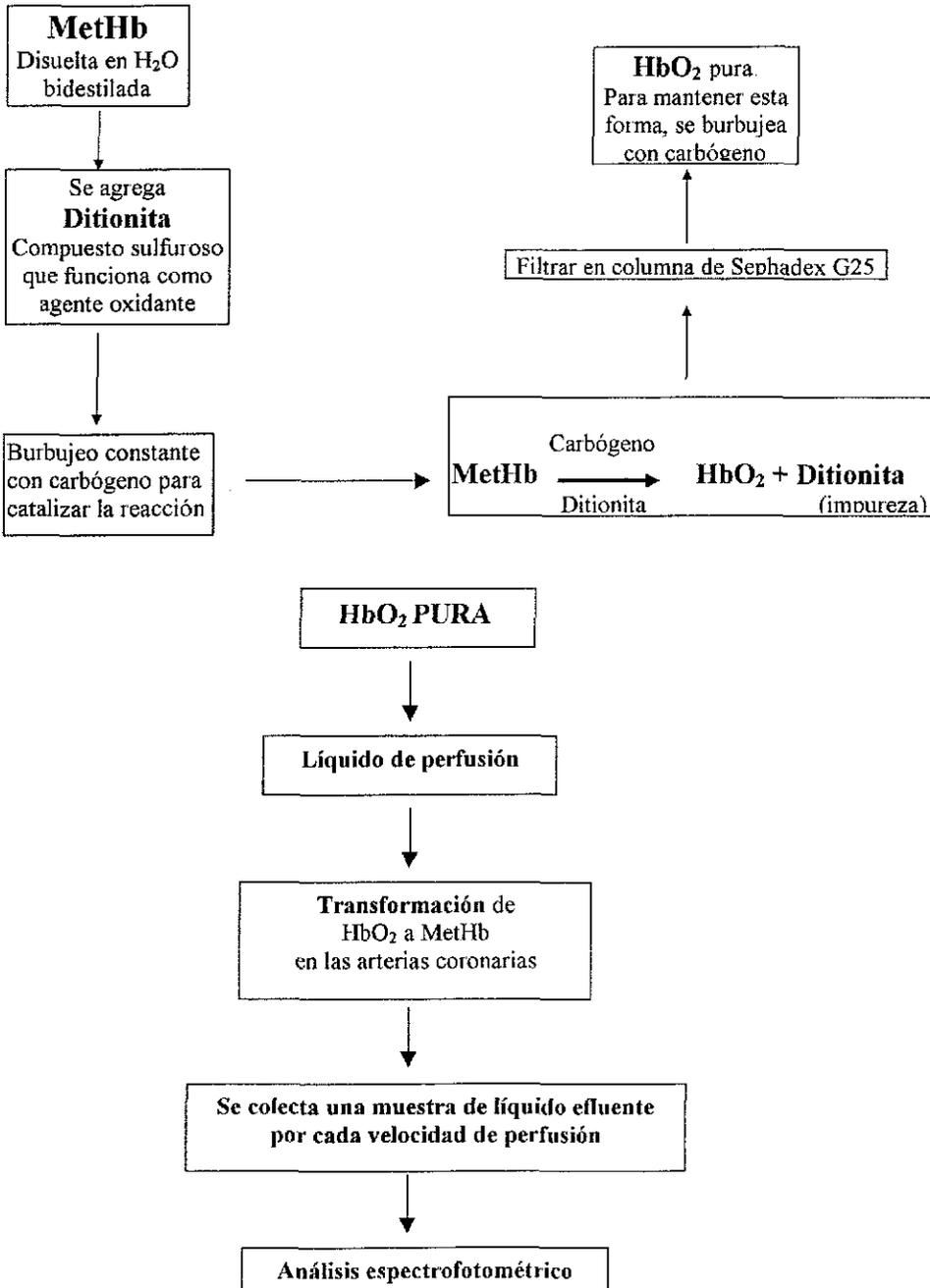
La reacción que se efectúa es la siguiente:



Análisis estadístico

Los resultados están expresados como la media \pm el error estándar. Se realizó un tratamiento estadístico ANOVA para los valores obtenidos de corazones que fueron su propio control, en la aplicación de los fármacos. Para determinar la significancia estadística de nuestros resultados, utilizamos la prueba de t de Student donde los valores con una $P \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

A continuación se muestra la obtención⁴² de HbO₂ pura:



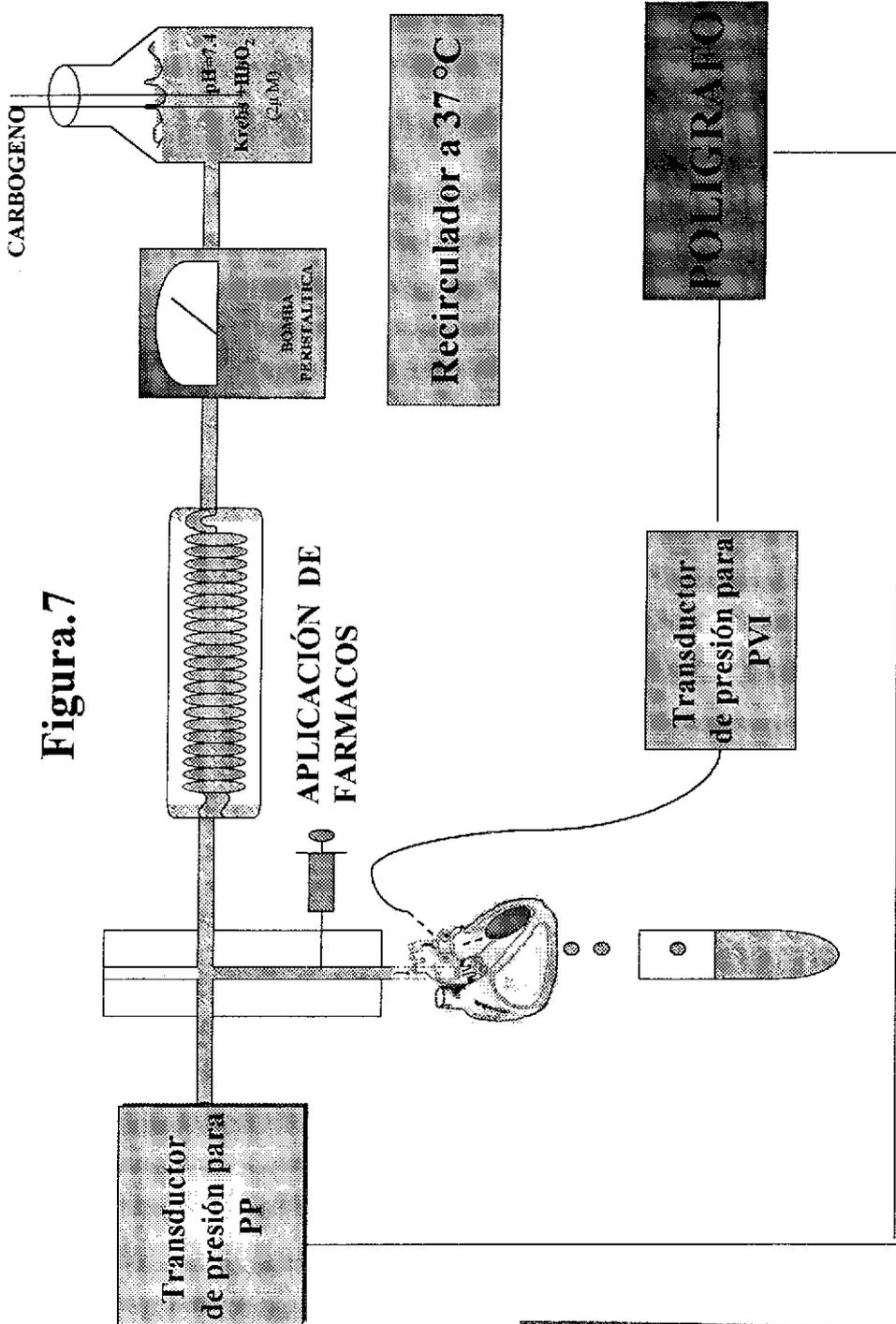


Figura.7

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Velocidad de perfusión 5, 10, 15, 20 y 25 ml/min

