

166
221



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA DEL FLUJO CORONARIO SOBRE LA CONDUCCION A-V Y LA CONTRACCION VENTRICULAR EN CORAZON AISLADO DE COBAYO. Papel de los canales iónicos activados por estiramiento y del óxido nítrico.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :

JUAN CARLOS TORRES NARVAEZ



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1998

25 8780



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

INFLUENCIA DEL FLUJO CORONARIO SOBRE LA CONDUCCION A-V Y LA CONTRACCION VENTRICULAR EN CORAZON AISLADO DE COBAYO. Papel de los canales iónicos activados por estiramiento y del óxido nítrico.

realizado por JUAN CARLOS TORRES NARVAEZ

con número de cuenta 7915854-7 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. en Ciencias PABLO JORGE SUAREZ MUNGUIA

Propietario Dra. en ciencias MARGARITA VICTORIA GARCIA GARDUÑO

Propietario Maestro en Ciencias MARIO SEGURA ALMARAZ

Suplente Médico Cirujano JULIETA ANABELL DIAZ JUAREZ

Suplente Biólogo JAVIER RAMOS CARVAJAL, *Javier Ramos Carvajal*

U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Agradezco la colaboración a:
Dra. Margarita García Garduño
Médico C. Julieta Anabell Díaz Juárez
Biol. Mario Segura Almaráz
Biol. Javier Ramos Carvajal

Al Instituto Nacional de Cardiología "IGNACIO CHAVEZ"

Al personal del departamento de Farmacología del mismo
Instituto.

Al jefe del departamento
Dr. Gustavo Pastelín Hernández

Agradecimiento especial al Director y maestro de éste trabajo

Dr. PABLO JORGE SUAREZ MUNGUIA

Del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
y de la Escuela Superior de Medicina (IPN)

Dedico éste trabajo a mis padres:

**Isabel Narváez de Torres
Carlos Torres Muñoz**

A mis hermanos y sobrinos.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
1.-Sustancias liberadas por el endotelio vascular.....	6
1.1 .-Óxido Nítrico.....	6
1.2 .-Prostaglandinas.....	6
1.3 .-Radicales libres.....	7
1.4 .-Factores de crecimiento.....	8
1.5 .-Factor de hiperpolarización.....	9
1.6 .-Factor de activación plaquetaria.....	9
1.7 .-Comunicación Humoral.....	10
Lámina 1.....	12
Lámina 2.....	14
2.-Factor de Relajación Derivado del Endotelio.....	15
2.1.-Mecanismos de acción propuestos para la síntesis de óxido nítrico.....	15
2.2.-Óxido Nítrico.....	20
2.3.-Óxido Nítrico Sintetasa.....	22
2.4.-Algunos inhibidores de la síntesis de Óxido Nítrico.....	26

3.-Canales iónicos activados por estiramiento.....	27
4.-Planteamiento del problema.....	30
5.-Objetivos.....	31
6.-Hipótesis.....	32
7.-Metodología.....	33
8.-Cirugía	37
Lámina 3.....	39
Lámina 4.....	40
Lámina 5.....	41
Lámina 6.....	42
9.-Experimentos.....	43
Lámina 7.....	46
Lámina 8.....	47
11.-Resultados.....	48
12.-Discusión de resultados.....	62
13.-Conclusión.....	64
14.-Bibliografía.....	65

ABREVIATURAS

ACh	:	Acetilcolina
CAE	:	Canal que se activa por estiramiento
CSR	:	Células sanguíneas rojas
EDRF	:	Factor de Relajación Derivado del Endotelio
ET	:	Endotelina
ETA	:	Endotelina A (receptor)
ETB	:	Endotelina B (receptor)
FAP	:	Factor de activación plaquetaria
FHDE	:	Factor de hiperpolarización derivado del endotelio
GMPC	:	Guanidín Monofosfato cíclico
Hb	:	Hemoglobina
IAU	:	Intervalo Auriculo Ventricular
L-NAME	:	N-nitro-arginin-metilester
L-NA	:	N-nitro-L-arginina
L-NMMA	:	N-monometil L-arginina
ms	:	milisegundos
NADPH	:	Nicotin Adenin Difosfato
ON	:	Óxido Nítrico
ONS	:	Óxido Nítrico Sintetasa
ONSc	:	Óxido Nítrico Sintetasa constitutiva
ONSi	:	Óxido Nítrico Sintetasa inducida
PDGF	:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGL₂	:	Prostaciclina
PIM	:	Proteína integral de membrana
PPS	:	Pulsos por segundo
SOD	:	Superóxido dismutasa
TGFβ	:	β-Factor de crecimiento
TP	:	T Pareada.

RESUMEN

Ya se ha demostrado que el flujo coronario, por medio de sus fuerzas hemodinámicas, estrés por fricción y deformación por presión, es capaz de estimular la fuerza de contracción ventricular y la conducción auriculo ventricular, sin embargo el mecanismo por el cual el flujo ejerce éstos efectos se desconoce. En éste trabajo exploramos la participación de los canales activados por estiramiento y del óxido nítrico como responsable de éstas acciones. Se utilizaron corazones de cobayo aislados y perfundidos con solución Krebs. Se midió la contracción como desarrollo de presión por el ventrículo izquierdo y la conducción auriculo ventricular con un osciloscopio. La participación de los canales activados por estiramiento se exploró inhibiendolos con cloruro de gadolinio, la síntesis de óxido nítrico se inhibió específicamente. Al inhibir los canales activados por estiramiento, no se observó efecto del flujo sobre la contracción ventricular y tampoco se observa la conducción auriculo ventricular. Con verapamil no se obtienen efectos similares, por lo que los canales de calcio no intervienen en la inhibición de los efectos. El inhibidor de la síntesis de óxido nítrico no tiene ningún efecto sobre la estimulación del flujo sobre los parámetros estudiados. Nuestra conclusión es que el efecto estimulador del flujo coronario en éstos parámetros, es que están mediados por los canales activados por estiramiento.

INTRODUCCIÓN

Desde la segunda mitad del siglo XX, algunas enfermedades y afecciones cardíacas han sido tratadas con nitrovasodilatadores, estos compuestos se han utilizado para controlar la angina de pecho, la hipertensión pulmonar, el vasoespasma, la diabetes etc., estas afecciones están relacionadas con el funcionamiento de la circulación sanguínea. En el caso del corazón, el estudio de la circulación coronaria ha sido de gran importancia, pues esta, perfunde al órgano que genera la presión de perfusión de toda la circulación (2). Por lo tanto, el estudio del flujo coronario ha llamado la atención de muchos investigadores en los últimos tiempos (1).

El flujo coronario en sí, es el mecanismo a través del cuál el endotelio libera factores constrictores o dilatadores, así como factores de crecimiento celular, de inhibición plaquetaria, etc., los que regulan el tono de su músculo liso, y en casos especiales, tales factores funcionan como mediadores en la transmisión de impulsos provocados por algún tipo de estrés.

De las sustancias liberadas por el endotelio vascular, el óxido nítrico tiene gran importancia por su participación como vasodilatador universal. Se ha encontrado que la producción de óxido nítrico (ON) es estimulada por cambios en el flujo, es similar a la participación de

agonistas como bradiquinina, histamina y trombina, pero además se sugiere que los cambios en el flujo generan activación de proteínas G las que a su vez, inducen la producción de óxido nítrico ⁽³¹⁾. Así también, con el estudio de nitrovasodilatadores y vasoconstrictores, agonistas y antagonistas de L-arginina como precursor de la síntesis de ON, se ha comprobado que la disminución en la producción de ON es un factor que causa hipertensión, arteriosclerosis y vasoespasmos, entre otras afecciones ^(5, 8, 14).

La musculatura lisa vascular tiene la capacidad de distensión y rápida recuperación de la longitud inicial. Este fenómeno se conoce como "autorregulación miogénica" y se puede demostrar con el método Langendorff para corazón aislado con incrementos rápidos y disminución repentina de la presión de perfusión ⁽¹⁸⁾.

Pero esto implica que el diámetro de las arterias coronarias se incremente y disminuya dependiendo de la presión de flujo, con lo que se provocan estímulos mecánicos y químicos en los receptores de las células endoteliales. Estos estímulos inicialmente se estudiaron en tejidos cardíacos aislados, cuyos resultados mostraron que el estiramiento del miocardio modula las propiedades electrofisiológicas del corazón mediante cambios en el potencial de membrana.

Por tal motivo es que el estudio de los nitrovasodilatadores y en particular del ON, así como el análisis de la participación de los canales

iónicos activados por estiramiento son de gran interés fisiológico y farmacológico en las dos últimas décadas, en las cuáles, se han realizado trabajos cuya finalidad es encontrar una relación farmacológica directa para controlar los efectos producidos por la disminución o incremento en los niveles de ON en el cuerpo humano, y como se verá más adelante, la posible utilidad farmacológica del gadolinio en el control de arritmias cardíacas.

Así, se tienen algunas alternativas de estudio que nos permitan relacionar los aspectos químicos y mecánicos que son parte del mecanismo de acción para la síntesis de ON en la vasculatura coronaria; de tal forma, conocemos parte de éste mecanismo, y como se verá más adelante, el estímulo es generado por el flujo coronario sobre las células endoteliales en donde sabemos que el ON participa como un segundo mensajero hasta la relajación del músculo liso vascular y la inhibición de la agregación plaquetaria. Sin embargo, el mecanismo de transducción para la relajación aún se desconoce.

ANTECEDENTES

En 1958 Gregg descubre que al incrementar la perfusión coronaria hay mayor consumo de oxígeno en el miocardio y que la contracción cardíaca es modulada por la velocidad de la perfusión coronaria. Este hallazgo se conoce como fenómeno de Gregg (2).

Se han realizado muchos estudios para tratar de explicar el fenómeno de Gregg, por ejemplo Lochner y cols. (2) demostraron que el volumen de sangre intramiocárdico se incrementa por vasodilatación coronaria y aumento de flujo o aumento en la presión de perfusión coronaria, proponiendo así, que el fenómeno de Gregg se debe a una distensión de los vasos coronarios dependiente del flujo. Otros investigadores (1) han confirmado el papel del flujo mediante la infusión de agentes constrictores o dilatadores y bajo diferentes niveles de resistencia vascular con variaciones de flujo, confirmando las observaciones de Gregg .

Arnold y cols.(2) demostraron en corazón perfundido de cobayo con solución Krebs-Henseleit, que la contractilidad y el consumo de oxígeno puede incrementarse aumentando la viscosidad del perfusado manteniendo el flujo de perfusión constante.

Fisher (2), realizó experimentos en músculo papilar de cobayo con variaciones en el flujo, tanto en isquemia (interrumpiendo el flujo) como en hipoxia (mediante un perfusado carente de oxígeno), encontrando que la falta de flujo es más determinante que la hipoxia, esto sugiere que el flujo juega por si mismo un papel importante en la fisiología cardíaca.

Otros autores, (1) sugieren que el incremento del flujo coronario

produce un efecto inotrópico positivo debido a que aumenta la longitud del músculo (efecto Starling), además de que el calcio libre intracelular es un determinante en la elevación contráctil.

Los estudios para explicar el fenómeno de Greeg han puesto de manifiesto que el flujo coronario modula la contracción y el consumo de oxígeno en el corazón. Esta modulación es independiente del papel que ejerce el flujo como acarreador de sustratos. Se ha propuesto que el flujo y sus componentes hidrodinámicos asociados: estrés por fricción y deformación por presión, los cuales actúan en la pared endotelial de los vasos sanguíneos, activan o estimulan señales en sus células que causan la liberación de sustancias vasoactivas, así como la activación de canales iónicos, que provocan una respuesta celular al flujo ⁽³⁾.

SUSTANCIAS LIBERADAS POR EL ENDOTELIO VASCULAR

Ya que el propósito de éste trabajo es el estudio del mecanismo de acción del flujo coronario sobre la conducción en el intervalo aurículoventricular (IAV) y la contracción ventricular, se analizan algunas sustancias liberadas por el endotelio vascular.

El endotelio vascular es un tejido altamente especializado (Lámina 1) que participa secretando factores relajantes o constrictores en respuesta al estrés y a diferentes sustancias vasoactivas para mantener el tono vascular y modular la función del músculo liso (25,34), la respuesta inmune, el crecimiento de células vasculares, la regulación del nivel homeostático, inflamatorio, y de la liberación de agentes vasoactivos en la sangre (12).

Las células endoteliales sintetizan y secretan moléculas solubles que son acarreadas por difusión o por flujo convectivo (12); bajo condiciones basales o cuando el endotelio es activado por neurotransmisores, hormonas, autacoides, o estimulación física (10).

A continuación se enlistan y definen las principales sustancias liberadas por el endotelio:

ÓXIDO NÍTRICO.- Radical libre que es el principal factor de relajación derivado del endotelio vascular, además de poseer otras características que se mencionaran más adelante.

PROSTAGLANDINAS.- Son muy importantes en el metabolismo de las plaquetas, el endotelio, y músculo liso, pues estos tipos celulares

transforman ácido graso araquidónico en endoperoxidasas de prostaglandina de las que se han identificado metabolitos intermedios inestables en la vía metabólica del ácido araquidónico que conllevan a la formación de dos productos finales:

1.- TROMBOXANO A₂ (formado por plaquetas) : Estimula la contracción de músculo liso y agregación plaquetaria. Es un potente vasoconstrictor.

2.- PROSTACICLINA (PGI₂) : Principal producto de la actividad de la ciclooxigenasa en las paredes de arterias y venas. La prostaciclina es sintetizada por células endoteliales y musculares lisas a partir de ácido araquidónico y de las endoperoxidasas liberadas por las plaquetas. Es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria ⁽²³⁾.

Se cree que entre óxido nítrico y prostaglandinas exista un papel importante en la modulación de la función del miocardio. Por otra parte, además de la liberación de sustancias, en el endotelio hay activación de canales tales como los de Potasio y Calcio ^(10, 11, 12, 13).

RADICALES LIBRES

En respuesta al estrés y estimulación química, las células endoteliales generan también radicales libres derivados del oxígeno e hidrogenoperoxidasa. La Superóxido dismutasa (SOD), aumenta la relajación dependiente del endotelio y si endógenamente se inhibe, reduce la liberación de ON ⁽²⁵⁾.

FACTORES DE CRECIMIENTO

Contribuyen en la regulación en el crecimiento celular. El endotelio y el músculo liso producen factores promotores e inhibidores de crecimiento, que regulan además la composición de la matriz extracelular. Entre los factores de crecimiento más importantes se mencionan los siguientes:

(TGF- β) β -factor de crecimiento y heparinoides son secretados por el endotelio, inhiben el crecimiento del músculo liso vascular.

(PDGF) Factor de crecimiento derivado de plaquetas y (bFGF) Factor de crecimiento de fibroblastos b estimulan la proliferación de células de músculo liso y endoteliales.

CITOQUINAS:

Son mediadores en la inflamación pero además junto con los factores de crecimiento inducen transiciones celulares que alteran las propiedades de la superficie luminal de los vasos sanguíneos ⁽²⁵⁾.

ENDOTELINA (ET):

Las células endoteliales producen endotelina y elaboran además enzimas convertidoras de endotelina para procesar ésta prohormona en endotelina-1 (ET-1) que es uno de los vasoconstrictores más potentes que se conocen, el cual se puede estimular por hipoxia ⁽²⁵⁾.

ET-1 es también un factor de crecimiento para células del músculo liso y se ha aislado, purificado, clonado y secuenciado a partir de células endoteliales de aorta porcina ⁽²⁴⁾.

FACTOR DE HIPERPOLARIZACIÓN DERIVADO DEL ENDOTELIO (FHDE)

Causa relajación en el músculo liso, y en algunos vasos sanguíneos, la hiperpolarización es mediada por FHDE a diferencia de la hiperpolarización que causan ON y prostaciclina ya que ésta se dá en una mayor proporción.

La transferencia de la hiperpolarización en células de músculo liso vascular no ocurre por acoplamiento electrónico sino por numerosas uniones gap ("gap junction"), para comunicación intercelular, lo cuál es importante en la liberación de sustancias en el endotelio, por ejemplo:

Entre el endotelio y el músculo liso vascular los FHDE tienen una participación fundamental en la relajación vascular; como los cambios en las concentraciones iónicas del endotelio y células del músculo liso que participan en la regulación del vaso conjuntamente con el ON ⁽¹³⁾.

FACTOR DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA (FAP)

El FAP causa contracción de músculo liso vascular e induce desensibilización de beta-adrenoceptores mediando respuestas vasodilatadoras para la circulación y liberación neural de catecolaminas en ciertas zonas vasculares ⁽²⁵⁾.

La célula endotelial produce el FAP después de la activación de fosfolipasa A2, la síntesis de FAP es inhibida por la prostaciclina.

COMUNICACIÓN HUMORAL

Entre las células endoteliales y las plaquetas, la prostaciclina funciona para inhibir la agregación plaquetaria; entre las células endoteliales y las células de músculo liso, la función de la prostaciclina, el ON, y otros factores derivados del endotelio funcionan para la relajación vascular; entre las células endoteliales y los leucocitos hay quimioatrayentes de los leucocitos hacia la superficie de células endoteliales.

En el macrófago derivado de monocito; la comunicación humoral sirve para la modulación de la actividad aglutinante, la activación plaquetaria y la estimulación de prostaciclina.

La comunicación entre el endotelio y el miocito cardiaco no se ha estudiado ampliamente, sin embargo, existen reportes en donde el flujo coronario es capaz de estimular la glucólisis, la contracción y la conducción A-V en el corazón perfundido de cobayo (Suárez y Rubio, Rubio, Ceballos y Suárez). Estos hallazgos sugieren que el endotelio que es la estructura que primero se estimula por el flujo, puede interaccionar con el miocito cardíaco^(1, 11).

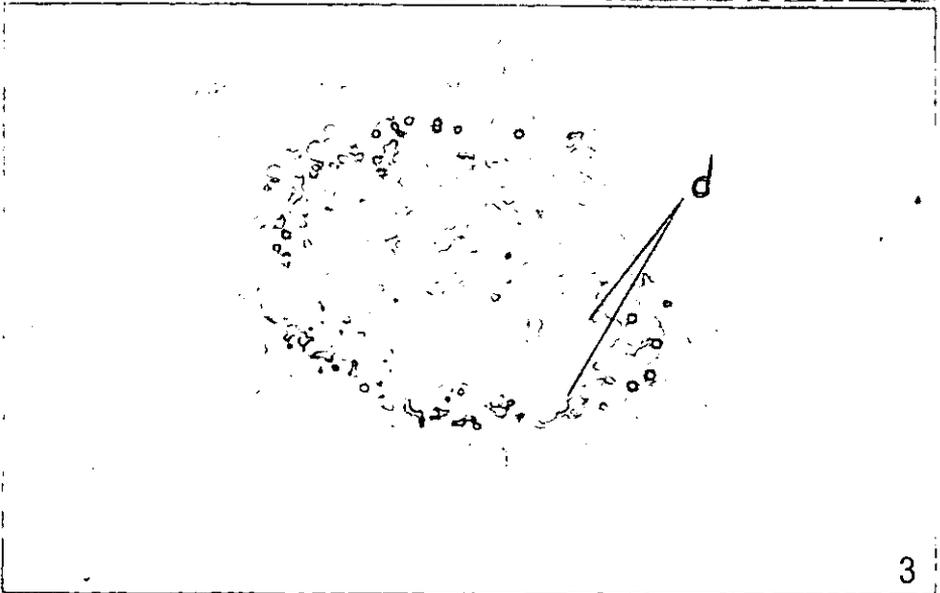
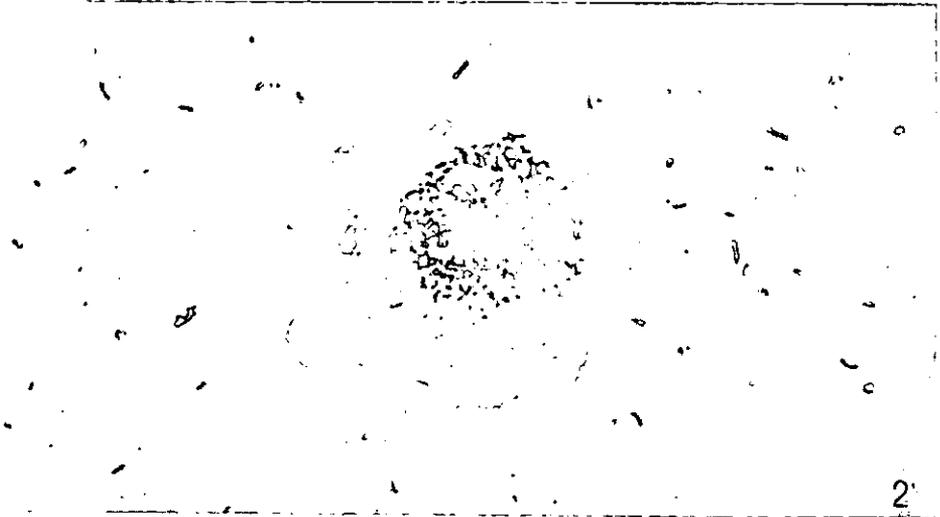
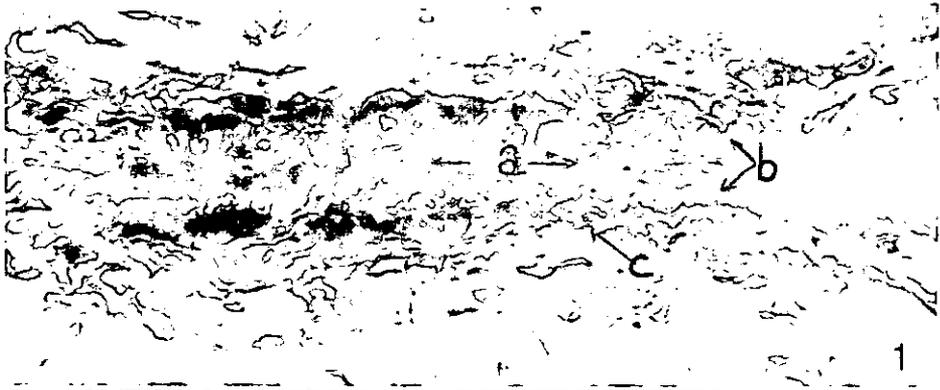
LAMINA 1

FOTOGRAFIA 1

Es el corte histológico de corazón de rata teñido con azul de metileno, en el que se muestra el corte longitudinal de un vaso. Se puede observar la luz interna del vaso (a), la capa de células endoteliales (b) y la capa muscular lisa (c). 480X

Las fotografías 2 y 3 muestran células endoteliales en contraste de fases con filtro azul en las que se puede ver la forma poligonal de la célula, el movimiento de membrana celular formando pseudópodos de tipo filopodios, además destacan en el sarcoplasma numerosas vesículas pinocíticas.

LAMINA 1

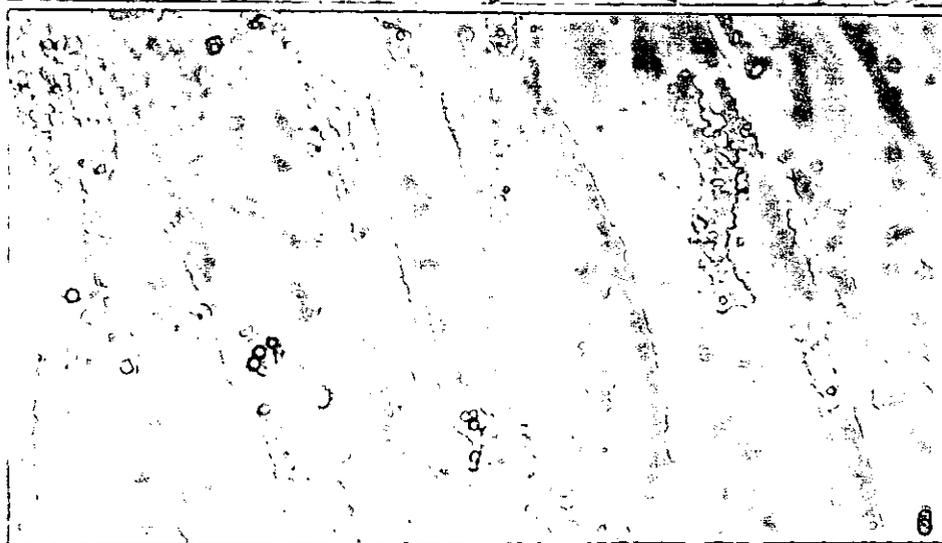


LAMINA 2

Fotografías 4, 5 y 6, muestran células musculares lisas cultivadas in vitro en contraste de fases con filtro verde, se puede observar desde una perspectiva panorámica del crecimiento celular (imagen superior), advirtiéndose el aspecto fusiforme de las células.

En las imágenes 5 y 6 se advierte con mejor detalle las células, destacando los núcleos ovalados con evidentes nucleolos y la subestructura celular, se distinguen los espacios intercelulares. 400, 700 y 1000X respectivamente.

LAMINA 2



MECANISMOS DE ACCIÓN PROPUESTOS PARA LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO

Como ya se mencionó, el consumo de oxígeno en el músculo cardíaco varía con los cambios de flujo, pero además el flujo coronario es determinante para la estimulación del endotelio y la liberación de diversas sustancias que participan en la función contráctil y la conducción (IAV). Así es que se han propuesto mecanismos de acción para la liberación de esas sustancias y sus efectos:

Furchgott y Zawadzji, encontraron que las células endoteliales liberan un poderoso vasodilatador que llamaron Factor de Relajación Derivado del Endotelio (EDRF) (7,9,15,32). En 1980 Furchgott reportó que las células endoteliales tienen un papel muy importante en la relajación vascular, y propone que los receptores muscarínicos son activados por acetil colina (ACh) iniciando la liberación del EDRF que relaja las células del músculo liso vascular, pero aunque ya se sabe que además de la ACh existe la participación de otros vasodilatadores, el EDRF es determinante en la regulación vascular⁽¹⁶⁾.

En 1987 Moncada⁽⁵⁾, sugiere que el EDRF es el óxido nítrico y que el precursor de su biosíntesis es L- Arginina (fig. A), aunque también se debe tomar en cuenta que puede haber otros mecanismos que tengan una participación en la relajación vascular, dependiente del endotelio, pero diferente al de la liberación de ON. Después de definir el factor de relajación y su precursor, Moncada y cols. estudiaron tejido cerebral de rata en busca de la enzima que participa en la vía L- Arginina - óxido nítrico, encontrando que ésta es la óxido nítrico sintetasa (ONS) y vieron que además de ON había formación de L-citrulina con alta dependencia de la concentración de Ca^{2++} . El mecanismo de reacción se muestra en la figura B. Estos autores encontraron que esos

procesos eran inhibidos por N-monometil-L-arginina (L-NMMA) un análogo no metabolizable de L-arginina y concluyeron que el sistema enzimático es similar al de células endoteliales, macrófagos y diversos tipos celulares, así que en principio, se puede decir que la vía L-Arginina-óxido nítrico es un mecanismo que se encuentra en todo el organismo mediado por la óxido nítrico sintetasa ⁽⁵⁾. Más tarde Mulisch y cols. demostraron que la liberación de ON por células endoteliales cultivadas activa la enzima guanilato ciclasa y produce la relajación por un aumento de GMPc que baja la concentración de Ca²⁺⁺ intracelular en el músculo liso (7, 9, 16, 27).

Por ello, el EDRF es considerado como el responsable de la relajación que inducen sustancias como ADN, Trombina, sustancia P, bradisinina, ionóforo A 23187; también hay otros agentes que inducen la relajación vascular de forma independiente al endotelio como agonistas adrenérgicos beta, prostaciclina y péptido natriurético auricular⁽⁵⁾.