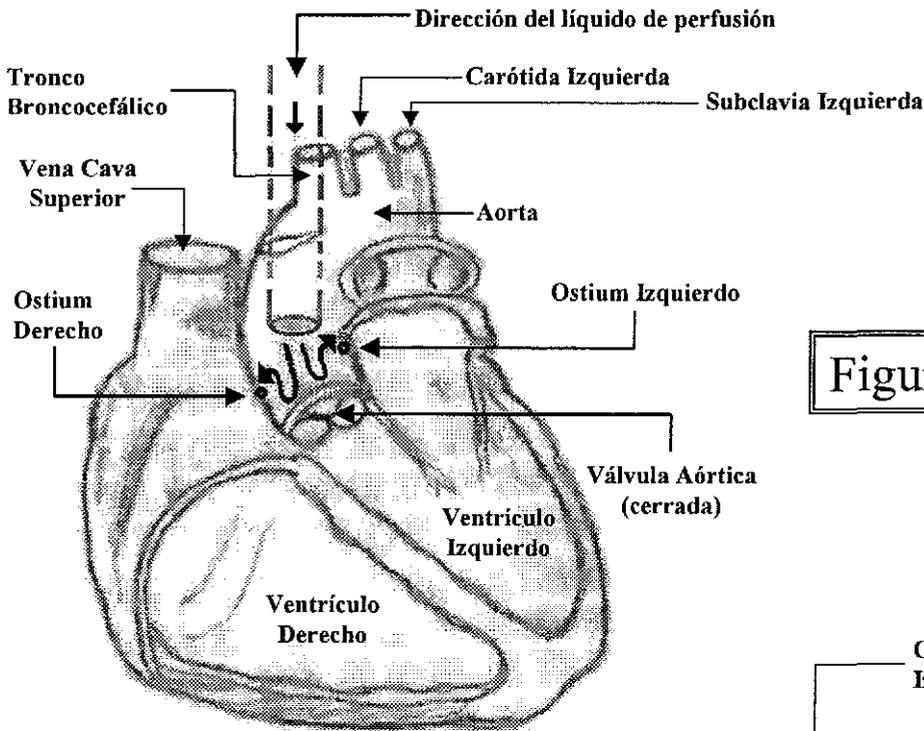


Figura 8-A

En esta figura es importante destacar las características anatómicas en el corazón, que nos permite hacer los estudios de perfusión sobre las arterias coronarias. Una de estas características es la válvula aórtica la cual, en el modelo de Langendorff, mantiene los ventrículos vacíos (8-A); y la perfusión de las coronarias, se inicia a través de los ostium izquierdo y derecho (8-A y 8-B).

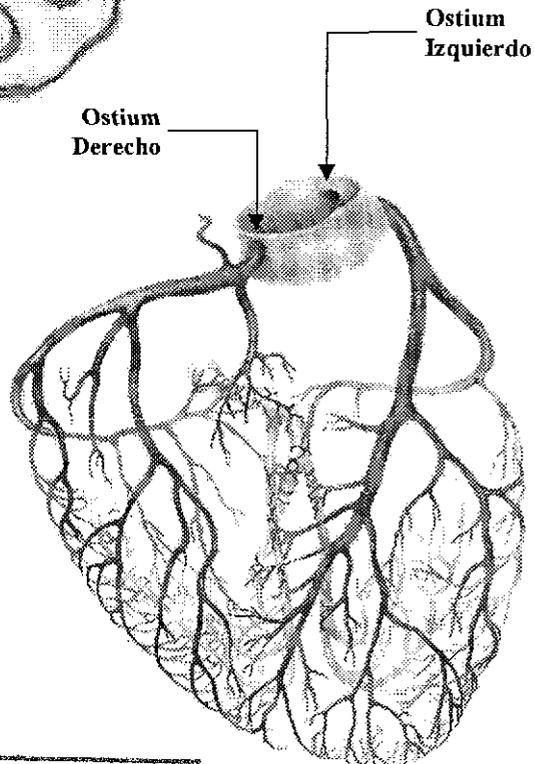


Figura 8-B

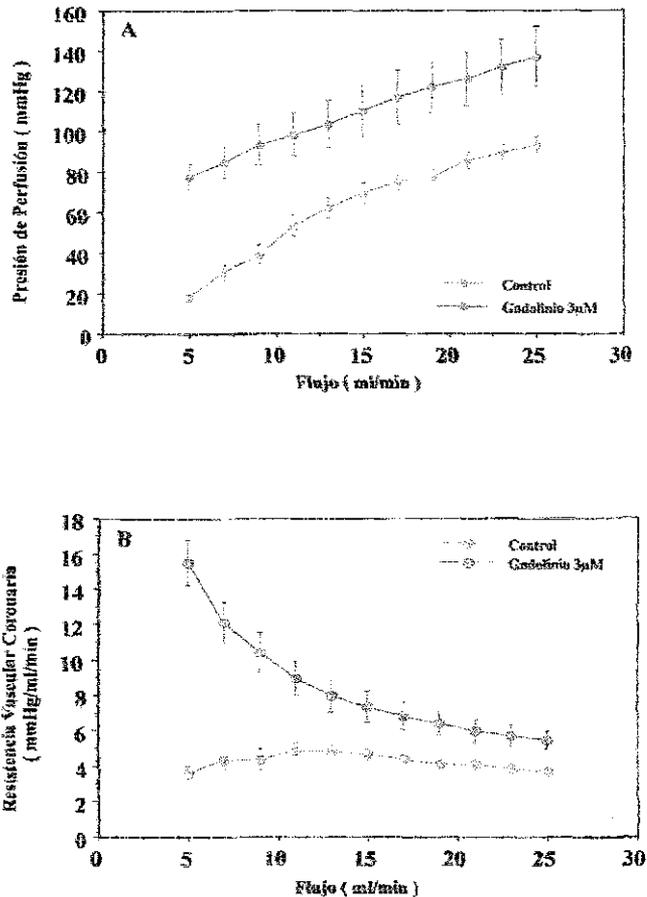
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Resultados

La síntesis del ON en las arterias coronarias está mediada por el flujo sanguíneo, el cual regula la entrada de calcio a la célula endotelial por un mecanismo desconocido, por lo que de las posibilidades que se sugieren para explicarlo, nosotros exploramos en corazones aislados, expuestos a variaciones en la velocidad de perfusión, si los CIAE son parte integral de ese mecanismo.²⁸ Analizamos la PP en ausencia de fármacos y en presencia del Gd^{3+} , siendo cada corazón su propio control. Una concentración $3\mu M$ de Gd^{3+} provoca que la PP se eleve de manera significativa aproximadamente 3 veces más (300%) que el control en todos los puntos (figura 9 A) ($n=5$, $p<0.05$).

Con base en estos resultados calculamos la RVC, la cual en condiciones control, se mantiene en un mismo nivel de resistencia, aun con los incrementos en la velocidad de perfusión (figura 9 B), sugiriendo un mecanismo de autorregulación del tono vascular. El Gd^{3+} produce inicialmente un efecto constrictor que se revierte, con tendencia hacia los valores basales a medida que se incrementa la velocidad de perfusión (figura 9 B)

Con la cuantificación del ON liberado en cada velocidad de perfusión (figura 10), es muy claro que el incremento en el estrés hemodinámico del flujo induce el aumento en la liberación del ON y que ésta es inhibida por el Gd^{3+} . Es evidente que los CIAE participan en el mecanismo de liberación del ON y que la ONSc es dependiente del estrés físico del flujo ($n=5$, $p<0.05$)



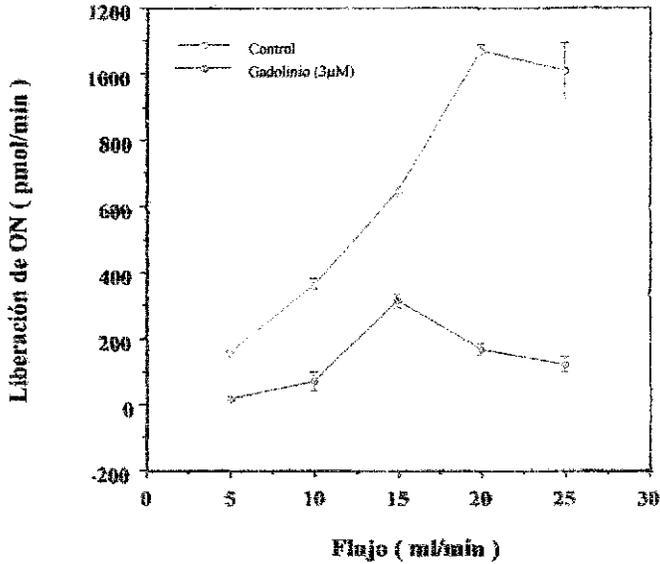
Suárez, J., Torres, C., Sánchez, L., del Valle, L., Pastelin, C.: Flow Stimulates Nitric Oxide Release in Guinea Pig Heart: Role of Stretch-Activated Ion Channels. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 6-9 (1999)

Figura 9

Efecto del Gd^{3+} sobre la presión de perfusión (PP) y sobre la resistencia vascular coronaria (RVC).