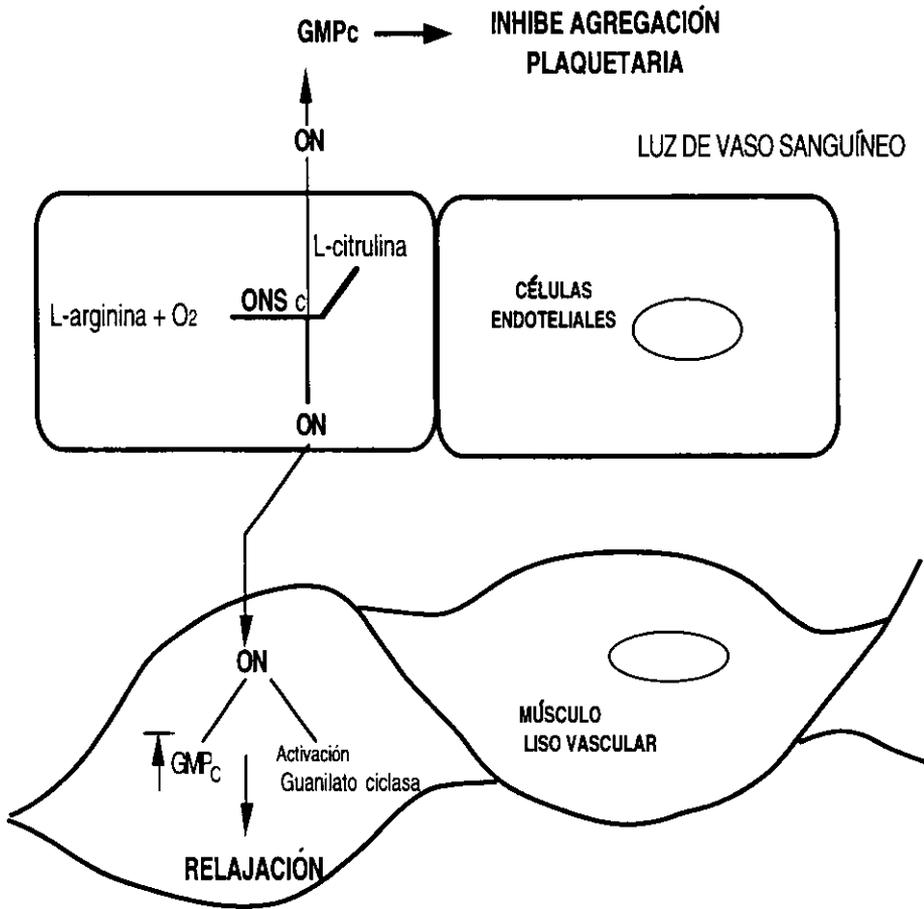


Figura (A). Representa una de las principales vías de formación de óxido nítrico a partir de su precursor L-arginina. En presencia de O₂ y mediante la activación de la óxido nítrico sintetasa constitutiva (ONSc), la L-arginina produce óxido nítrico y L-citrulina. El ON difunde desde las células endoteliales hasta las células de músculo liso y mediante la activación de la guanilato ciclasa se produce la relajación de músculo liso con un incremento en los niveles de guanidín monofosfato cíclico (GMP_c). El ON también participa en la inhibición de agregación plaquetaria, así que parte de él sale a la luz de los vasos sanguíneos.

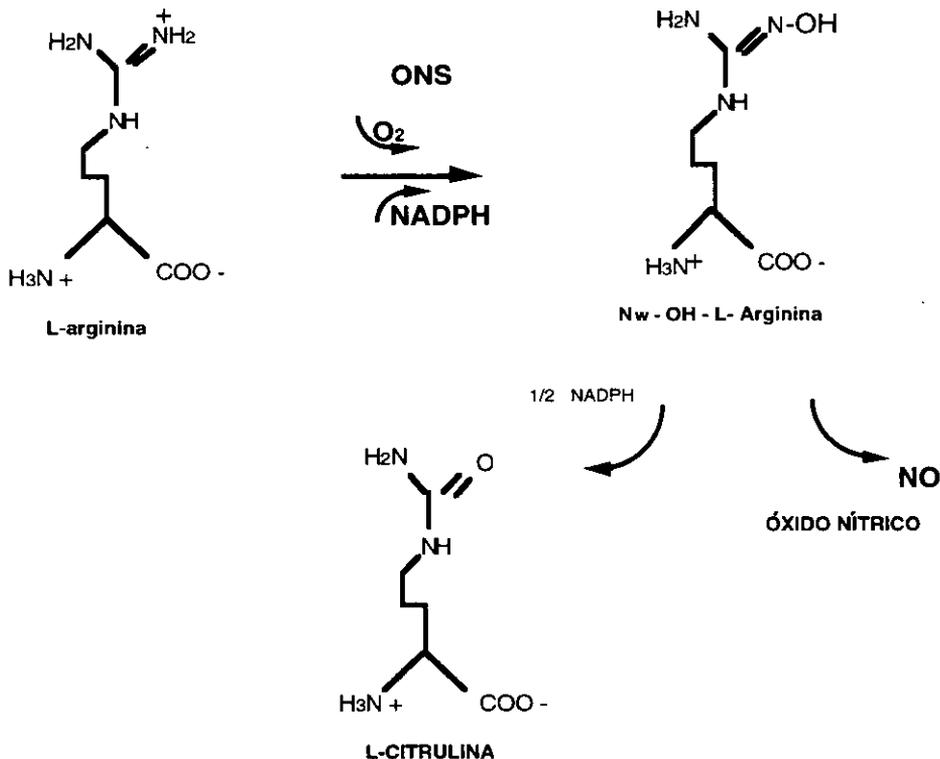


Figura (B). Representa una posible vía de la síntesis de óxido nítrico “in vivo”. La vía de síntesis inicia a partir del precursor L-arginina que en presencia de cosustratos como oxígeno molecular (O₂) y nicotin adenin difosfato (NADPH), así como de óxido nítrico sintetasa (para catalizar la reacción), da lugar a la formación de Nw-OH-L-arginina. En el siguiente paso, 1/2 de NADPH interviene con esa molécula para formar L-citrulina y óxido nítrico. Podría ser también que el sistema calmodulina sea requerido como cofactor enzimático regulando transporte electrónico.

b) La desestabilización que ocasiona la óxido nítrico sintetasa propicia que el nitrógeno atraiga la forma resonante positiva del oxígeno molecular (O+), mediante el empleo del par electrónico libre formando un enlace aparente con ésta especie, el cuál se estabiliza al recuperar el nitrógeno su par electrónico del doble enlace formado con el carbono adyacente.

c) El carbono con deficiencia electrónica resultante de la estabilización del nitrógeno propicia que la fracción negativa de la molécula de oxígeno sea atraída hacia éste, estabilizándose por medio de un enlace real.

d) Por efecto de estabilidad electrónica en la fracción guanida, por formación del peróxido cíclico, la óxido nítrico sintetasa sustrae totalmente al hidrógeno enlazado al nitrógeno, lo que ocasiona una desestabilización del mismo nitrógeno induciendo un corrimiento electrónico para formar las especies de Oxido Nítrico y L- citrulina.

ÓXIDO NÍTRICO

Hemos visto por lo anterior, que el ON es muy importante en la regulación vascular y del músculo liso: a continuación se mencionan las características y propiedades de éste radical libre.

Es un nitrovasodilatador endógeno de molécula inestable, que se sintetiza a partir de L-arginina mediante la óxido nítrico sintetasa (fig. A), su vida media ha sido estimada desde 3 segundos hasta 60 o 70 segundos (8,14,15,36,38). Como radical es considerado de la familia de congéneres liberados por redox, tales como NO⁺ (Nitrosonium), NO⁻ (Nitroxil). El óxido nítrico es altamente difusible por su bajo peso molecular (33).

Mediante la Guanilato-ciclasa, el ON regula ⁽³⁶⁾:

- * Flujo sanguíneo
- * Presión arterial
- * Relajación de músculo liso
- * Modula funciones inmunológicas
- * Liberación hormonal

Su síntesis es en:

- * Endotelio Vascular
- * Macrófagos
- * Sistema Nervioso Central
- * Hígado
- * Glándulas Suprarrenales

Sus efectos son inhibidos por:

- * Hemoglobina
- * Azul de metileno
- * Antagonistas de L-arginina

Inhibe:

- * Agregación plaquetaria por mecanismo dependiente de GMPc y por un aumento de AMP
- * Adhesión plaquetaria

El ON es una molécula muy inestable que se metaboliza rápidamente en NO₂ y NO₃ en soluciones oxigenadas. Si el ON interactúa con enzimas, se produce su inactivación (33). En tal caso se incluye a la ONS que ya ha sido purificada y clonada, por lo que se sabe que es un grupo de isoenzimas (constitutiva citosólica e inducida), que se encuentran en diferentes tejidos como:

- a.- Endotelio Vascular
- b.- Tejido Nervioso Central y Periférico.
- c.- Macrófagos (16)

ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA

1.-CONSTITUTIVA CITOSÓLICA	2.-INDUCIDA
<p>*Dependiente del complejo calcio-calmodulina</p> <p>*Libera picomoles de óxido nítrico por períodos cortos en respuesta a estimulación física</p> <p>*Requiere NADPH</p>	<p>*Después de la activación de células endoteliales por macrófagos y otras células, una vez expresada sintetiza óxido nítrico en nanomoles, por largos periodos</p> <p>*Ca++ independiente</p>

(38)

En el endotelio vascular la enzima se presenta en forma constitutiva.

Por otra parte, en estudios de GMPc como segundo mensajero en diferentes funciones fisiológicas se ha encontrado que aunque el mecanismo no está bien definido, el ON aparece para activar la enzima guanilato ciclasa por interacción con el grupo hemo produciendo

relajación en el músculo liso vascular e inhibición plaquetaria (33).

Algunas sustancias pueden unir a sus moléculas el ON intracelular como por ejemplo; la ONS, la Ciclooxygenasa, la Guanilato ciclasa. El ON puede unirse a grupos -SH en proteínas formando tioles. También puede unirse a la hemoglobina (Hb) cuya función es el transporte de oxígeno en la sangre de los pulmones a los tejidos por lo que ésta puede presentarse en dos estados: Hb oxigenada y Hb no oxigenada (17).

La difusión del ON luminal es de la pared vascular y llevada rápidamente a células sanguíneas rojas (CSR), para ser atraídas, ya sea por la hemoglobina oxigenada o no oxigenada, esto sucede en venas y arterias, siendo el nitrato el último metabolito del ON en CSR (fig.D) y que es transportado dentro del plasma para ser eliminado por filtración glomerular. La vida media del nitrato es de 10 a 15hrs (16).

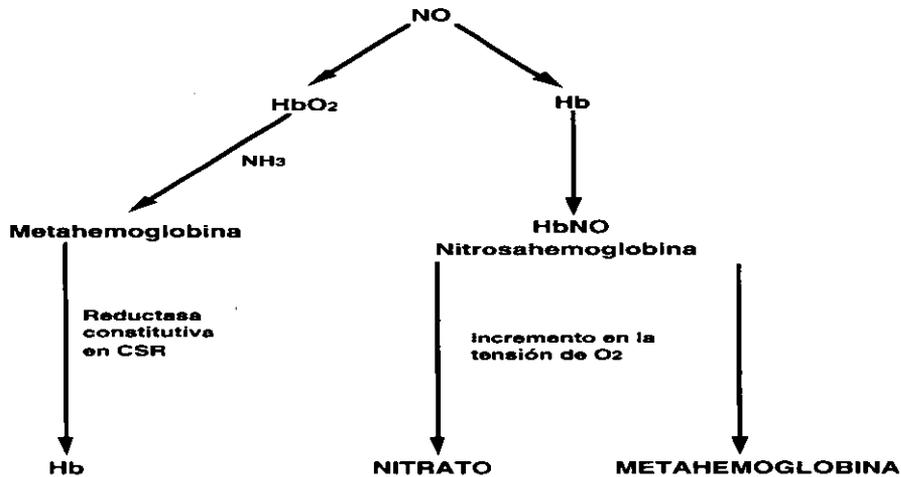


Figura (D). Esquema general del proceso de fijación del óxido nítrico a la hemoglobina.

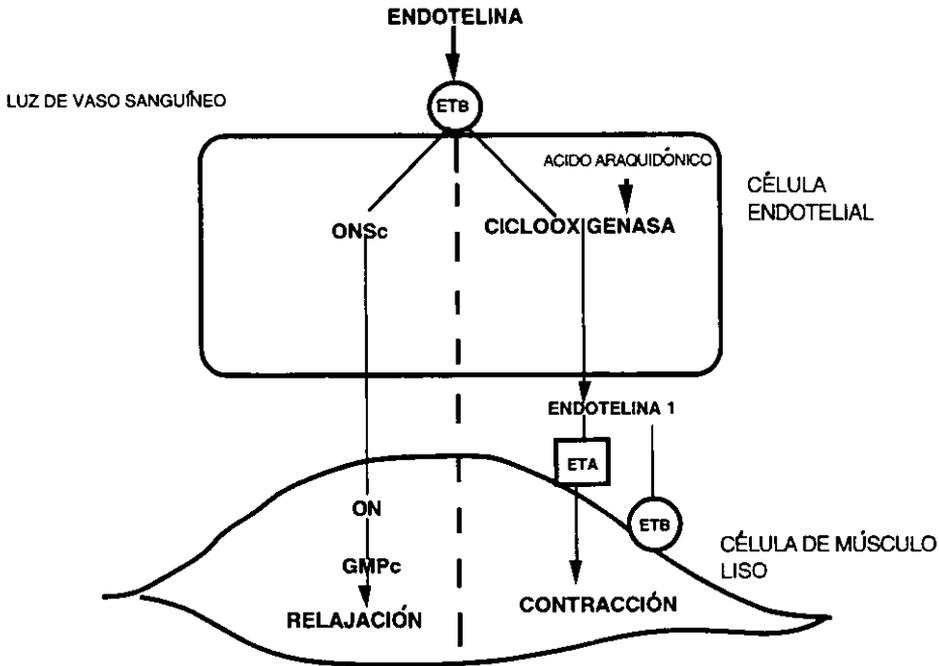


Figura (E). En las células endoteliales hay factores constrictores y factores dilatadores que se liberan por diferentes mecanismos y actúan sobre las células de músculo liso vascular.

En ésta figura se representan la relajación vía L-arginina (que se explica en la figura A) y la contracción vía metabolismo del ácido araquidónico. En la contracción participan receptores ETA (Endotelina-A) expresados en células de músculo liso vascular y receptores ETB (Endotelina-B) que se expresan tanto en células endoteliales como en células de músculo liso vascular.

Los receptores ETA son específicos para endotelina-1 mientras que los receptores ETB pueden ser activados por endotelina-1 o endotelina-3. La endotelina -1 es uno de los primeros productos de las células endoteliales vía ciclooxigenasa y activa los receptores ETA, hay liberación de calcio intracelular a través de un segundo mensajero y se produce la contracción.

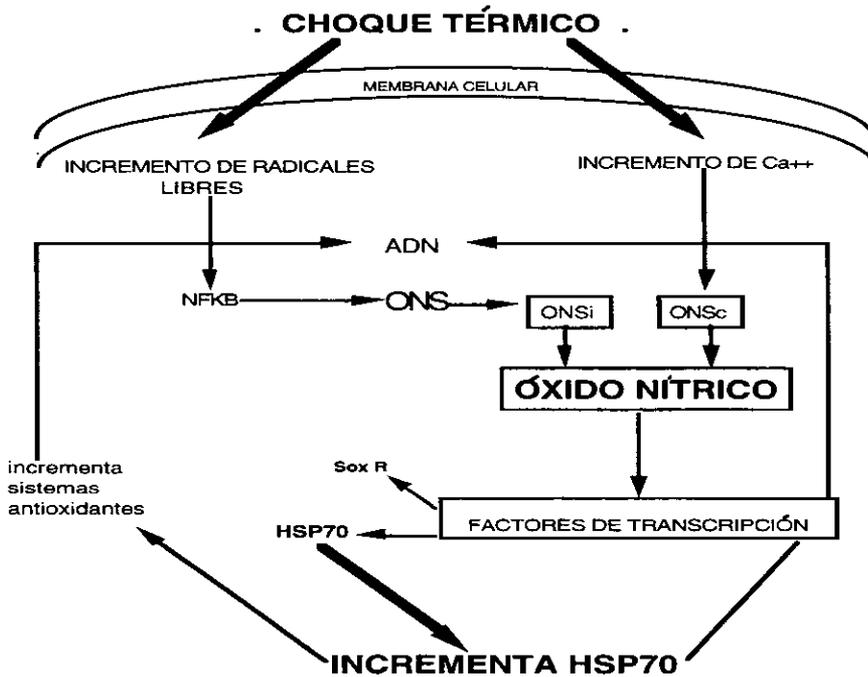


Figura (F).- También se ha propuesto que la liberación de ON se dá en respuesta al ambiente o algún tipo de estrés y se sintetizan proteínas de la familia HSP70, las cuales tienen un papel importante tanto en procariontes como eucariontes en la adaptación al estrés (19). Se ha observado que cuando se someten ratas a estrés calórico hay generación de radicales libres en todo el cuerpo que rápidamente van a NFκB, un factor de transcripción de muchos genes incluyendo la codificación de ONSi. Por otra parte, después de Choque Térmico, hay una elevación de catecolaminas y concentración hormonal además de que se incrementa el calcio intracelular, lo cuál, puede ser otro mecanismo para la síntesis de ON relacionado con la óxido nítrico sintetasa constitutiva dependiente de calcio.

ALGUNOS INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO

La producción de ON en el endotelio vascular, puede inhibirse mediante mecanismos farmacológicos empleando análogos estables de L-arginina de los que a continuación se mencionan algunos de los más utilizados y sus características más importantes.

L-canavanina: en anillos de aorta de rata en incubación prolongada inhibe la relajación dependiente del endotelio.

L-NA (N-nitro-L-arginina) ; inhibe la acción de ONS.

L-NAME (N-nitro-arginin-metil ester): inhibe la acción de ONS.

L-NMMA (N-monometil-L-arginina): inhibe la acción de ONS.

Inhibe la relajación dependiente del endotelio, incrementa el tono basal y atenua la relajación inducida por acetilcolina en anillos de aorta y en arterias pulmonares de conejo. En algunos trabajos ⁽³²⁾ se reporta que los efectos de L-NMMA son reversibles con nitroglicerina. Con éste inhibidor de la síntesis de óxido nítrico se han estudiado las arterias coronarias de humano⁽³²⁾ encontrando por ejemplo, que hay diferencias de producción y respuesta a agentes vasoactivos para la producción de óxido nítrico entre el segmento distal epicardial y el segmento proximal de arterias coronarias.

CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR ESTIRAMIENTO

El trabajo muscular responde a cambios por estiramiento, es decir, todos los músculos conocidos se contraen más fuerte si éstos son estirados en rangos fisiológicos (18). Para realizar estudios sobre éste fenómeno y la participación de los canales iónicos, se ha recurrido a una serie de elementos con ciertas características químicas y numerosas aplicaciones de éstos en estudios de sistemas biológicos, la reproducción de tales efectos se ha logrado mediante el empleo de los lantánidos, como el Gadolinio con un radio de 0.938 Å, Lanthanum (1.061 Å) y Lutetium (0.85 Å).

Con base en los estudios de Xian-Cheng Yang y cols. (26) en los que utilizaron Gadolinio (Gd^{+++}) en diferentes concentraciones sobre oocitos de *Xenopus* con la técnica de Patch Clamp y encontraron que una concentración 10 μM de Gd^{+++} bloquea los canales activados por estiramiento, en tanto que los otros dos lantánidos también generan bloqueo pero sólo a concentraciones de 100 μM o más, ya que a concentraciones menores, solo se reduce el tiempo de apertura de canales. Esto sugiere que en los canales de la célula hay un número suficiente de cargas negativas que son ocupadas por Gd^{+++} .

Es de especial interés el estudio de canales activados por estiramiento en experimentos con gadolinio (Gd^{+++}) porque es el bloqueador más potente que se conoce de éste tipo de canales. La membrana celular es relativamente impermeable a los lantánidos por lo que se cree que el efecto de éstos cationes trivalentes es a nivel de sarcolema (21, 26).

Hansen y otros ⁽²¹⁾ utilizaron ventrículos aislados de cánidos para producir en ellos arritmias inducidas por estiramiento ya que la probabilidad de que éstas arritmias se presenten es mayor cuando se incrementa el volumen ventricular hasta rangos patológicos, así mismo, realizaron pruebas de estiramiento continuo, los resultados fueron que de 20 estiramientos control, 19 presentaron arritmias y de 20 estiramientos en los que se aplicó gadolinio 10 μ M, solo uno presentó arritmia.

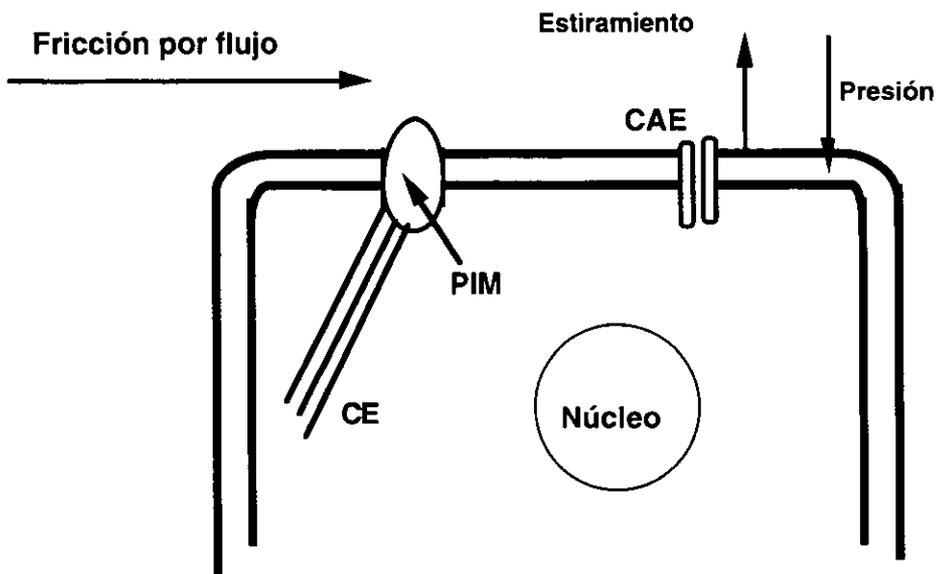
También hay trabajos en los que se propone que los cambios en las condiciones mecánicas modulan las uniones de calcio con las proteínas contráctiles y que al estirar el músculo y luego relajarlo, se producen cambios en el potencial de acción porque se incrementa el influjo de calcio del sarcolema que al seguir aumentándola reactiva la actividad mecánica ⁽²²⁾.

Como ya se mencionó, el estrés mecánico altera las propiedades estructurales y funcionales de las células, por ejemplo: Las proteínas de superficie celular y la matriz extracelular se unen por proteínas transmembranales al citoesqueleto activándose los canales iónicos y enzimas por deformación mecánica. Esas señales pueden ser convertidas en respuestas electrofisiológicas y bioquímicas como respuestas de adaptación celular al medio externo.

En el sistema cardiovascular, el estrés mecánico de adaptación facilita la distribución adecuada de la sangre y en el endotelio los diferentes tipos de estrés mecánico son impuestos sobre una fuerza de equilibrio generada por tensión del citoesqueleto ⁽²⁸⁾.

Dentro de la función de los canales iónicos activados por estiramiento, se involucra al calcio como segundo mensajero en la activación endotelial para la secreción de EDRF y prostaglandina ⁽²⁷⁾,

pero además se tiene la hipótesis de que esos canales sean también, un mecanismo para la entrada de calcio a la célula.



La figura (G). Representa la forma esquemática de una célula endotelial en la que están representados una proteína integral de membrana (PIM), un canal activado por estiramiento (CAE), una parte de citoesqueleto, y con flechas, se indica la fuerza hemodinámica y su dirección. Las fuerzas externas que actúan sobre la célula durante el flujo, cambian la tensión celular interna, para equilibrarse con la fuerza externa.

La mecanotransducción inducida por el estrés, puede ser por:

- 1.- Desplazamiento de sensores a la pared celular.
- 2.- Transmisión de la fuerza a través de elementos del citoesqueleto para distribuirlo por toda la célula.
- 3.- Fuerza de transducción del estrés mecánico transmitido como mecanotransducción a sitios distantes de donde se aplicó el estrés.
- 4.- Activación o inactivación de canales iónicos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por los antecedentes presentados, el flujo coronario puede ser un factor regulador de la función cardíaca, sin embargo, los mecanismos por los cuales el flujo coronario es capaz de transmitir una señal física en el órgano receptor y dar una respuesta celular, se desconocen.

El flujo coronario estimula la contracción cardíaca y la conducción auriculoventricular por un mecanismo desconocido. No se sabe cuáles son los eventos iniciales desde que el flujo interactúa con las células endoteliales hasta que se genera la respuesta en la célula cardíaca.

En este trabajo queremos explorar si los canales iónicos activados por estiramiento tienen que ver con el efecto estimulador del flujo sobre la conducción AV y la contracción cardíaca así como estudiar el papel del óxido nítrico como mediador de estos efectos.

OBJETIVOS

GENERAL.

Estudiar los mecanismos de acción del flujo coronario sobre la función cardíaca en corazón aislado y perfundido.

PARTICULARES.

1.- Estudiar cuáles son los efectos del flujo en la contracción ventricular y la conducción aurículoventricular cuando se bloquean los canales iónicos activados por estiramiento con cloruro de Gadolinio.

2.- Estudiar los efectos del flujo sobre la función cardíaca si se inhiben los canales de calcio con Verapamil.

3.- Evaluar los efectos del flujo sobre la contracción ventricular y la conducción aurículoventricular si se inhibe la óxido nítrico sintetasa.

4.- Comparar con el objetivo anterior, los efectos del flujo sobre la contracción e Intervalo Auriculo Ventricular si se promueve la síntesis de óxido nítrico.

HIPÓTESIS

Sí la contracción cardíaca y la conducción auriculoventricular, dependen de factores tales como liberación de ON, concentración de calcio intracelular y de los efectos hemodinámicos en el endotelio entre otros, estando éstos íntimamente relacionados con la velocidad de flujo, entonces se podrá delimitar las alteraciones que se producen en la contracción y la conducción auriculoventricular; generando e inhibiendo la liberación o activación de tales factores.

Derivándose de tal supuesto, se puede establecer como hipótesis alternas:

a) Si los canales iónicos activados por estiramiento participan tanto en la regulación de la conducción auriculo-ventricular, así como en la contracción cardíaca y estas funciones son dependientes de la concentración de calcio, pudiera ser que la liberación de ON que también es dependiente de calcio, fuera mediada por este tipo de canales. Al bloquear los canales con cloruro de gadolinio, habrá alteraciones de la función cardíaca en respuesta al flujo.

b) Si la conducción aurículo-ventricular y la contracción son dependientes de la concentración de calcio, se esperan alteraciones en los efectos inotrópico y dromotrópico si utilizamos un bloqueador específico de canales de calcio, además, se podrá determinar su participación e importancia de ésta en el mecanismo de regulación endotelial a la función cardíaca.

c) Dado que el óxido nítrico es uno de los principales compuestos liberados por el endotelio en respuesta al estrés por fricción de flujo y además participa en la regulación de la conducción auriculo-ventricular y la contracción cardíaca, entonces inhibiendo su síntesis con antagonistas de su precursor L-arginina, o promoviendo su síntesis con ése aminoácido se pueden estudiar las alteraciones sobre la regulación de los efectos inotrópico y dromotrópico.

METODOLOGÍA

El modelo a emplear es el corazón perfundido de cobayo por el método de Langendorff:

A fines del siglo XIX Oscar Langendorff realizó experimentos sobre la acción mecánica cardíaca en corazón aislado de mamífero, obteniendo como principio que se podía separar el corazón del cuerpo de un mamífero y mantener su actividad mecánica haciendo pasar a través de él una solución con características nutricionales, de oxígeno, pH y temperatura, parecidas a las de la sangre del mamífero.

El método de Langendorff se ha modificado desde 1904 (Gottlieb y Magnus, Heymans y Kochman) y ahora se tienen dos variables (presión y flujo) las cuales se pueden medir manteniendo una de ellas como constante, por lo que son dos formas experimentales ⁽¹⁸⁾:

Método de Langendorff para corazón aislado

- a) A presión constante.
- b) A flujo constante.

En éste trabajo se registraron, como se especifica posteriormente, variables tales como la conducción aurículoventricular y la contracción ventricular.

También, es posible calcular la resistencia vascular al flujo, basándose en la presión de perfusión que nos dá información adicional si se calcula antes y después de autorregulación miogénica ⁽¹⁸⁾ :

$$\text{RESISTENCIA VASCULAR} = \frac{\text{PRESION}}{\text{FLUJO}}$$

Los experimentos se realizaron a flujo de perfusión constante.

Se utilizaron cobayos de aproximadamente 300 g anestesiados con pentobarbital a una proporción de 0.1ml/100 g de peso por vía intraperitoneal y con ventilación artificial.

En el equipo de perfusión se utilizó un recipiente de doble cámara de 1.5 litros que se conecta por un lado a una bomba peristáltica con termostato que impulsa agua a temperatura de 37°C a la cámara más externa del recipiente y a un tubo serpentín para mantener a temperatura constante el líquido de perfusión que pasa a través de él, el líquido de perfusión se conduce por ese tubo a la salida a la que irá conectada la aorta ascendente del cobayo.

El líquido de perfusión es una solución Krebs con la siguiente composición:

Cloruro de sodio	NaCl	117.8 mM
Fosfato de sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	1.2 mM
Etilendinitrilotetracetato Disódico	Na ₂ EDTA*2H ₂ O	0.027 mM
Cloruro de potasio	KCl	6.0 mM
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ * 2H ₂ O	1.6 mM
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ *7H ₂ O	1.2 mM

La solución Krebs de trabajo, se prepara de la siguiente manera:

A 200 ml de solución stock se agregan 4.08 grs. de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 2.0 grs. de glucosa cuyo volumen al ser llevado a 2 litros de disolución con agua desionizada da un pH de 7.4. Esta solución de trabajo se mantiene en constante burbujeo con 95% de O_2 y 5% de CO_2 durante el tiempo que el corazón se esté perfundiendo.