En esta figura se muestra la respuesta del endotelio coronario a las fuerzas físicas del flujo en corazones aislados expuestos a diferentes velocidades de perfusión, en ausencia de fármacos, panel A (verde) y en presencia del Gd^{3+} (azul). En el panel B se muestra la RVC en condiciones control (verde) y el efecto constrictor reversible del Gd^{3+} (azul). ($n=5$, $p<0.05$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Suarez, J. *et al* Biochemical and Biophysical Research Communications 261, 6-9 (1999)

Figura 10

Efecto de la inhibición de los CIAE sobre la liberación del ON en la vasculatura coronaria.

Para cuantificar la liberación del ON en los corazones, se tomaron muestras del líquido efluente en cada velocidad de perfusión y se analizaron por espectrofotometría de uv. En esta figura se muestra la liberación del ON en condiciones control (verde) y el efecto inhibitorio del Gd³⁺ (azul) por bloqueo de los CIAE. (n=5, p<0.05)

Para comparar el efecto de las variaciones en la velocidad de perfusión sobre la liberación del ON en el corazón y para verificar que la concentración $3\mu\text{M}$ de Gd^{3+} que utilizamos no afecta otras vías por las que se induce la liberación del ON, se realizaron pruebas en otro grupo experimental que consistieron en, una curva control, una curva en presencia del Gd^{3+} y, finalmente, una curva en la que sin detener la aplicación del Gd^{3+} , se aplicó la AcCh $4\mu\text{M}$ también en infusión continua, como un promotor de la liberación del ON dependiente de receptores muscarínicos en el endotelio. Como se puede observar en la figura 11, en condiciones control, a mayor estrés físico del flujo sobre el endotelio se produce el ON en mayor cantidad. El bloqueo de los CIAE con el Gd^{3+} provoca un efecto inhibitorio hacia la liberación del ON.

La liberación del ON vía AcCh se incrementa significativamente a partir de $10\text{ml}/\text{min}$, aproximadamente 3 veces más (300%) que los niveles basales y no se afecta por la presencia de Gd^{3+} . ($n=5$, $p<0.05$)

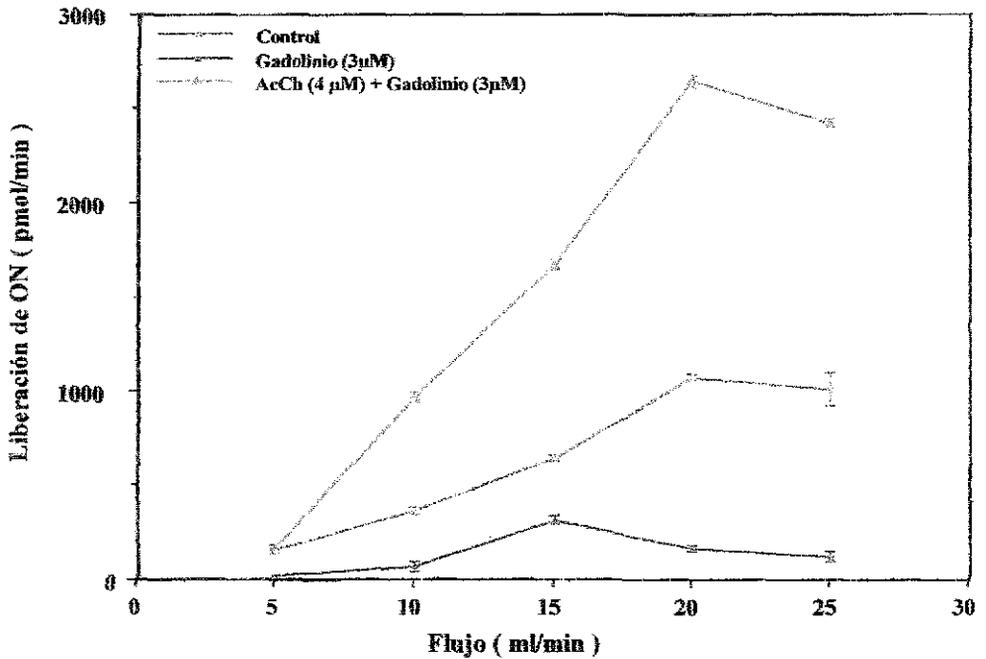


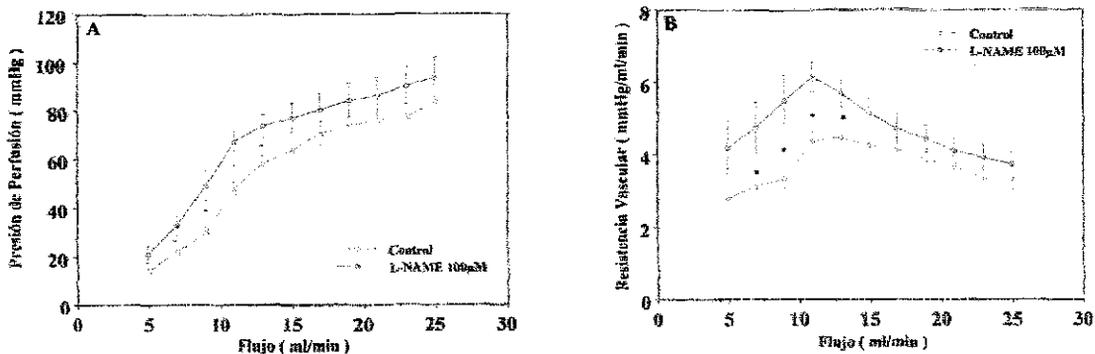
Figura 11

Relación comparativa entre los efectos de estimulación e inhibición de la liberación del ON en el endotelio vascular coronario.

En esta figura se muestra el efecto en la liberación del ON producido por variaciones en la velocidad de perfusión sobre el endotelio coronario. En ausencia de fármacos (verde) y en presencia del Gd^{3+} (azul). La liberación del ON generada por la acción de la AcCh (rojo) no se afecta por la presencia del Gd^{3+} ($n=5$), $p<0.05$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una de las estrategias para estudiar los mecanismos involucrados en la liberación del ON y los efectos producidos por la disminución de este gas en diferentes modelos animales, así como en estudios clínicos, es la inhibición específica de la ONS con análogos de la L-arginina, de los cuales, uno de los más potentes es el L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME). Nosotros utilizamos este compuesto a una concentración 100 μM en aplicación continua sobre el corazón aislado y perfundido, analizando la PP, RVC y la liberación del ON en ausencia y presencia del L-NAME.⁴³ En la figura 12, se muestran los resultados de otro grupo experimental en el que los corazones fueron sometidos a variaciones en la velocidad de perfusión en ausencia y en presencia del L-NAME. La PP (figura 12 A), en ausencia del L-NAME se incrementa en cada aumento de la velocidad de perfusión. El L-NAME propicia que la PP se incremente en todos los puntos, con diferencias significativas en el intervalo de velocidad de perfusión de 7 a 13 ml/min. La RVC (figura 12 B) muestra una respuesta de constricción sostenida en flujos bajos hasta 13 ml/min, después de ese punto se observa la tendencia hacia los valores basales. La liberación del ON (figura 12 C), disminuye significativamente por la acción del L-NAME a partir de 10ml/min con respecto al control, pero sin que se afecte la respuesta celular al flujo. (n = 5, p<0.05).