Al equipo de perfusión están conectados dos transductores de presión, uno para registrar presión del flujo y otro para registrar la fuerza de contracción del ventrículo izquierdo, ambos parámetros se registraron en un polígrafo. En el caso de la fuerza de contracción, un baloncito de látex se introduce al ventrículo izquierdo y por el otro extremo se conecta al transductor. (Fig. H)

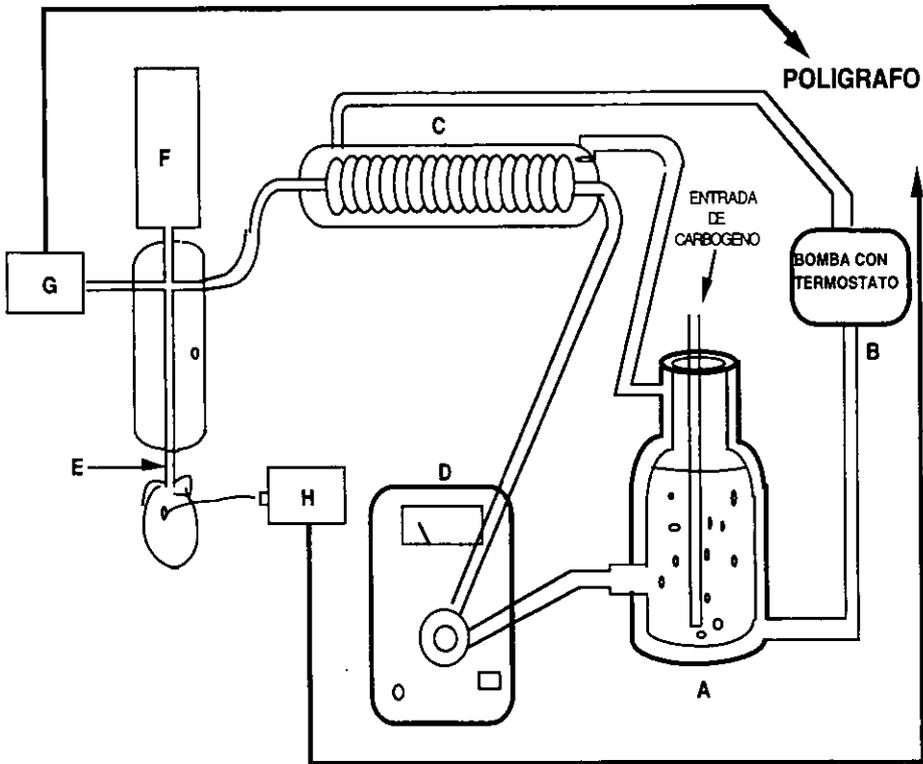


Figura (H). Representación general del equipo de perfusión para el método de Langendorff a flujo de perfusión constante.

- A.-** Recipiente de doble cámara
- B.-** Unión del recipiente de doble cámara a una bomba termostato
- C.-** Tubo de doble cámara, con cámara interior en espiral
- D.-** Bomba peristáltica que envía el perfusado a C y a E
- E.-** Cánula de plástico a la que se conecta la aorta ascendente
- F.-** Funciona como atrapador de burbujas y mantiene una constante de presión
- G.-** Transductor de corriente que envía señales al polígrafo y éste registra la presión de flujo
- H.-** Transductor de corriente unido al balón de látex y conectado al polígrafo, para registrar la fuerza de contracción del miocardio

C I R U G Í A

Después de instalar el equipo de perfusión y preparar la solución de trabajo, se pesa el animal y se aplica anestesia general con pentobarbital sódico (0.1ml/100 grs. de peso) . En el acto quirúrgico se hace una insición en el cuello del animal para descubrir la tráquea y otra a ella misma para insertar una cánula conectada a la bomba de ventilación artificial (Lámina 3). Se hace un corte en la piel a mitad del abdomen y se descubre por encima del diafragma.

El tórax se corta a la izquierda y derecha en línea paralela al esternón para descubrir el corazón, luego se coloca como referencia un hilo debajo de la aorta ascendente (Lámina 4).

El corazón se separa cortando a nivel del tronco broncocefálico en dirección a la cavidad del tórax hasta extraer el corazón cortando las venas cavas y los pulmones. Lo más rápido posible se pasan a un recipiente con solución salina a 4°C insertando la aorta a la cánula de perfusión asegurandola con el hilo de referencia, posteriormente se separan los pulmones del corazón.

Una vez colgado el corazón se perfunde a 20 ml/min durante 5 minutos disminuyendo a 10ml/min durante 25 minutos, para que el corazón se adapte a la perfusión (Lámina 5). Durante ése tiempo de adaptación, se inserta en ventrículo izquierdo el baloncito de látex con solución salina evitando la presencia de burbujas, también se colocan dos electrodos de estimulación en la aurícula derecha, un electrodo más de registro en la aurícula izquierda y otro en el ápex del corazón (Lámina 6). Los electrodos están conectados a un estimulador de corriente en el que se controla la frecuencia en pulsos por segundo (PPS) y el voltaje de estimulación. El estimulador se conecta a un osciloscopio en el que se

mide la velocidad de conducción auriculo ventricular (IAV) en milisegundos (ms).

Después de los 30 minutos de adaptación a ésta situación se inicia la variación de flujo registrando la contracción e IAV para cada experimento. En la Lámina 8 se ejemplifica un registro de conducción AV en el que se puede observar la despolarización auricular y después la despolarización ventricular, es decir el tiempo que tarda el impulso eléctrico en llegar de la aurícula al ventrículo.

En la Lámina 7 se muestra un ejemplo de registro de la contracción ventricular y presión de perfusión para un experimento con L-NAME. Se observan los efectos de las variaciones de flujo sobre la contracción ventricular y la presión de perfusión respectivamente, en condiciones control y experimentales.

Experimentalmente se recomienda que la presión de perfusión inicial esté entre 50-60 mmHg en cobayos y 60-70 mmHg en ratas ⁽¹⁸⁾.



Lámina 3.
Traqueostomía para ventilación artificial



Lámina 4.

En ésta lámina se muestra el hilo de referencia asegurando la aorta.

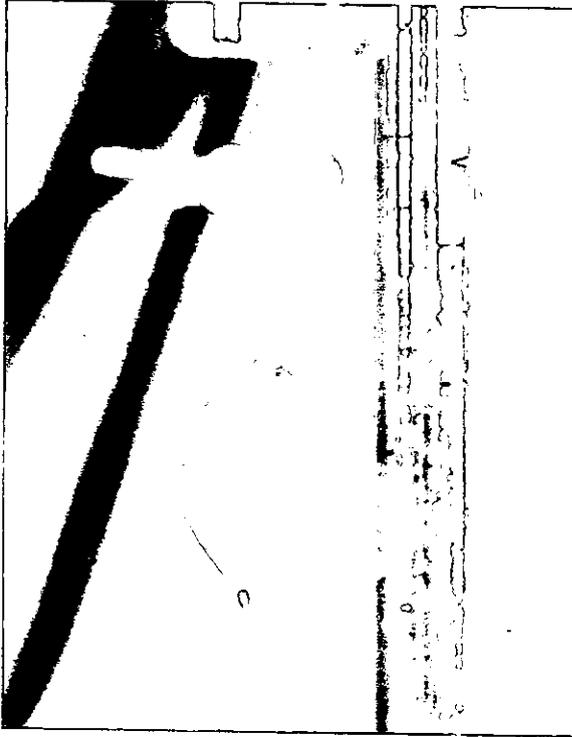


Lámina 5.
Corazón aislado y perfundido, sin estímulo eléctrico.

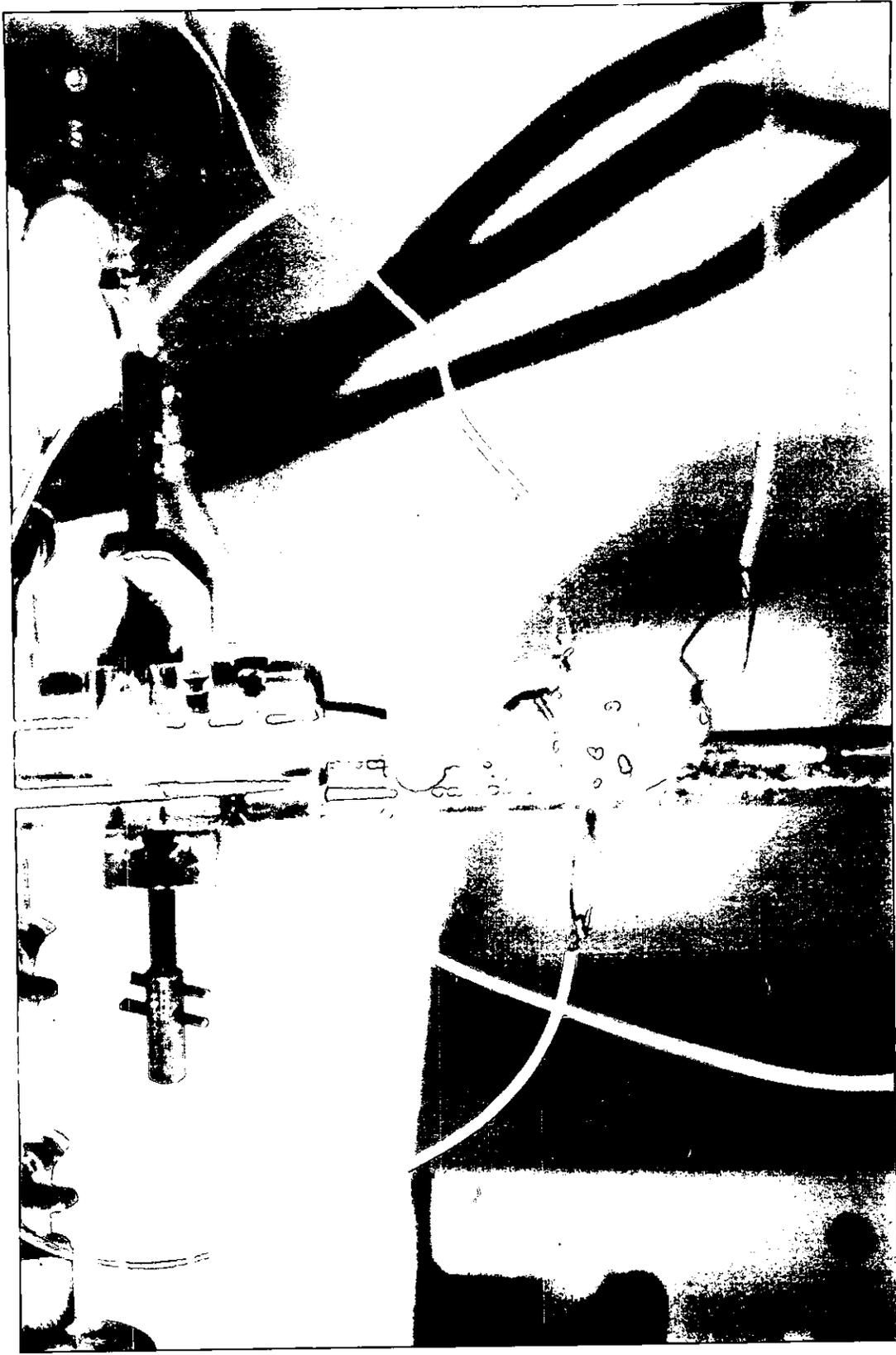


Lámina 6.
Corazón aislado y perfundido, estimulado eléctricamente.

EXPERIMENTOS

EFFECTOS DEL CLORURO DE GADOLINIO (GdCl₃) :

Después de un período de 30 minutos de adaptación a la presión de flujo, del corazón aislado y perfundido, en cada experimento (n=5) se registró una curva control con variaciones de flujo (5,10,15,20 y 25 ml/min) midiendo IAV y registrando contracción ventricular durante dos minutos aproximadamente para cada variación de flujo.

Después de registrar la curva control se disminuyó el flujo a 10 ml/min y se preparó una solución de cloruro de gadolinio.

El cloruro de gadolinio se inyectó al medio de perfusión a 0.15 ml/min en infusión continua durante 20 minutos para obtener una concentración final 3 μ M. Se registró otra curva con las mismas variaciones de flujo, midiendo IAV y registrando contracción ventricular.

EFFECTOS DEL VERAPAMIL :

Al finalizar el período de adaptación, se registró una curva control de contracción e IAV para cada variación de flujo (5,10,15,20 y 25 ml/min). Se preparó una disolución de verapamil 1 : 10000 a partir de 0.6 ml de Dilacorán en 9.4 ml de solución salina.

Al término de la curva control, el flujo se mantiene a 10 ml/min para inyectar la dilución al medio de perfusión a 0.15 ml/min de infusión continua durante 20 minutos. Después de éste tiempo se registra otra curva con las mismas variaciones de flujo midiendo el IAV y registrando contractilidad sin detener la infusión.

L-Nitro-arginin-metilester (L-NAME) :

Después del tiempo de recuperación del corazón, se realizó una serie de experimentos (n=5), en los cuales se registró una curva control de contracción con variaciones de flujo (5,7,9,11,13,15,17 y 19 ml/min.) y registrando también el IAV. Al término de la última variación de flujo (19 ml/min), se disminuye el flujo a 10 ml/min y mediante una bomba de infusión continua se inyectó al medio de perfusión una solución de L-NAME, 50 mg/5ml y a una velocidad de infusión de 0.15ml/min durante 10 minutos. Pasando ése tiempo registramos otra curva con las mismas variaciones de flujo que la control.

L-Arginina :

Para cada experimento se registró una curva control variando la presión de flujo (5,7,9,11,13,15,17,19 ml/min) midiendo IAV y registrando la fuerza de contracción ventricular durante dos minutos aproximadamente para cada flujo. Se preparó una solución de L-Arginina PM=210.7grs.

$$1\text{mM} = 21 \text{ mg} / 10 \text{ ml de buffer}$$

Esta solución se inyectó al medio de perfusión con la bomba de infusión continua a una velocidad de 0.15 ml/min durante 10 min. y a un flujo de 10ml/min. Pasando ése tiempo se registró una segunda curva con las mismas variaciones de flujo y midiendo las mismas variables, sin detener la infusión de L-Arginina.

En la Lámina 7 se muestra un ejemplo de registro de la contracción ventricular y presión de perfusión para un experimento con L-NAME. Se observan los efectos de las variaciones de flujo sobre la contracción ventricular y la presión de perfusión respectivamente, en condiciones control y experimentales:

La Lámina 8 ejemplifica un registro de conducción AV en el que se puede observar la despolarización auricular y después la despolarización ventricular, es decir el tiempo que tarda el impulso eléctrico en llegar de aurícula a ventrículo.