J. Suárez & J.C. Torres. Proc. West. Pharmacol.

Figura 12

Efecto de la inhibición de la ONS sobre la PP, la RVC y la liberación del ON.

En esta figura, se muestran los resultados de la respuesta endotelial a la inhibición de la ONS. Los corazones fueron aislados y perfundidos en ausencia y en presencia del L-NAME. En (A), se representa la PP en condiciones control (verde) y por aplicación del L-NAME (azul). En (B), la RVC se indica como control (verde) y por acción del L-NAME (azul). La liberación del ON (C), disminuye significativamente por la acción del L-NAME (rojo) a partir de 10ml/min con respecto al control (azul) pero sin que se afecte la respuesta celular al flujo. ($n = 5$, $p < 0.05$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Otra sustancia con efectos vasodilatadores es la adenosina (ADO)⁴⁴, la cual es liberada por el endotelio en respuesta al estrés hemodinámico, incluyendo condiciones de hipoxia e isquemia. La ADO está involucrada en la modulación de la RVC regulada por el flujo y junto con el ON participa en numerosas condiciones fisiológicas y patológicas.^{43,44} En el endotelio vascular existen receptores para la ADO, del tipo purinérgico, lo que nos permitió explorar la participación de este autacoide en la regulación de la RVC del corazón aislado. Para este estudio se utilizó la sulfonil tiofilina (SPT), que es un bloqueador de los receptores de la ADO y se aplicó a una concentración 10 μ M en infusión continua al líquido de perfusión antes de llegar a las arterias coronarias. La PP tiene incrementos significativos en el intervalo de velocidad de perfusión de 5 a 13 ml/min (figura 13 A), en ese mismo intervalo, la RVC muestra un efecto constrictor que se revierte a los valores basales al aumentar la velocidad de perfusión (figura 13 B). Para explorar los efectos inhibitorios de la vasodilatación por dos vías, aplicamos de manera simultánea SPT y L-NAME a cada corazón perfundido. Comparando los resultados obtenidos por la acción del SPT (figura 13 A y B), con los que se muestran en los paneles C y D de la figura 13, hay un efecto mayor sobre la PP (figura 13-C) y sobre la RVC un efecto constrictor sostenido (figura 13-D) por la acción conjunta del SPT y el L-NAME.

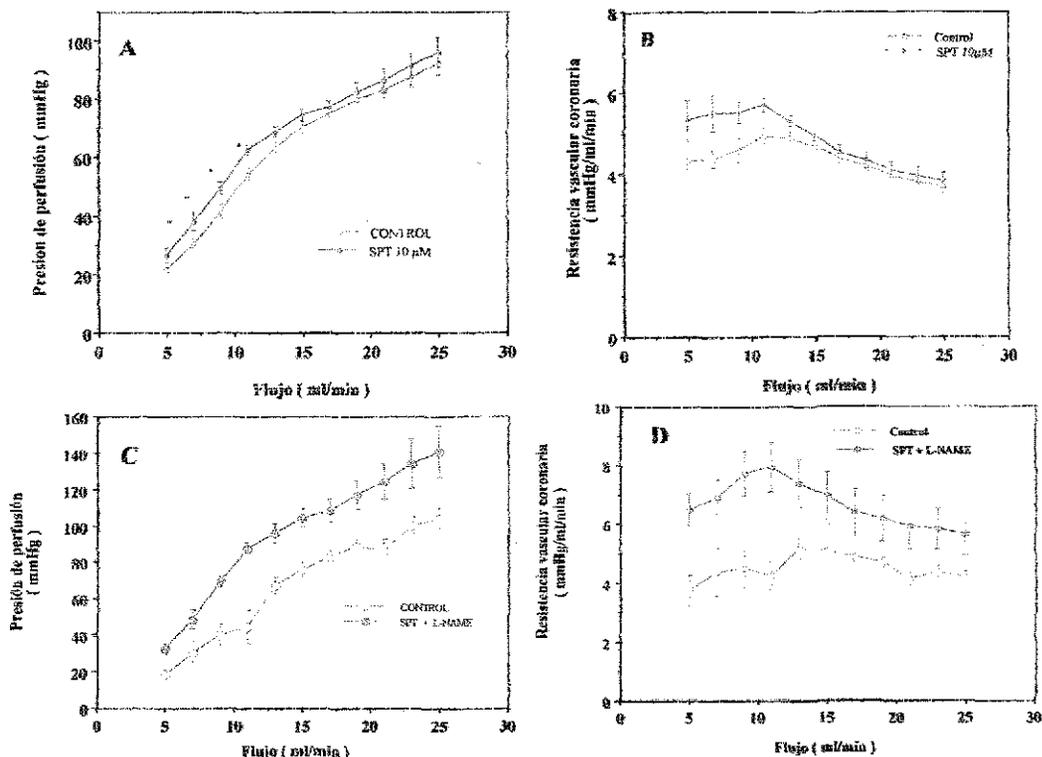


Figura 13

Efecto del bloqueo de receptores de adenosina con SPT sobre la PP y la RVC, en ausencia y presencia del L-NAME.

En esta figura se muestran los resultados de la PP y la RVC obtenidos de corazones aislados expuestos a diferentes velocidades de perfusión bloqueando los receptores de ADO. Como se puede observar en los paneles A y B, con la aplicación continua de SPT a las arterias coronarias, se obtuvieron resultados de la PP y de la RVC semejantes a los obtenidos con el L-NAME (figura 12). Con la aplicación simultánea de SPT+L-NAME, se genera un mayor incremento de la PP (C) y de la RVC (D) en el intervalo de 5 a 13 ml/min. n=5, p<0.05

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La existencia de los CCDV en las células endoteliales permanece controversial debido a que no hay muchas evidencias de su presencia en ese tipo celular. Sin embargo, en base a que se han reportado en células endoteliales microvasculares de bovino³⁴ y también a las evidencias que señalan que el gadolinio puede bloquear los CCDV a concentraciones elevadas (100 μ M ó más), realizamos algunas pruebas en corazones expuestos a las variaciones de flujo con aplicación de verapamil (0.03 μ M) para explorar la participación de los canales de calcio tipo-L en el efecto del flujo sobre la liberación del ON. En la figura 14 A, se muestran los resultados de la PP en los que no hay diferencias significativas entre la curva con aplicación del verapamil y la curva control. Estos resultados se reflejan en la RVC (figura 14 B) que sólo muestra un cambio significativo a flujo de 5ml/min que rápidamente se revierte a los valores basales. Como se puede observar en la figura 14 C, el bloqueo con verapamil de los canales de calcio tipo-L produce una disminución significativa en la liberación del ON, pero no se pierde la respuesta celular al flujo. (n=5, p<0.05)

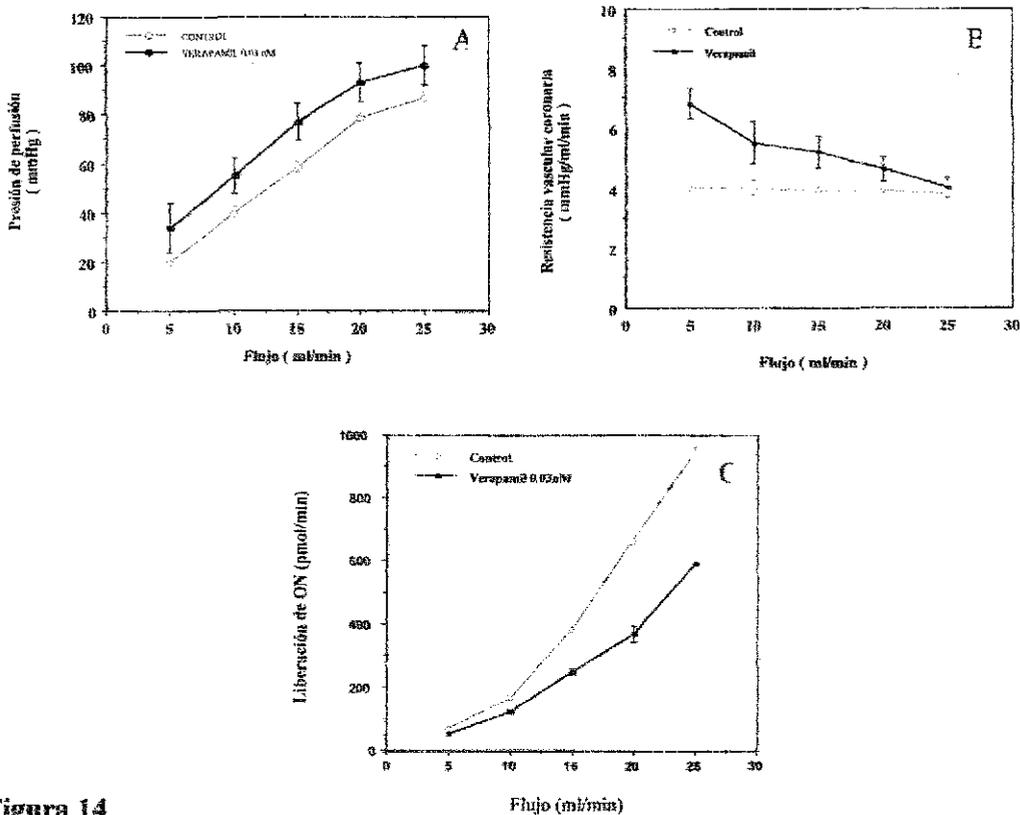


Figura 14

Efecto del bloqueo de CCDV tipo-L sobre la PP, la RVC y la liberación de ON.

En otro grupo de experimental, cada corazón se perfundió también a diferentes velocidades para incrementar el estrés físico del flujo sobre las arterias coronarias, en ausencia (verde) y en presencia del verapamil (negro) para bloquear los canales de calcio tipo L. En esta figura, se muestran los resultados de la PP (A), la RVC (B) y el efecto producido sobre la liberación del ON, ($n=5$, $p<0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A otro grupo de corazones se aplicó el mibefradil 8 μM para bloquear los canales de calcio tipo-T. En la figura 15 A se observa que el mibefradil no tiene efecto significativo sobre la PP, mientras que su acción (figura 15 B) genera un efecto constrictor a flujo de 5 ml/min que se pierde al aumentar la velocidad de perfusión. La liberación del ON (figura 15 C) disminuye significativamente, principalmente a flujos altos aproximadamente un 40% con respecto al control. Aunque la acción de la enzima está alterada por la disminución del Ca^{2+} intracelular aún hay respuesta endotelial al estrés hemodinámico. (n=5, p<0.05)

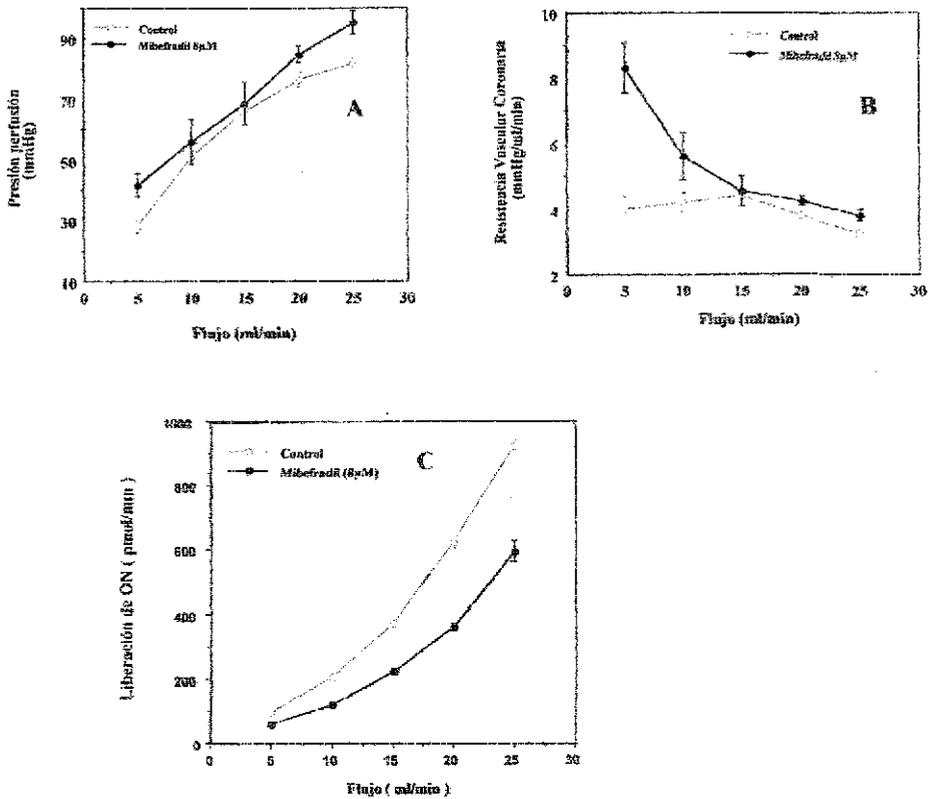


Figura 15

Efecto del bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo T en la PP, en la RVC y en la liberación del ON.

En esta figura se muestran los resultados obtenidos en corazones aislados y perfundidos en ausencia y en presencia del mibefradil. La PP (A) y la RVC (B) no muestran cambios significativos, mientras que la liberación del ON (C) disminuye significativamente con relación a la velocidad de perfusión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con las pruebas realizadas con el Gd^{3+} exploramos la participación de los CIAE en la liberación del ON dependiente de calcio, es decir, dependiente de la ONSc. Para explorar la liberación del ON generada por la ONSi, se utilizaron corazones de cobayos con tratamiento del lipopolisacárido bacteriano (LPS) para inducir la activación de la enzima. La aplicación del Gd^{3+} a estos corazones, nos permitió diferenciar la participación de la ONSc y la ONSi en la liberación del ON con respecto al estrés físico del flujo.

La activación de la ONSi se genera con el LPS inyectado al cobayo por vía intraperitoneal 4 horas antes de extraer el corazón. Es importante notar que en la figura 16 la curva control (con LPS) muestra en cada punto que la liberación del ON es mayor a la que se produce en corazones de animales no tratados. También es importante notar que en los corazones de animales pretratados, al aplicar el Gd^{3+} , la liberación del ON disminuye pero no se bloquea y sigue habiendo respuesta celular al flujo. La producción del ON que se obtiene aun con la aplicación del Gd^{3+} es muy similar a la de animales no tratados, lo que por diferencia reflejaría la acción de la ONSi. La liberación del ON inducida por la acetilcolina se incrementa significativamente por encima del control aún con la aplicación del Gd^{3+} . Con lo anterior podemos decir que el bloqueo de la entrada de calcio por los CIAE no afecta de manera determinante en la liberación de ON generado por la ONSi. ($n=5$, $p<0.05$)

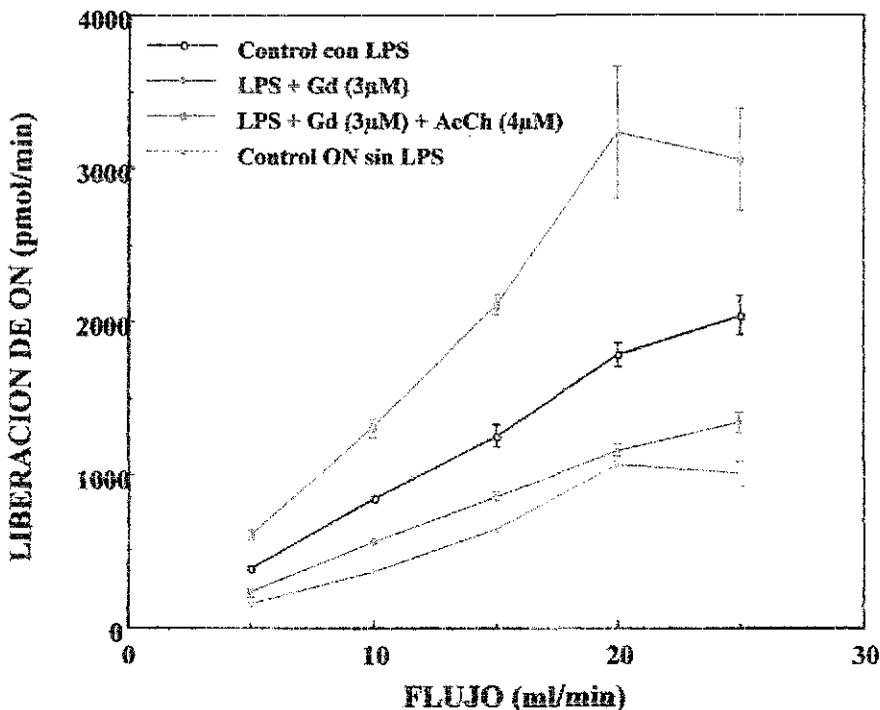


Figura 16

Efecto del Gd^{3+} y la AcCh sobre la liberación del ON en animales pretratados con el LPS para activar a la ONSi.