EXPERIMENTO CON LAMAR

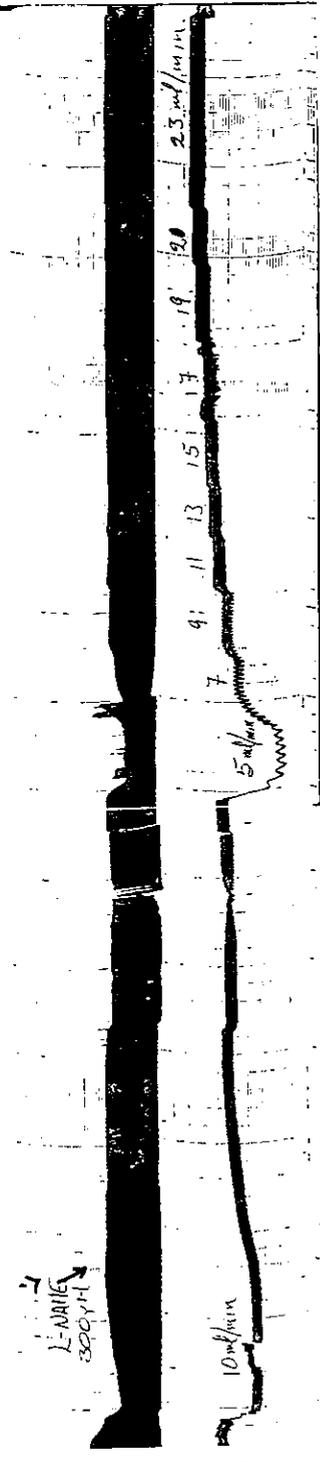


Lámina 7
 A. Registro de contracción ventricular
 B. Registro de presión de perfusión

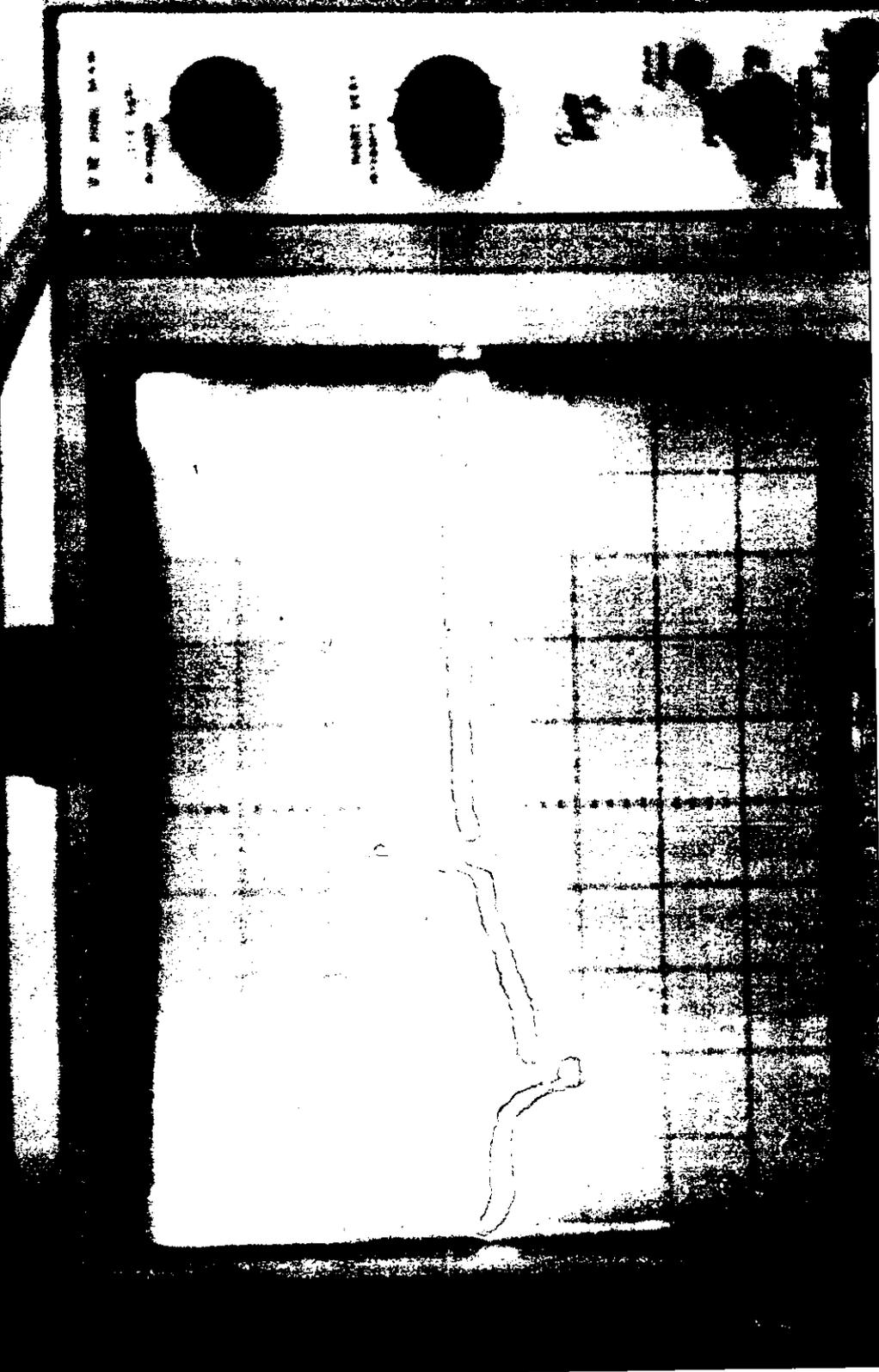


Lámina 8
Ejemplo de registro de la conducción aurículo ventricular en un osciloscopio.

RESULTADOS

GADOLINIO

P/FLUJO ml/min	IAV CONTROL (ms)			IAV GdCl ₃			
	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	TP
5	124.8	12.78	5.7	138.8	25.6	11.45	1.095
10	102.8	17.4	7.79	134.4	27.5	12.3	2.17
15	99.2	18.63	8.33	135.2	28.48	12.74	2.37
20	97.6	18.64	8.16	132.8	31.42	14	2.17
25	96.8	18.79	8.4	123.6	28.72	12.48	1.71

P/FLUJO ml/min	CONTRACCIÓN CONTROL (mmHg)			CONTRACCIÓN GdCl ₃ (mmHg)			
	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	TP
5	25.4	8.88	3.97	24.2	10.28	4.6	0.197
10	46	14.63	6.54	27.5	11.99	5.36	2.187
15	52.7	15.79	7.06	29.5	11.59	5.18	2.649
20	57.7	15.3	6.86	29.5	10.81	4.83	3.361
25	59.3	14.95	6.86	28.7	10.91	4.88	3.699

n = 5

gl = 0.05

VERAPAMIL

P/FLUJO ml/min	IAV CONTROL (ms)			IAV (ms) VERAPAMIL			
	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	TP
5	132.8	11.19	5	145.2	12.8	5.71	1.634
10	101.2	4.82	2.154	108.4	6.387	2.857	2
15	97.2	4.38	1.96	102	5.84	2.45	1.529
20	96	4.243	1.897	103.2	7.29	3.26	1.91
25	94.8	4.38	1.96	102.8	7.43	3.32	2.08

P/FLUJO ml/min	CONTRACCIÓN CONTROL (mmHg)			CONTRACCIÓN (mmHg) VERAPAMIL			
	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	TP
5	21.7	3.87	1.73	20.4	5.55	2.48	0.43
10	44.4	8.14	3.64	35.9	2.3	1.03	2.25
15	51.2	6.72	3	41.4	4.1	1.83	2.789
20	54.9	2.92	1.31	41.5	7	3.14	3.94
25	54.8	3.35	1.5	40.4	8.53	3.82	3.51

$n = 5$

$gl = 0.05$

L-NAME

P/FLUJO ml/min	IAV CONTROL (ms)			IAV (ms) L-NAME			
	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	TP
5	93.6	12.8	5.7	100	12.2	5	0.844
7	85.6	7.4	3.3	86.4	8	3.6	0.164
9	78.4	7.4	3.3	78.8	8.1	3.6	0.082
11	73.6	5.55	2.5	74	7	3.1	0.100
13	70.8	6.3	2.8	71.6	6.8	3.1	0.192
15	69.6	5.9	2.64	70.8	7	3.1	0.295
17	68.4	6.7	2.99	68	7.5	3.96	0.081
19	67.2	5.8	2.6	67.6	7.3	3.25	0.096

n = 5 gl = 0.05

P/FLUJO ml/min	CONTRACCIÓN CONTROL (mmHg)			CONTRACCIÓN (mmHg) L-NAME			
	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	TP
5	27.2	6.3	2.8	23.2	5	2.2	1.123
7	35.6	5.55	2.48	33.8	6.4	2.9	0.472
9	48	6.7	2.98	41.5	3.7	1.7	1.890
11	56.2	7.8	3.5	47.7	4.2	1.9	2.14
13	63.7	9.4	4.2	54	6.9	3	1.88
15	71.6	9.74	4.4	60.5	6.8	3	2.08
17	76.1	8.86	3.96	64.2	9.4	4.2	2.06
19	78.6	9.26	4.14	72.8	6.9	3	1.130

L-ARGININA

P/FLUJO ml/min	IAV CONTROL (ms)			IAV (ms) L-arginina			
	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	TP
5	95.6	12.5	5.6	100.8	11.88	5.3	0.674
7	84.8	8.6	3.8	88.8	13.68	6.11	0.556
9	80.8	9.3	4.2	81.6	9.20	4.12	0.136
11	74.4	5.6	2.5	76.4	6.99	3.12	0.5
13	72.8	5.8	2.6	72	2	0.89	0.29
15	69.2	3.6	1.6	71.6	2.60	1.17	1.21
17	68.4	3.3	1.5	69.6	3.29	1.47	0.57
19	68	3.7	1.67	69.2	3.90	1.74	0.499

n = 5

gl = 0.05

P/FLUJO ml/min	CONTRACCIÓN CONTROL (mmHg)			CONTRACCIÓN (mmHg) L-arginina			
	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	\bar{X}	$S\bar{X}$	ES	TP
5	39.5	15.88	7.1	37.6	12.7	5.68	0.209
7	49.2	17.54	7.84	54.9	13.54	6	0.578
9	66	22.73	10.2	70	14	6.3	0.334
11	80.4	17.8	7.96	80.8	16.27	7.28	0.037
13	92.4	20.85	9.33	89.2	17	7.63	0.27
15	99.3	20.89	9.34	95	16.52	7.39	0.360
17	103	19.26	8.61	97.2	16	7.17	0.52
19	104.2	18.7	8.37	102.4	16.54	7.39	0.162

FIGURA 1.-

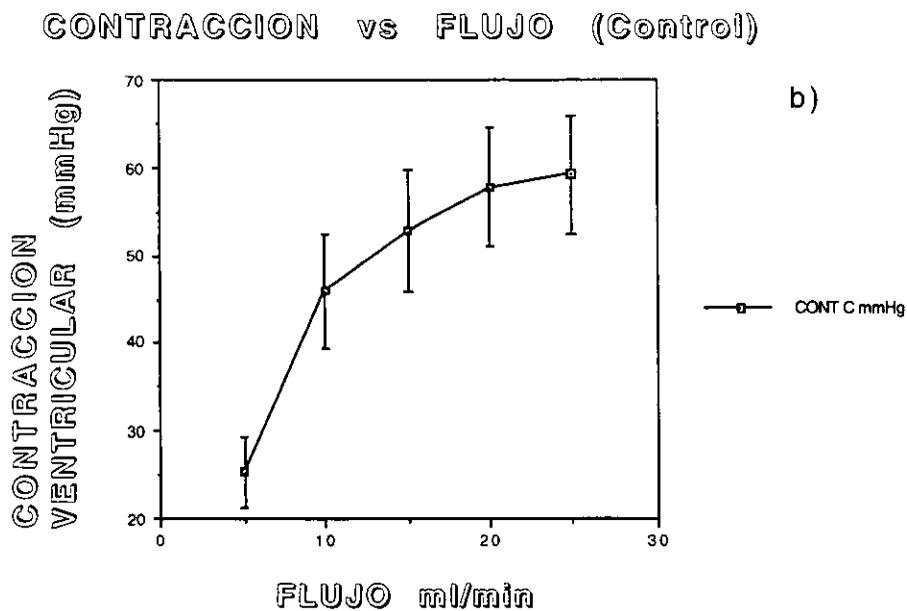
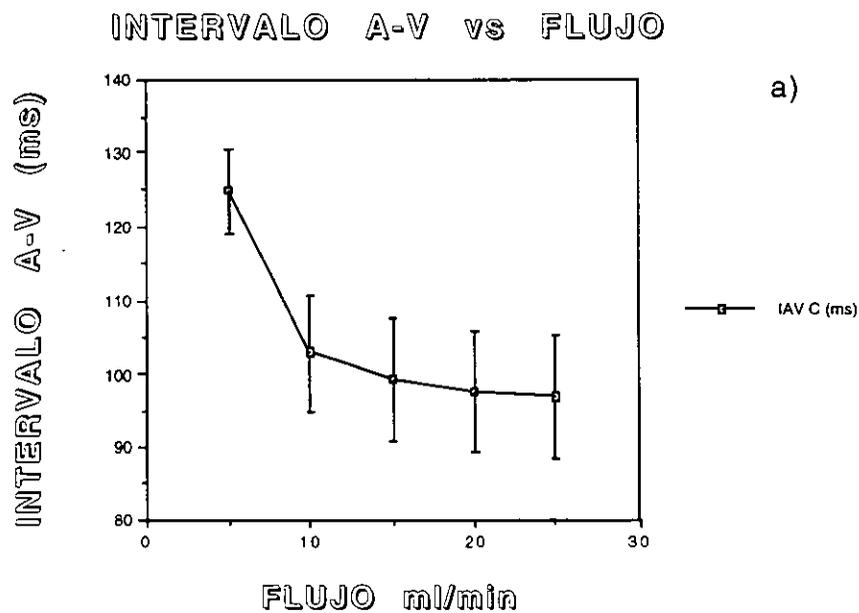


FIGURA 1 : a) IAV CONTROL, b) CONTRACCION CONTROL.

En ésta figura se muestran los promedios de las curvas control obtenidas de 5 corazones perfundidos a 5 niveles de flujo coronario (5,10,15,20 y 25 ml/min), en las que se observan efectos estimuladores de los mismos sobre la transmisión en el (IAV) y sobre la contracción ventricular.

a) Representa el tiempo de propagación en el IAV a diferentes niveles de flujo coronario y denota un efecto dromotrópico positivo, es decir, una disminución del tiempo de propagación en el IAV en cada incremento de la velocidad de perfusión.

En el flujo de 5 ml/min, el tiempo de propagación en IAV es mayor en promedio (124.8 ms., n=5), debido a que disminuye la velocidad de flujo, sin embargo cuando se incrementa la presión a 10 ml/min la disminución en el tiempo de propagación es de 17.63 % . Al aumentar la velocidad de perfusión a 15 ml/min, el porcentaje de acortamiento en el tiempo de propagación AV es de 20.5%; en 20 ml/min es de 21.8% y en 25ml/min es de 22.4%. Todos los porcentajes son con respecto al tiempo de propagación en IAV inicial.