En esta figura se muestran las curvas que representan la liberación del ON, con respecto al estrés físico del flujo, en corazones de cobayos con tratamiento previo del LPS. En negro se representa la liberación del ON en condiciones control con LPS, en azul esta representada la aplicación del Gd^{3+} y en rojo la aplicación simultánea del Gd^{3+} y la AcCh. La curva en color verde se obtuvo en condiciones control sin LPS y se sobrepuso a esta figura para comparar y diferenciar la acción de la ONSe y la ONSi. ($n=5$, $p<0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión

Aunque el mecanismo por el cual la célula endotelial es estimulada para la liberación del ON se desconoce, con base en estudios recientes en los que han explorado la participación del endotelio vascular en diversos procesos fisiológicos y patológicos,^{3,10,11,13,20,26} así también por los resultados obtenidos en este trabajo,^{28,43} podemos mencionar factores que tienen un papel clave en ese mecanismo:

- 1.- El flujo coronario que induce el estrés por rozamiento y genera el estímulo mecánico^{23,30}
- 2.- La célula endotelial como el primer sensor del estímulo mecánico y el lugar donde se llevan a cabo las reacciones químicas para la liberación de las sustancias constrictoras y relajantes.^{13,18}
- 3.- Al Ca^{2+} como un activador esencial de la ONSc en la síntesis basal del ON.^{4,6,23,28-30}
- 4.- El ON como uno de los segundos mensajeros más importantes en el efecto de relajación dependiente del flujo.^{10,24,25,31}
- 5.- A los CIAE (hasta ahora) como reguladores muy importantes de la entrada del Ca^{2+} a la célula endotelial.³⁹

Con el modelo de corazón aislado, hemos obtenido evidencias de que los CIAE representan en la célula endotelial de las arterias coronarias una estructura de respuesta a las fuerzas físicas del flujo, a través de la cual se regula importantemente la entrada de Ca^{2+} a la célula.³⁹ Sin embargo, no sabemos cuál es el punto de conexión entre el estrés hemodinámico y la célula endotelial, que a manera de sensor en la membrana, propicie el cierre o apertura de estos canales. En un primer acercamiento a la estructura de los CIAE, se deduce la posibilidad de que este sensor tenga una estructura con al menos tres cargas negativas para interactuar con las cargas positivas del gadolinio (figura 5), sin embargo, falta mucho por indagar acerca de su estructura.^{38,39}

Con nuestros resultados vemos que, el análisis de la RVC en condiciones control, manifiesta la autorregulación del tono vascular ya que aún cuando se incrementan los niveles del estrés hemodinámico, las arterias coronarias mantienen un mismo nivel de resistencia (figura 9). La reproducibilidad experimental de este hecho (figuras 12 B, 13 B, 14 B y 15 B) nos ha permitido explorar la participación de los CIAE en el incremento de Ca^{2+}_i , el cual se manifiesta como liberación de ON.^{28,42} En ese sentido, es muy importante considerar de entre las diferentes vías, la posibilidad de que los reservorios intracelulares de Ca^{2+} (retículo endoplásmico) participen en el aumento de su concentración dentro de la célula.¹³

La aplicación del Gd^{3+} provoca un efecto constrictor a velocidades de perfusión bajas. Este efecto se revierte con tendencia a los valores basales al aumentar la velocidad de perfusión (figura 9), debido posiblemente a que la disminución del ON por el bloqueo de los CIAE, dispare la liberación de otros factores vasodilatadores,⁵ como un mecanismo de adaptación del endotelio a condiciones adversas como la disminución del Ca^{2+} .²⁸

El aumento en la liberación del ON en condiciones control y su disminución con la aplicación del Gd^{3+} (figura 10), es una evidencia de que esta liberación del ON es dependiente del flujo y de los CIAE, pero también se observa en estos resultados, que aun con la presencia del Gd^{3+} sigue habiendo una respuesta celular al flujo, debido posiblemente a que, como hemos mencionado, con la deficiencia del ON se active la liberación de otros factores relajantes.⁵

Ya hemos visto que además de los CIAE, se han propuesto otras vías para la entrada del Ca^{2+} a la célula endotelial,^{6,13,18,28,32,33,35,45} por lo que también realizamos pruebas sobre algunas de estas vías, para diferenciar la participación de cada una de ellas en la liberación del ON y para descartar que el Gd^{3+} pudiera alterar otras rutas. Para apoyar nuestros resultados, utilizamos la AcCh como un promotor de la síntesis del ON y poder comparar sus efectos con los efectos causados por la presencia del

Gd³⁺. La activación de la célula endotelial para la liberación del ON, vía receptores muscarínicos, no se afecta por la presencia del lantánido, lo cual comprueba que se trata de vías diferentes para activar esa liberación del ON (figura 11) Con estas observaciones se puede decir, que el modelo de corazón aislado responde a los efectos característicos para cada fármaco.

Otra estrategia para estudiar el mecanismo de liberación del ON es la inhibición de la ONS con L-NAME^{20,32,41} En estos experimentos, el incremento de la PP y el efecto de constricción sostenido en la RVC a flujos bajos, por efecto de inhibición de la ONS (figura 12), nos sugieren que el L-NAME pudiera ser más efectivo a bajas velocidades de perfusión por la disminución del estrés mecánico, lo cual es consistente con los resultados obtenidos para la liberación del ON que aunque ésta disminuye parcialmente, no se afecta por la presencia del L-NAME y el efecto constrictor se revierte entre 10 y 12 ml/min, que es el flujo normal en los cobayos del peso que utilizamos. Estos resultados también apoyan la idea de que la liberación de ON es dependiente del estrés mecánico y que hay otros factores que participan en la regulación del tono vascular,^{6,8} como lo muestran los resultados obtenidos con el bloqueo de receptores de ADO.⁴³ Se sabe que este autacoide tiene un efecto similar al de sustancias como la acetilcolina (AcCh) y la bradicinina incrementando el flujo sanguíneo y estimulando la producción de ON⁴⁴ y que junto con este gas participa de

manera importante disminuyendo la resistencia de los vasos para incrementar el flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno a los tejidos.

En los resultados obtenidos en nuestros experimentos se muestra que hay un efecto mayor sobre la PP y sobre la RVC cuando se aplica el L-NAME y el SPT de manera simultánea, a la acción que provoca cada fármaco aplicado en forma independiente. Con estas observaciones podemos decir que la ADO y el ON participan de manera conjunta en la regulación de la RVC (figura 13).

Hemos mencionado, que el Gd^{3+} es un bloqueador de los CIAE, pero que a concentraciones altas también bloquea los CCDV,³⁸ por lo que decidimos explorar si en el corazón hay respuesta endotelial ante algunos antagonistas de calcio específicos para canales de Ca^{2+} tipo T y tipo L. Los resultados de la disminución en la liberación del ON ante estos agentes sugieren la posibilidad de que estos canales existan en la célula endotelial y que su activación sea dependiente del estrés hemodinámico. No se descarta que los antagonistas actúen a nivel de células de músculo liso,³⁶ por lo que para eliminar esa posibilidad, trabajos futuros pudieran ser enfocados a explorar los CCDV en cultivos de células endoteliales con estudios más específicos sobre corrientes de calcio.

Otro aspecto a estudiar fue analizar la participación de la ONSc y la ONSi en la liberación del ON dependiente del estrés generado por el flujo. Su principal diferencia

es, que la primera es dependiente de Ca^{2+} mientras que la segunda no lo es,^{8,22,25,26} con lo cual pudimos explorar si estas isoformas son dependientes del flujo coronario y de los CIAE.

Un aspecto muy importante en el mecanismo por el cual se estimula la liberación del ON en el corazón es precisamente el estudio de la participación de la ONSc y la ONSi, para lo cual una de las herramientas experimentales es el uso de animales con tratamiento de LPS bacterial para inducir la activación de la ONSi. Esto nos permitió establecer una participación diferencial de estas dos isoformas de la ONS en los corazones de cobayo. En base a los resultados obtenidos de los animales tratados con el LPS, podemos afirmar que la disminución en la liberación del ON por bloqueo de los CIAE corresponde a un bloqueo de la ONSc ya que ésta es dependiente de calcio. La liberación del ON que no es afectada por el gadolinio se atribuye a la acción ONSi, es decir que en la curva control de la figura 16, la liberación del ON se debe a la acción conjunta de la ONSc y la ONSi. También podemos decir que solo la ONSc es dependiente de los CIAE, aunque las dos isoformas de la ONS son dependientes del estrés hemodinámico del flujo (figura 16)

Como hemos visto, existen diferentes vías para incrementar el Ca^{2+}_i , que pudieran estar relacionadas a los estímulos mecánicos del flujo, sugiriéndonos también

la posibilidad de que existan en el endotelio no solo diferentes tipos de canales y receptores sino también diferentes tipos de sensores al estrés hemodinámico, tomando en cuenta que el calibre, la longitud y la función de los vasos es muy diversa, además de que la forma de la célula endotelial depende de las condiciones hemodinámicas^{13,18,23}

En general se conoce poco no solo en lo que se refiere a los mecanismos de síntesis del ON, sino también del resto de sustancias vasoactivas liberadas en el endotelio. Tampoco se conoce mucho sobre la estructura de los CIAE y del tipo de sensores a estrés mecánico que pudieran tener este tipo de canales.² Por lo anterior, es importante abordar y realizar estudios más detallados sobre el endotelio y su función, así como estudios sobre la transformación del estímulo mecánico a estímulos químicos y sobre las estrategias estructurales que adquiere el endotelio para controlar las presiones del microambiente y mantener la homeostasis vascular.³

Importancia y perspectivas

Evidencias clínicas y experimentales han demostrado que la disfunción endotelial es un factor determinante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renovasculares, por lo que numerosas investigaciones estudian al

la posibilidad de que existan en el endotelio no solo diferentes tipos de canales y receptores sino también diferentes tipos de sensores al estrés hemodinámico, tomando en cuenta que el calibre, la longitud y la función de los vasos es muy diversa, además de que la forma de la célula endotelial depende de las condiciones hemodinámicas^{13,18,23}

En general se conoce poco no solo en lo que se refiere a los mecanismos de síntesis del ON, sino también del resto de sustancias vasoactivas liberadas en el endotelio. Tampoco se conoce mucho sobre la estructura de los CIAE y del tipo de sensores a estrés mecánico que pudieran tener este tipo de canales.² Por lo anterior, es importante abordar y realizar estudios más detallados sobre el endotelio y su función, así como estudios sobre la transformación del estímulo mecánico a estímulos químicos y sobre las estrategias estructurales que adquiere el endotelio para controlar las presiones del microambiente y mantener la homeostasis vascular.³

Importancia y perspectivas

Evidencias clínicas y experimentales han demostrado que la disfunción endotelial es un factor determinante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y renovasculares, por lo que numerosas investigaciones estudian al

ON como un factor importante en situaciones patológicas como la hipertensión arterial y la hipertensión pulmonar primaria, entre otras afecciones ⁴. El ON, otras sustancias vasoactivas y toda la red de comunicaciones de la célula endotelial con otras células a las que van dirigidos los diversos mensajes, definen al endotelio como la estructura de comunicación más importante entre la sangre y las células del MLV.^{7,14,15} En ese sentido, se puede mencionar que las características de adaptación adquiridas por la célula endotelial son, en mucho, diferentes al resto de las células de los mamíferos, principalmente porque están expuestas a las presiones del ambiente hemodinámico.

Uno de los principales problemas que se presentan en el estudio de las funciones del endotelio vascular, es definir los elementos estructurales de la célula que están involucrados en las repuestas hemodinámicas y cómo es que se da la transformación de los estímulos mecánicos a los mensajes químicos ^{13,18} A este respecto, una de las aportaciones de nuestro trabajo, es la evidencia de que la activación de los CIAE presentes en el endotelio vascular coronario, depende de las fuerzas hemodinámicas del flujo y que participan de manera importante en la regulación del Ca^{2+}_i y en la activación de la ONSc ^{28,32} Futuros trabajos pueden enfocarse a definir la estructura de los CIAE y del o los posibles sensores relacionados con estos canales y que pudieran estar involucrados con las fuerzas físicas del flujo.

En cuanto a la síntesis del ON, un aspecto importante al que se deberá poner especial atención es a los métodos de cuantificación de la liberación de este gas, ya que para realizarla se utilizan herramientas alternativas y no una cuantificación directa.^{9,28,42} Para completar esas observaciones, es necesario analizar la expresión de las diferentes isoformas de la ONS en pruebas de Western blot,²³ con relación al estrés hemodinámico, tanto en los animales tratados con LPS como en los animales no tratados.

El conocimiento de los mecanismos de la liberación de sustancias vasoactivas en el endotelio y su participación en la homeostasis vascular permitirá implementar estrategias farmacológicas para contrarrestar los efectos nocivos del ON producidos por la alteración de sus niveles basales, sobre todo en países como México, que cuentan con un alto porcentaje de enfermedades vasculares

Hablar de la importancia y perspectivas de trabajos de investigación como el que hemos presentado resulta complejo, sobre todo cuando se abordan aspectos sociales como la apremiante necesidad de dar solución a problemas reales; en el caso de la salud pública, por ejemplo, cómo contrarrestar el incremento de los diversos padecimientos que afectan a la población, si en países como México no hay una integración sólida de los estudios clínicos con la investigación básica, ni la infraestructura, ni los apoyos

económicos acordes a los verdaderos problemas, situación que, como se sabe, no solo se limita a la salud pública si no a la investigación científica en general.

Conclusiones

Por los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir lo siguiente:

- El flujo coronario es parte importante del mecanismo por el cual se libera ON en el corazón, por lo que está involucrado en la regulación del tono vascular
- Los CIAE son regulados por el flujo coronario y participan como mediadores en la liberación de ON
- La ONSc es dependiente del flujo y está regulada por los CIAE.
- La ONSi también es estimulada por el flujo pero no está regulada por los CIAE

económicos acordes a los verdaderos problemas, situación que, como se sabe, no solo se limita a la salud pública si no a la investigación científica en general.

Conclusiones

Por los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir lo siguiente:

- El flujo coronario es parte importante del mecanismo por el cual se libera ON en el corazón, por lo que está involucrado en la regulación del tono vascular
- Los CIAE son regulados por el flujo coronario y participan como mediadores en la liberación de ON
- La ONSc es dependiente del flujo y está regulada por los CIAE.
- La ONSi también es estimulada por el flujo pero no está regulada por los CIAE

REFERENCIAS

- 1.- McIntyre, M., Bohr, D., Dominiczak, A: **Endothelial Function in Hypertension. The Role of Superoxide Anion.** *Hypertension*, 1999; 34:539-545
- 2.- Chien, S Li, S. Shyy, J: **Effects of Mechanical Forces on Signal Transduction and Gene Expression in Endothelial Cells.** *Hypertension*, 1998; 31(part 2):162-169
- 3.- Britten, M.B., Zeiher, A. M., Schächinger, V **Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options.** *J Int Med Res.* 1999; 245:315-327
- 4.- Köhler, R., Distler, A., Hoyer, J: **Increased mechanosensitive currents in aortic endothelial cells from genetically hypertensive rats** *J Hypertens.* 1999; 17:365-371
- 5.- Wang, Q.D., Gonon, A, Shimizu, P., Sjöquist, O., Pernow, J: **Contribution of endothelin to the coronary vasoconstriction in the isolated rat heart induced by nitric oxide synthase inhibition.** *Acta Physiol Scand* 1988; 163:325-330
- 6.- Barakat, I.A., Leaver, V E, Pappone, A.P., Davies, F P: **A Flow-Activated Chloride-Selective Membrane Current in Vascular Endothelial Cells.** *Circ Res.* 1999; 85:820-828
- 7.- Davies, F P and Tripathi, C. Satish: **Mechanical Stress Mechanisms and the Cell.** *Circ Res* 1993; 72:239-245.