Este efecto dromotrópico positivo indica que el flujo coronario tiene un papel estimulador importante en la propagación del estímulo en el IAV, dado que al incrementar la presión de perfusión la transmisión del impulso es más rápida.

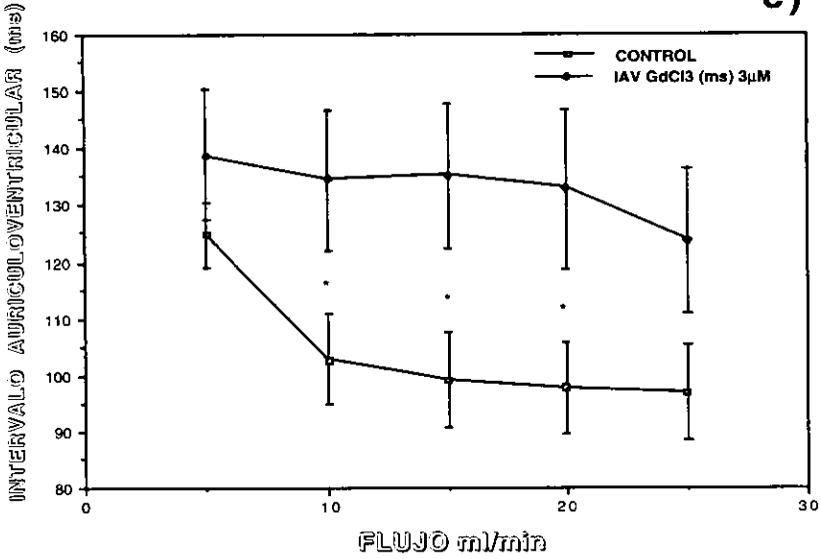
b) En forma simultánea al registro del IAV, se registró también la contracción ventricular en mmHg para n=5 y en la curva se muestra el efecto estimulador del flujo coronario sobre esa función. En la gráfica se puede observar claramente un efecto inotrópico positivo, es decir que en cada aumento de la presión de perfusión la fuerza de contracción ventricular se incrementa.

Tomando la contracción a 5ml/min como la inicial, el incremento es de 45% en 10 ml/min, 52% en 15 ml/min, 56% en 20 ml/min y 58% en 25 ml/min.

FIGURA 2.-

IAV Control vs IAV GdCl₃

c)



CONTRACCION vs FLUJO (GdCl₃) d)

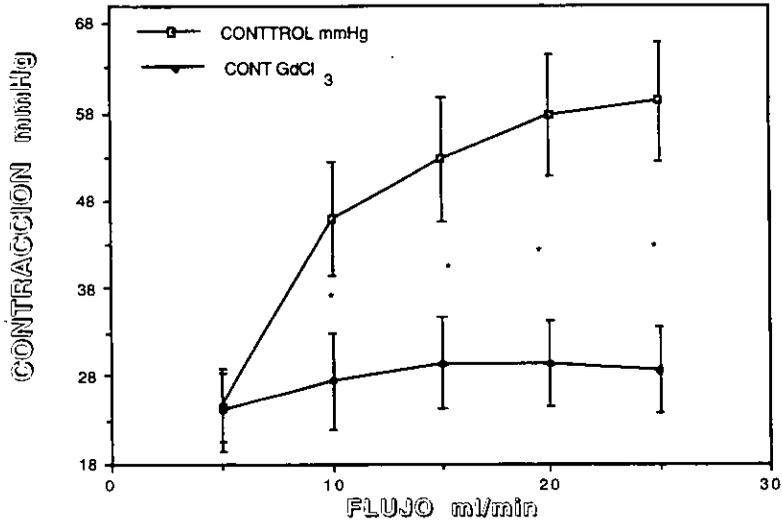


FIGURA 2 :

En ésta figura se muestra en forma comparativa las curvas control de la figura 1 y las curvas obtenidas al registrar el IAV y la fuerza de contracción cuando se administra cloruro de gadolinio ($GdCl_3$) $3\mu M$ como bloqueador de canales iónicos activados por estiramiento.

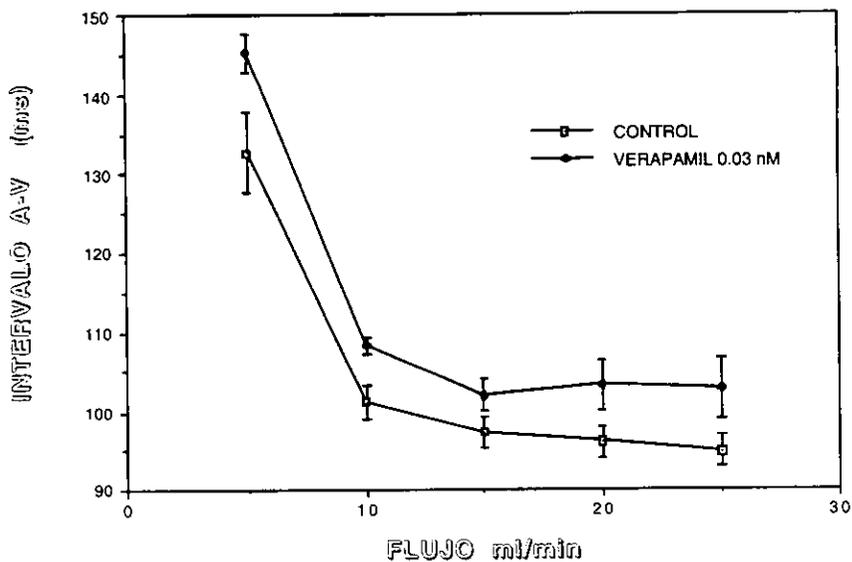
Comparando el efecto estimulador control del flujo coronario sobre el IAV y el efecto producido por bloqueo de canales iónicos activados por estiramiento con $GdCl_3$ en la misma función (**c**); se puede observar en la curva de gadolinio un efecto inhibitorio pues se da un aumento en el tiempo de propagación del estímulo en el IAV y también existe una tendencia a que el flujo coronario pierda su efecto estimulador sobre esa función. Con base a pruebas de (TP), los resultados en los flujos de 10, 15 y 20 ml/min son significativos.

De igual manera se comparó la curva control y la curva con $GdCl_3$ correspondientes a la contracción ventricular (**d**) encontrando que hay un efecto de inhibición sobre la contracción con $GdCl_3$, que por ese efecto, el flujo coronario pierde su acción estimuladora debido a que se bloquean canales iónicos que se activan por estiramiento. Se puede observar que por más que se incremente el flujo no aumenta la contracción y por prueba TP a partir de 10 ml/min los resultados son significativos. Así que los canales activados por estiramiento tienen un papel importante para la regulación de funciones cardíacas.

Para ver si el gadolinio es un bloqueador específico de canales iónicos activados por estiramiento y por otra parte para estudiar el papel que pudieran tener los canales de calcio en el efecto estimulador del flujo coronario sobre la contracción, probamos el efecto de un inhibidor de canales de calcio (Verapamil).

FIGURA 3 .-

INTERVALO A-V vs FLUJO



CONTRACCION vs FLUJO

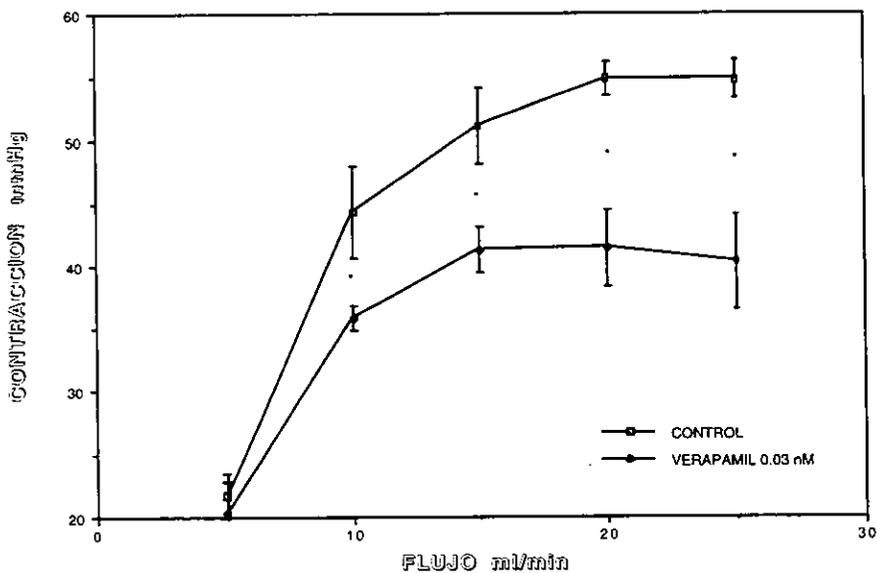


FIGURA 3 :

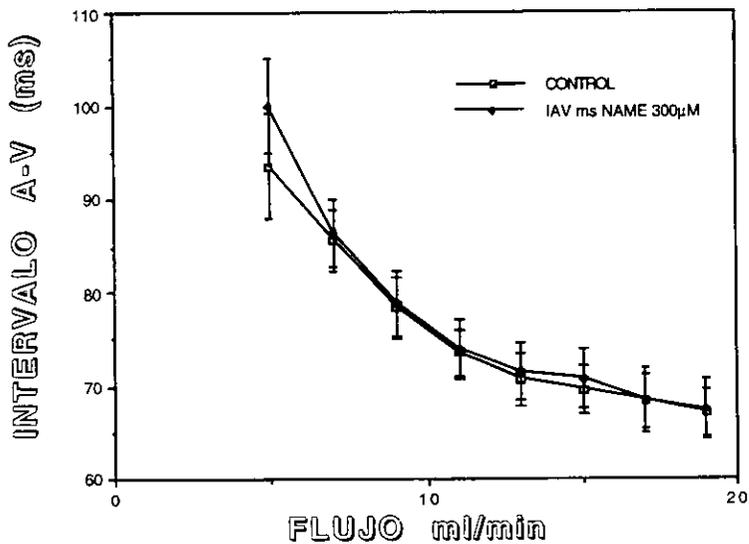
e) En ésta figura se tienen dos curvas de IAV ; una obtenida en condiciones control n=5 y cuyo comportamiento y características son similares a las observadas en la figura 1(a); y la segunda corresponde a n=5 después de administrar Verapamil (0.03nM) como inhibidor de canales de calcio, pero ésta no muestra en base a TP diferencias significativas, por lo que se puede decir que el verapamil no provoca ninguna alteración y que los canales de calcio no participan en la modulación por el flujo en el intervalo auriculo-ventricular, o a que hay otros factores que son de mayor determinación.

f) Muestra el efecto estimulador del flujo coronario sobre la contracción ventricular en una curva control n=5 con características similares a la figura 1(b) ; y una curva con las mismas variaciones de flujo obtenida después de aplicar Verapamil (0.03nM) durante 15 min.

En base a TP y a partir del flujo 10 ml/min, los resultados son significativos, observándose un efecto inotrópico negativo.

FIGURA 4.-

INTERVALO A-V vs FLUJO (NAME)



CONTRACCION CONTROL vs NAME

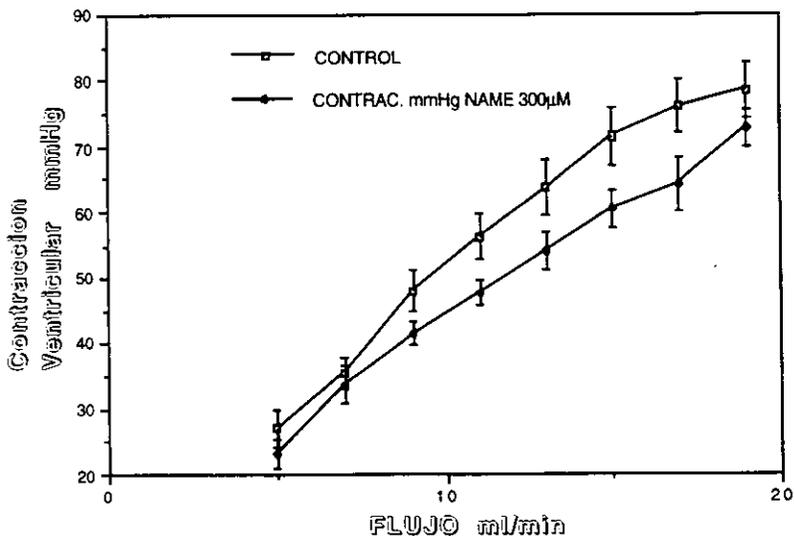


FIGURA 4 :

g) En el estudio de la participación del óxido nítrico como mediador del efecto del flujo en la función cardíaca se utilizó L-NAME (Nitro-arginin-metil ester) como inhibidor de ONS y por lo tanto de la síntesis de ON. En ésta figura se muestra la comparación de una curva control como la de la figura 1(a) y una curva obtenida después de aplicar L-NAME durante 10 minutos. No se encontró ninguna alteración dado que no se pierde el efecto estimulador del flujo coronario mientras que por TP no hay diferencias significativas.

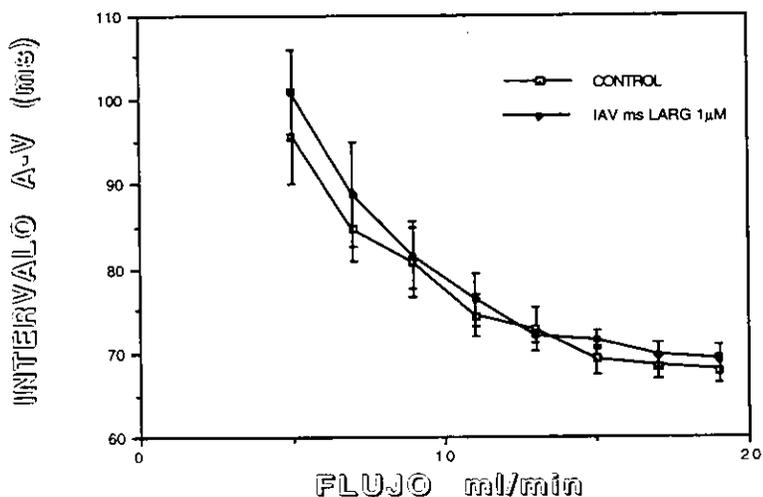
En base a éstos resultados se puede decir que la inhibición de óxido nítrico no afecta el efecto del flujo en la propagación del estímulo en el IAV.

h) La figura muestra las curvas de contracción ventricular control y después de aplicar L-NAME. Los cuales se registraron simultáneamente con su correspondiente en la figura g.