- 8.- Aberle, S., Young, A T , Medberry, P , Parkinson, J., Rubanyi, M.G., Kauser, K: **Quantitative Measurement for Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase in Cultured Human Endothelial Cells** *NITRIC OXIDE* 1997; 1 (3);226-233
- 9.- Kim, N.N , villegas, S., Summerour, R.S., Villarreal, JF: **Regulation of Cardiac Fibroblast extracelular Matrix Production by Bradykinin and Nitric Oxide.** *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31, 457-466.
- 10.- Lüscher, T., Barton, M **Biology of the Endothelium.** *Clin. Cardiol.* 1997, 20 (suppl II), II-3—II-10
- 11.- Panza, J A: **Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension** *Clin Cardiol.* 1997, Vol 20 (suppl.II), II-26—II-33
- 12.- Hoyer, J., Köhler, R., Distler, A **Mechanosensitive Cation Channels in Aortic Endothelium of Normotensive and Hypertensive Rats.** *Hypertension* 1997; 30(part 1)112-119
- 13.- Davies, F. P and Barbee, K. A: **Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction.** *Annu. Rev. Physiol.* 1997; 59:527-49.
- 14.-Ingber, D E; **Tensegrity: The architectural basis of cellular machanotransduction.** *Annu. Rev. Physiol.* 1997; 59:575-99
- 15.- Lehoux, S , Tedgui, A **Signal Transduction of Mechanical Stresses in the Vascular Wall.** *Hypertension* 1998; 32,338-345

- 16.- McDonald, J.L., Murad F; **Nitric Oxide and Cyclic GMP Signaling.** *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996; 211; Vol.1; 1-15
- 17.- Ikeda, U., Shimada, K: **Nitric Oxide and Cardiac Failure.** *Clin. Cardiol* 1997; 20,837-841
- 18.- Davies F , P: **Flow-mediated Endothelial Mechanotransduction.** *Physi. Reviews.* 1995; 75(3):519-560
- 19.- Kröncke, K-D., Fehsel, K , Kolb-Bachofen, U: **Nitric Oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection. How, Why, When, and Where?.** *NITRIC OXIDE.* 1977, 1 (2); 107-120
- 20.- Mizutani, T , Layon, J: **Clinical Applications of Nitric Oxide.** *CHEST.* 1996; 110:506-524
- 21.- Colowick S: **Methods in Enzymology; Nitric Oxide and Derivatives of O₂.** 6a ed Toronto, Canada. *Ed. Academic Press.* 1988; 110:89-115 pp.
- 22.- Cernadas, R M, et al.: **Expresión of Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases in the Vascular Wall of Young and Aging Rats.** *Circ Res* 1998; 83:279-286
- 23.- Gloe, T , Riedmayr, S., Sohn, H-Y., Pohl, U: **The 67-kDa Laminin-binding Protein Is Involved in Shear Stress-dependent Endothelial Nitric-oxide Synthase Expression.** *J Biol Chem.* 1999, 274, 23; 15996-16002.

- 24.- Spedding, M. Schini, V. Schoeffter, P. Miller, R: **Calcium Channel Activation Does Not Increase Release of Endothelial – Derived Relaxant Factors (EDRF) in Rat Aorta Although Tonic Release of EDRF May Modulate Calcium Channel Activity in Smooth Muscle.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8:1130 – 1137
- 25.- Holzmann, A., Manktelow, C, Taut, F.J.H., Bloch, K., Zapol, W. **Inhibition of Nitric Oxide Synthase Prevents Hyporesponsiveness to inhaled Nitric Oxide in Lungs from Endotoxin-challenged Rats.** *Anesthesiology*. 1999; 91:215-21
- 26.- Cooke, J., Dzau, V **Nitric Oxide Synthase: Role in the Genesis of Vascular Disease.** *Annu.Rev.Med.* 1997; 48:489-509.
- 27.- Traverse, H.J, Wang, L Y., Du, R., Nelson, D., Lindstrom, P., Archer, L S., Gong, G., Bache, J.R: **Coronary Nitric Oxide Production in Response to Exercise and Endothelium-Dependent Agonists.** *Circulation*. 2000; 101:2526-2531
- 28.- Suárez, J., Torres, C., Sánchez, L, del Valle, L, Pastelín, G: **Flow Stimulates Nitric Oxide Release in Guinea Pig Heart: Role of Stretch-Activated Ion Channels.** *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 261, 6-9
- 29.- Hutcheson, R. I., Griffith, M.T: **Mechanotransduction through the endothelial cytoskeleton: mediation of flow - but not agonist-induced EDRF release.** *Br J Pharmacol* 1996; 118:720-726.
- 30.- Silacci, P., Formentin, K., Bouzourene, F., Daniel, F., Brunner, R.H., Hayoz,D **Unidirectional and Oscillatory Shear Stress Differentially Modulate NOS III Gene Expression.** *NITRIC OXIDE*. 1999; 4(1), 47-56

- 31.- Suarez, J., Rubio, R: **Regulation of glycolytic Flux by coronary flow in guinea pig heart. Role of vascular endothelial cell glycocalyx.** *Am. J Physiol.* 1991; 261:H1994-H2000
- 32.- Torres, J.C., Pastelín, G, Suárez, J: **Influencia del flujo coronario sobre la conducción aurículoventricular y la contracción ventricular en corazón aislado de cobayo.** *ARCH INST CARDIOL MEX* 1999; 69; 404-410
- 33.- Hempel, A., Lindschau, C., Maasch, Ch., Mahn, M., Bychkov, R., Noll, T., Luft, F.C., Haller, H: **Calcium Antagonists Ameliorate Ischemia-Induced Endothelial Cell Permeability by Inhibiting Protein Kinase C.** *Circulation.* 1999; 99:2523-2529
- 34.- Vinet, R., Vargas, F: **L- and T-type voltage-gated Ca²⁺ currents in adrenal medulla endothelial cells.** *Am. J. Physiol.* 1999; 276; H1313-H1322.
- 35.- Caldwell, A.R., Clemo, F.H., Baumgarten, M.C. **Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations.** *Am.J.Physiol.* 1998; 275:C619-C621
- 36.-Ohya, Y. Adachi, N. Nakamura, Y et al: **Stretch-Activated Channels in Arterial Smooth Muscle of Genetic Hypertensive Rats.** *Hypertension* 1998; 31 (part 2): 254-258
- 37.- Yamazaki, T Komuro, I et al: **Role of Ion Channels and Exchangers in Mechanical Stretch-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy.** *Circ. Res.* 1998; 82 430-437

38.- Yang, X.Ch., Sachs, F: **Block of Stretch-activated Ion Channels in Xenopus Oocytes by Gadolinium and Calcium Ions.** *Science* 1989; 243:1068-1070.

39.-Naruse, K., Sai, X., Yokoyama, N., Sokabe, M: **Uni-axial cyclic stretch induces c-src activation and translocation in human endothelial cells via SA channel activation.** *FEBS Lett* 1998; 441:111-115.

40.-Döring, H J. Dehnert, H.; **The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff.** Döring C. Ed.; Ed. Biomesstechnik-Verlag March GmbH, D-7806 March, West Germany. 1988.

41.-Conner, M.E , Aiko, S., Fernandez, M , Battarbee, D.H., Gray, L., Grisham, B: **Duration of the Hemodynamic Effects of NG-Nitro-L-arginine Methyl Ester in Vivo.** *NITRIC OXIDE.* 2000; 4 (2):85-93

42.-Kelm, M., Schrader, J: **Nitric oxide release from the isolated guinea pig heart.** *Eur J Pharmacol.* 1988; 155:317-321.

43.-Suarez, J., Torres, J.C.: **Modulatory Role of Endothelium-Derived Relaxing Factors on the Flow-Regulated Coronary Vascular Resistance.** *Proc. West. Pharmacol Soc.* 1998; 41: 15-16

44.- Han, CH., Ming, Z , Lautt, W: **Shear stress-induced nitric oxide antagonizes adenosine effects on intestinal metabolism.** *Am. J. Physiol* 1999; 276:G1227-G1234.