Se observa que con L-NAME no se pierde el efecto estimulador del flujo pues a cada aumento en la velocidad de perfusión aumenta la contracción y en relación a TP no hay diferencias significativas.

FIGURA 5.-

INTERVALO A-V vs FLUJO (L-arginina)



CONTRACCION vs FLUJO (L-arginina)

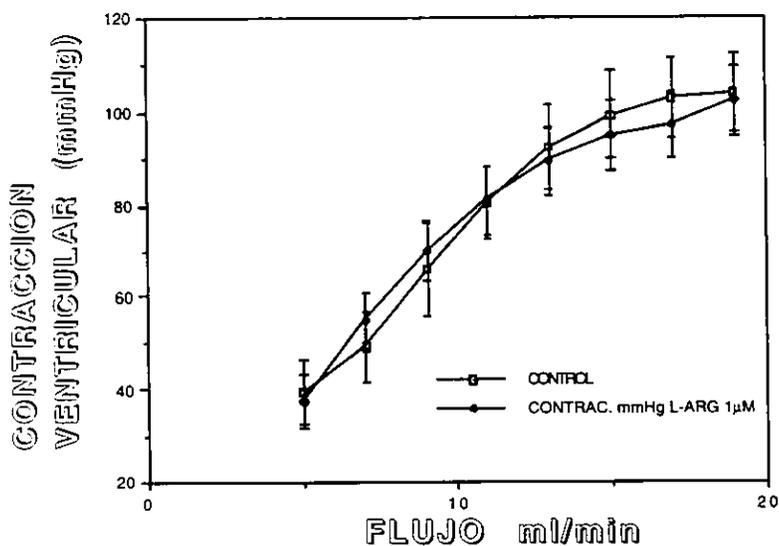


FIGURA 5 :

i) Ya que inhibiendo la síntesis de ON no se obtuvieron resultados significativos, se decidió probar si administrando el precursor de la síntesis de ON (L-arginina) se dieran alteraciones en el efecto del flujo sobre la función cardíaca. La figura representa el efecto estimulador del flujo coronario sobre IAV control y se compara con la curva que resulta después de la aplicación de L-arginina (1mM) por 10 min.. No hay diferencias significativas.

j) Representa la curva control del efecto estimulador del flujo coronario sobre la contracción ventricular comparada con la curva obtenida de la aplicación de L-arginina al medio de perfusión. No hay diferencias significativas ni se pierde el efecto estimulador. Por lo que se puede decir que además del óxido nítrico hay factores de mayor determinación para la regulación de la función cardíaca.

D I S C U S I O N

Estudiando el mecanismo por el cuál el flujo coronario estimula mediante sus fuerzas hemodinámicas la activación de canales iónicos y la liberación de sustancias vasoactivas por el endotelio vascular coronario, así como la relación de éstas sustancias con los efectos producidos sobre la función cardíaca cuando alteramos alguna parte de ése mecanismo, se tiene que el corazón aislado y perfundido es un modelo experimental adecuado para estudiar las alteraciones cardíacas in vitro y explorar cuál es la participación de los canales iónicos que se activan por estiramiento para estimular la liberación de ON.

De los resultados obtenidos en éste trabajo se puede decir lo siguiente:

En los experimentos con cloruro de gadolinio, los efectos son altamente significativos tanto en IAV donde se incrementa considerablemente el tiempo de conducción (efecto dromotrópico negativo) como en la contracción ventricular en la que se pierde el efecto inotrópico positivo provocado por el flujo. Esto refuerza la idea de que la presión de flujo juega un papel importante por sus características hemodinámicas como fricción y deformación por presión, sin embargo, con las pruebas realizadas como variaciones de flujo e inhibición específica de canales iónicos que se activan por estiramiento sólo podemos decir que ése tipo de canales responden de manera importante al estímulo mecánico y que su inhibición produce efectos negativos sobre IAV y contracción ventricular. Lo cuál no significa que esos canales sean el único mecanismo para la función cardíaca, pues cuando se utiliza el verapamil como inhibidor específico de canales de calcio, no se observan diferencias significativas en la conducción AV pero si en la contracción, sobre todo cada vez que se aumenta la presión de flujo ya que la inhibición es más rápida. Esto significa que también los canales de

calcio participan en la regulación cardíaca pero comparando los efectos, éstos son más significativos con gadolinio como se puede ver en la figura (2) en donde el efecto del flujo coronario sobre la conducción auriculoventricular y la contracción tiende a perderse.

Así, el flujo coronario es determinante en la regulación cardíaca pero además de los canales de calcio y de canales iónicos activados por estiramiento, hay otros factores que se interrelacionan en la respuesta al flujo coronario.

Cuando se utiliza L-NAME a una concentración de 300 μ M como inhibidor de ONS, no se obtienen diferencias significativas en base a la prueba de T Pareada ni en la conducción AV, ni en la contracción ventricular, aunque en ésta última se ve una atenuación de la respuesta al flujo. En ninguna de éstas funciones se pierde el efecto al flujo. Estos resultados podrían deberse a que la concentración de L-NAME o el tiempo de infusión se deban modificar.

Por eso se exploró la promoción de la síntesis de óxido nítrico a partir de L-arginina y tampoco hubo diferencias significativas, es decir que se utilizó uno de los inhibidores más potentes de la síntesis de óxido nítrico y por otra parte su principal precursor, lo cuál no significa que no haya inhibición en un caso y promoción de la síntesis de ON en el otro sino que en las alteraciones que se estudiaron en la transmisión auriculoventricular y la contracción cardíaca, hay otros factores además del óxido nítrico que participan en el mecanismo de transmisión de mensajes celulares entre el endotelio y el músculo liso.

En los resultados obtenidos con L-NAME, pudiera ser que para estudios posteriores se calcule la resistencia vascular para ver si la inhibición de la ONS y por lo tanto de ON, se rompa con la vasodilatación y en consecuencia se incremente la resistencia vascular a mayor velocidad de flujo.

En ése sentido podemos decir, que el estudio del mecanismo de acción del flujo coronario y de la importancia del óxido nítrico así como los canales iónicos que se activan cuando hay deformación celular implica el análisis de otros factores que pueden ser manejados "in vitro", como (además de los anteriores), la medición en los niveles de metabolitos estables derivados de óxido nítrico, la frecuencia cardíaca, la medición de metabolitos diferentes al óxido nítrico.

CONCLUSION

En base a los resultados, podemos concluir que el efecto estimulador del flujo coronario sobre la conducción A-V y sobre la contracción ventricular esta mediado principalmente por los canales iónicos que se activan por estiramiento y en menor grado por las concentraciones de calcio. La inhibición específica de la síntesis de óxido nítrico no tienen ningun efecto sobre las funciones estudiadas, indicando que éste gas no participa como mediador de los efectos mencionados. Sin embargo se requiere de nuevos estudios en los que se puedan analizar en mayor detalle la participación de los canales iónicos activados por estiramiento y la síntesis de óxido nítrico.

B I B L I O G R A F I A

01.-Rubio, R.; Ceballos, G. y Suárez, J.; 1995; Coronary flow stimulates auricular-ventricular transmission in the isolated perfused guinea pig heart; *Am. Jour. Physiol.*; 269:H1177-H1185.

02.-Feigl, E.; 1983; Coronary physiology; *Physiol. Rev.*; 63:1-205.

03.-Weigun Shen, MD; Thomas H. Hintze, PhD and Michael S. Wolin. PhD.; 1995; Nitric Oxide. An Important Signaling Mechanism Between Vascular Endothelium and Parenchymal Cells in the Regulation of Oxygen Consumption; *Circulation*; 92:3505-3512.

04.-Yoichi Goto, Bryan K. Slinker and Martin M. LeWinter; 1991; Effect of Coronary Hyperemia on Emax and Oxygen Consumption in Blood - Perfused Rabbit Hearts. Energetic Consequencen of Gregg's Phenomenon; *Circulation Research*; 68: 482-492.

05.-Berrazueta, J. R. ,P; 1990; El óxido nítrico: de vasodilatador endógeno a mediador biológico; *Rev. Esp. Cardiol.*; 43:421-431.

06.-Christopher J.H. Jones, MBBS; Lih-Kuo, PhD and Michael J. Davis PhD.; 1995; Role of Nitric Oxide in the Coronary Microvascular Responses to Adenosine and Increased Metabolic Demand; *Circulation*; 91:1807-1813.

07.-Philip S. Tsao, PhD; Neil P. Lewis, MD, PhD.; 1995; Exposure to Shear Stress Alters Endothelial Adhesiveness. Role of Nitric Oxide; *Circulation*; 92:3513-3519.

08.-Moncada S.; 1992; The L-arginine: nitric oxide pathway; *Physiologica Scandinavi*; 145(2): 201-227.

09.-Lüscher, T.F.; Wenzel, R.R. and Noll, G.; 1995; Local regulation of the coronary circulation in health and disease: role of nitric oxide and endothelin; *European Heart Journal*; 16:51-58.

10.-Puneet Mohan, Dirk L. Brutsaert and Stanislas V. Sys.; 1995; Myocardial performance is modulated by interaction of cardiac endothelium derived nitric oxide and prostaglandins; *Cardiovascular Research*; 29:637-640.

11.-Suárez Jorge and Rubio Rafael; 1991; Regulation of glycolytic Flux by coronary flow in guinea pig heart. Role of vascular endothelial cell glycocalyx. *Am. Jour. Physiol.*; 261:H1994-H2000.

12.-Pohl V.; 1990; Endothelial cells as part of a vascular oxygen - sensing system: Hypoxia-induced release of autacoids; *Experientia*; 46:CH-4010.

13.-Peter Davies, Soren-Peter Olesen and David E. Clapham; Endothelial Communication. *Hypertension*; 11:563-572.

14.-Moncada, S.; Palmer, J. M. R. and Higgs A.; 1991. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol. Reviews*; 43(2):

15.-Jian-Ming Li; Richard A. Fenton; Bruce S. Cutler and Jame G. Dobson Jr.; **Adenosine enhances nitric oxide production by vascular endothelial cells.** *Rapid communication*; C519-C522.

16.-A. Wennmalm; 1994. **Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease.** *Jour. of Internal Medicine*; 235:317-327.

17.-Sheeler, P.; 1993; **BIOLOGIA CELULAR.** Ed. LIMUSA; D.F., México; 672 pp.

18.-Döring, H. J. and Dehnert, H.; **THE ISOLATED PERFUSED WARM-BLOODED HEART according to LANGENDORFF.** 1^a ed.; Ed. *Perlandth*; R.F.A., Alemania (1988) (Ing).

19.-Malyshev, I. Yu.; Manukhina, E. B.; Mikoyan, V. D.; Kubrina, L. N. and Vanin, A. F.; 1995; **Nitric oxide is involved in heat - induced HSP70 Accumulation.** *FEBS Letters*; 370:159-162.

20.-Vogel, A. Robert, MD.; 1993; **Endothelium-Dependent Vasoregulation of Coronary Artery Diameter and Blood Flow.** *Circulation*; 88(1):

21.-Hansen, E, David; Borganelli Mark; et al. 1991; **Dose-Dependent Inhibition of Stretch-Induced Arrhythmias by Gadolinium in Isolated Canine Ventricles.** *Circulation Research*; 69(3):

22.-Lab, J. Max; Allen, G. David and Orchard, H. Clive; 1984; **The Effects of Shortening on Myoplasmic Calcium Concentration and on the Action Potential in Mammalian Ventricular Muscle.** *Circulation Research*;

55(6):

23.-Hurst Willis; 1988; El corazón arterias y venas; Ed. Interamericana; D.F., México; 1155 pp.

24.-Davies F., Peter; 1995. Flow-ediated Endothelial Mechanotransduction. *Physi. Reviews.*; 75(3):

25.-Mombouli, Jean-Vivien and Vanhoutte M. Paul.; 1995; Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 35:679-705.

26.-Xian-Cheng Yang and Fredrick Sachs.; Block of Stretch-Activated Ion Channels in *Xenopus* Oocytes by Gadolinium and Calcium Ions.; *SIENCE*; 243:1068-1070.

27.-Adams, J. David; Barakeh, Joseph; Laskey, Rachel and Van Breemen Cornelis; 1989; Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB JOURNAL*; 3:2389-2400.

28.-Davies, F. Peter and Tripathi, C. Satish; 1993; Mechanical Stress Mechanisms and the Cell. *Circulation Research* ; 72:239-245.

29.-Watson, A. P.; 1991; Function Follows form: generation of intracellular signals by cell deformation. *FASEB* ; 5:2013-2019.

30.-Ignarro, J. L.; 1989; Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB Jour.*; 3:31-36.

31.-Kuchan, M. J.; 1994; Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells; *Am. Jour. Physiol.*; 267:C753-C758.

32.-Lefroy, C. D. and Crake, T.; 1993; Effect of inhibition of Nitric Oxide Synthesis on Epicardial Coronary Artery Caliber and Coronary Blood Flow in Humans; *Circulation* ; 88:43-54.

- 33.-McDonald, J. L. and Murad, F.; 1996; Nitric Oxide and Cyclic GMP Signaling; *Proceedings of the Society For Experimental Biology and Medicine*; 211:1-15.**
- 34.-Quyyumi, A. A.; Dakak, N. and Andrews, N. P.; 1995; Contribution of Nitric Oxide to Metabolic Coronary Vasodilation in the Human Heart; *Circulation*; 92:320-326.**
- 35.-Goulielmos, V. N.; Enayat, E. Z. and Sheridan, J. D.; 1995; Nitric oxide and prostacyclin modulate the alterations in cardiac action potential duration mediated by platelets during ischaemia. *Cardiovascular Research*; 30:788-798.**
- 36.-Mizutani, T. and Layon, J.; 1996; Clinical Applications of Nitric Oxide. *CHEST*; 110:506-524.**
- 37.-Yao, S-K. and Akhtar, S.; 1995; Endogenous and Exogenous Nitric Oxide Protect Against Intracoronary Thrombosis and Reocclusion After Thrombolysis. *Circulation* ; 92(40):**
- 38.-Ikeda, U. and Shimada, K.; 1994; Nitric oxide release from rat aortic smooth muscle cells is not attenuated by angiotensin converting enzyme inhibitors. *European Journal of Pharmacology, Molecular Pharmacology* ; 269:319-323.**
- 39.-Hutcheson, R. I. and Griffith, M.T.; 1996; Mechanotransduction through the endothelial cytoskeleton mediation of flow - but not agonist-induced EDRF release. *British Journal of Pharmacology*; 118:720-726.**
- 40.-Davies, F. P. and Barbee, K. A.; 1997; Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.* ; 59:527-49.**
- 41.-Hölschermann, H. and Noll, T.; 1997; Dual role of cGMP in modulation of macromolecule permeability of aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.* ; 272:H91-H98.**